

**DESARROLLO DE NUEVOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS  
NANOESTRUCTURADOS BASADOS EN LACTOFERRINA CON POTENCIAL  
ANTIBIÓTICO FRENTE A *Escherichia coli* O157:H7 Y *Staphylococcus aureus*  
RESISTENTE A LA METICILINA (SARM)**

**ALBA NELLY JOHANNA LÓPEZ RODRÍGUEZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2014**

**DESARROLLO DE NUEVOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS  
NANOESTRUCTURADOS BASADOS EN LACTOFERRINA CON POTENCIAL  
ANTIBIÓTICO FRENTE A *Escherichia coli* O157:H7 Y *Staphylococcus aureus*  
RESISTENTE A LA METICILINA (SARM)**

**ALBA NELLY JOHANNA LÓPEZ RODRÍGUEZ**

**Trabajo de Grado Para Optar al Título de Químico**

**DIRECTOR**

**RODRIGO GONZALO TORRES SÁEZ, *PhD***

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2014**

## DEDICATORIA

.....A MIS SERES AMADOS, EN ESPECIAL A MI FAMILIA QUE SIEMPRE HAN  
CREIDO EN MI.

## DESIDERATA

"CAMINA PLÁCIDO ENTRE EL RUIDO Y LA PRISA,  
Y PIENSA EN LA PAZ QUE SE PUEDE ENCONTRAR EN EL SILENCIO"

MAX EHRMANN

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por permitirme lograr mis sueños.

Al profe Rodrigo y la Profe Claudia por su orientación en esta etapa de formación a nivel profesional y personal, sus consejos, disposición y paciencia. Por enriquecer mi proceso de formación como profesional y enseñarme a ver más allá las cosas.

A mi familia por su apoyo incondicional, por su amor inmenso, por su comprensión y por su compañía en todos los momentos de mi vida para realizar mis sueños. Este es uno de nuestros sueños!!! FALOR.

A la Universidad Industrial de Santander por mi formación académica, por rodearme de gente grandiosa y regalarme la oportunidad de ver un mundo más amplio.

A todos mis amigos y compañeros de la universidad industrial de Santander en especial al Grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) por el apoyo de cada persona que fue importante para terminar esta etapa de grandes momentos con cada uno de ellos. A mis amigos de la Línea de Péptidos y Nanopartículas por su apoyo incondicional.

Por último, a mis amigos con quienes compartir momentos felices en los últimos años, gracias por sacarme una sonrisa en todo momento, por ese apoyo y amistad a lo largo de este proceso de formación académica y personal, todos y cada uno de ellos hacen parte de mi vida.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>1. MARCO CONCEPTUAL Y ANTECEDENTES .....</b>	<b>18</b>
1.1 Péptidos antimicrobianos y mecanismo de acción.....	18
1.2 Lactoferrina y su potencial antimicrobiano .....	23
1.3 Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPFS).....	26
1.3.1 Soporte sólido .....	29
1.3.2 Reactivos de acoplamiento .....	29
1.3.3 Síntesis múltiple de péptidos .....	31
1.4 Nanoencapsulación de PAMs y Nanopartículas poliméricas. ....	32
1.4.1 Polímeros naturales .....	34
1.4.2 Polímeros sintéticos .....	34
1.4.3 Métodos de encapsulación de proteínas y péptidos .....	36
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
2.1 Objetivo General .....	41
2.2 Objetivo específicos .....	41
<b>3. METODOLOGÍA .....</b>	<b>42</b>
3.1 Materiales .....	42
3.2 Predicción y diseño de péptidos antimicrobianos .....	42
3.3 Síntesis y caracterización de péptidos antimicrobianos.....	44
3.3.1 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa.....	45
3.3.2 Análisis de Espectrometría de Masas.....	45
3.3.3 Simulación <i>in silico</i> de la estructura secundaria .....	45
3.3.4 Dicroísmo circular .....	46
3.4 Síntesis y caracterización de nanopartículas de PLGA- péptido antimicrobiano .....	47
3.4.1 Microscopía electrónica de Barrido en modo transmisión (STEM) .....	48
3.4.2 Dispersión de luz en modo dinámico y Potencial Zeta.....	48

3.4.3 Cuantificación del LA6 cargado en Nps de PLGA por cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en fase reversa (RP-HPLC).....	49
3.5 Determinación de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de los PAMs y los PAMs nanoencapsulados. ....	50
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>52</b>
4.1 Diseño y síntesis de péptidos .....	52
4.2 Caracterización de los péptidos antimicrobianos basados en Lf.....	54
4.2.1 Purificación por RP-HPLC. ....	54
4.2.2 Análisis de Espectrometría de Masas.....	55
4.2.3 Simulación <i>in silico</i> de la estructura secundaria .....	58
4.2.4 Dicroísmo circular .....	60
4.3 Síntesis y caracterización de nanopartículas de PLGA-LA6.....	61
4.3.1 Microscopía electrónica de barrido en modo Transmisión. (STEM).....	62
4.3.2 Dispersión de luz en modo dinámico .....	63
4.3.3 Potencial Zeta .....	64
4.3.4 Cuantificación del péptido LA6 cargado en nanopartículas de PLGA por RP-HPLC. ....	65
4.4 Determinación de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de los PAMs y los PAMs nanoencapsulados. ....	65
4.4.1 Actividad Antibacteriana de los péptidos libres. ....	65
4.4.2 Actividad Antibacteriana de las Nps PLGA-LA6.....	74
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>77</b>
<b>6. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>79</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>80</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PAMs CON EL MODELO DE: A. BASTÓN-BARRIL. B. PORO TOROIDE. LOS PÉPTIDOS ATRAVIESAN LA MEMBRANA Y FORMAN UN PORO ALINEADO. ....	19
<b>FIGURA 2.</b> MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PAMs CON EL MODELO DE: A. CAPA. B. CANAL AGREGADO. LOS PÉPTIDOS SE ALINEAN PARALELAMENTE A LA SUPERFICIE DE LA MEMBRANA Y FORMAN UNA CAPA.(ENGLER ET AL., 2012) .....	21
<b>FIGURA 3.</b> LACTOFERRINA: A. BOVINA (ORIGEN <i>BOS TAURUS</i> : P24627), B. HUMANA (ORIGEN <i>HOMO SAPIENS</i> : P02788).....	23
<b>FIGURA 4.</b> DIAGRAMA DE LA CINTA DE LA N1-DOMINIO DE LA LF BOVINA. LA FIGURA SE CONSTRUYÓ UTILIZANDO GRÁFICO MOLECULAR RASWIN (PROTEIN DATA BANK CÓDIGO ACCESO 1BLF).....	24
<b>FIGURA 5.</b> GRUPOS PROTECTORES BOC Y F -MOC.....	27
<b>FIGURA 6.</b> ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA DE LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA F-MOC.....	28
<b>FIGURA 7.</b> ESTRUCTURA DE LAS CARBODIIMIDAS Y ADITIVOS UTILIZADOS EN LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA. ....	30
<b>FIGURA 8.</b> ESTRUCTURA DE ALGUNAS SALES DE FOSFONIO (BOP Y PYBOP) Y SALES DE URONIO (HBTU Y TBTU) UTILIZADAS COMO AGENTE DE ACOPLAMIENTO. ....	31
<b>FIGURA 9.</b> SÍNTESIS MÚLTIPLE DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA POR LA METODOLOGÍA EN BOLSAS DE TÉ .....	32
<b>FIGURA 10.</b> REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS TIPOS DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS. ....	33
<b>FIGURA 11.</b> ESTRUCTURA DE: A. ÁCIDO POLI-LÁCTICO CO- GLICÓLICO (X: NÚMERO DE UNIDADES DE ÁCIDO LÁCTICO, Y: NÚMERO DE UNIDADES DE ÁCIDO GLICÓLICO) B. ÁCIDO POLI-LÁCTICO (N: NÚMERO DE CADENAS).....	35
<b>FIGURA 12.</b> MÉTODOS DE NANOENCAPSULACIÓN DE PÉPTIDOS.....	36
<b>FIGURA 13.</b> REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL MÉTODO DE DOBLE EMULSIÓN – DIFUSIÓN DE SOLVENTE .....	39
<b>FIGURA 14.</b> ESQUEMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA.....	43
<b>FIGURA 15.</b> METODOLOGÍA EXPERIMENTAL DE LA SÍNTESIS MÚLTIPLE EN FASE SÓLIDA BOLSAS DE POLIPROPILENO. ....	44
<b>FIGURA 16.</b> ESQUEMA GENERAL DE LA SÍNTESIS DE NPS DE PLGA-LA6 UTILIZANDO LA METODOLOGÍA DE DOBLE EMULSIÓN/ DIFUSIÓN DE SOLVENTE. ....	47
<b>FIGURA 17.</b> ESPECTROS DE MASAS: A. LA1, B. LA2, C. LA3, D. LA4, E. LA5 Y F. LA6. ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI TOF-TOF.....	55
<b>FIGURA 18.</b> ESTRUCTURAS SECUNDARIAS <i>IN SILICO</i> Y VISUALIZADAS EN PYMOL VIEWER. A.LA1, B. LA2, C. LA3, D. LA4, E. LA5 Y F. LA6.....	59

<b>FIGURA 19.</b> ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DEL LA1 A LA6. SOLUCIÓN DE TFE AL 30% (V/V). CONCENTRACIÓN DEL PAM: 1MG/ML.....	60
<b>FIGURA 20.</b> MICROGRAFÍA POR FE- STEM EN MODO DE TRANSMISIÓN DE NPS PLGA-LA6.. .....	62
<b>FIGURA 21.</b> HISTOGRAMA DEL TAMAÑO HIDRODINÁMICO PROMEDIO DE Nps PLGA-LA6. CONDICIONES: PLGA 2,5 MG/ML: 4 mL DE ACETATO DE ETILO COMO FASE ORGÁNICA, 1 MG/ML DE LA6: 1ML COMO FASE ACUOSA INTERNA, 0.01% (P/V) POLOXAMER 407 Y 0.05% (P/V) DE POLIETILENIMINA COMO FASE ACUOSA EXTERNA. LA MEDIDA DEL TAMAÑO HIDRODINÁMICO SE REALIZÓ POR TRIPLICADO. ....	63
<b>FIGURA 22.</b> HISTOGRAMA DE DISTRIBUCIÓN DE CARGA SUPERFICIAL DE Nps PLGA-LA6. CONDICIONES: PLGA 2,5 MG/ML: 4 mL DE ACETATO DE ETILO COMO FASE ORGÁNICA, 1 MG/ML DE LA6: 1ML COMO FASE ACUOSA INTERNA, 0.01% (P/V) POLOXAMER 407 Y 0.05% (P/V) DE POLIETILENIMINA COMO FASE ACUOSA EXTERNA. LA MEDIDA DE LA CARGA SUPERFICIAL. ....	64
<b>FIGURA 23.</b> ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE: A. LA1 B. LA2 C. LA3 D. LA4 E. LA5 F. LA6 FRENTE A <i>ESCHERICHIA COLI</i> O157:H7 POR MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO. TODOS LOS ENSAYOS SE REALIZARON POR TRIPLICADO A 595 NM Y SE MIDió LA DENSIDAD ÓPTICA (OD) DURANTE 8 HORAS. ....	69
<b>FIGURA 24.</b> ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE: A. LA1 B. LA2 C.LA3 D. LA4 E. LA5 F. LA6 FRENTE A <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> RESISTENTE A LA METICILINA POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN. TODOS LOS ENSAYOS SE REALIZARON POR TRIPLICADO A 595 NM Y SE MIDió LA DENSIDAD ÓPTICA (OD) DURANTE 8 HORAS.....	71
<b>FIGURA 25.</b> DIAGRAMAS DE RUEDA HELICOIDAL DE EDMUNSON: A. LA1, B. LA2, C. LA3, D. LA4, E. LA5, F. LA6. NARANJA: AMINOÁCIDO NO POLAR, VERDE: AMINOÁCIDO POLAR SIN CARGA, AZUL: AMINOÁCIDO BÁSICO, GRIS: AUSENCIA DE AMINOÁCIDO. ....	73
<b>FIGURA 26.</b> ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS Nps PLGA-LA6 FRENTE A: A. <i>ESCHERICHIA COLI</i> O157:H7, B. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> RESISTENTE A LA METICILINA POR MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO. TODOS LOS ENSAYOS SE REALIZARON POR TRIPLICADO A 595 NM Y SE MIDió LA DENSIDAD ÓPTICA (OD) DURANTE 8 HORAS. ....	75

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LF FRENTE A BACTERIAS. HLF: LACTOFERRINA HUMANA, BLF: LACTOFERRINA BOVINA, RHLF: LACTOFERRINA HUMANA RECOMBINANTE. (GONZÁLEZ-CHÁVEZ, ARÉVALO-GALLEGOS, & RASCÓN-CRUZ, 2009) .....	25
<b>TABLA 2.</b> MÉTODOS DE NANOENCAPSULACIÓN DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS. (DANHIER ET AL., 2012; KUMARI, YADAV, & YADAV, 2010; YADAV ET AL., 2011) .....	40
<b>TABLA 3.</b> PROPIEDADES EVALUADAS COMO HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS EN CAMP. ....	53
<b>TABLA 4.</b> TIEMPOS DE RETENCIÓN Y PORCENTAJE DE PUREZA DE LOS PAMs LA1, LA2, LA3, LA4, LA5 Y LA6 .....	54
<b>TABLA 5.</b> ION MOLECULAR $[M+H]^+$ DE LOS PAMs LA1, LA2, LA3, LA4, LA5 Y LA6. RELACIÓN MASA/CARGA: $m/z$ . PARTES POR MILLÓN (PPM) .....	55
<b>TABLA 6.</b> ESTRUCTURAS SECUNDARIAS (E2D) SIMULADAS EN CPH MODELS 3.2 DE LOS PAMs SINTETIZADOS.....	58
<b>TABLA 7.</b> TENDENCIA DE PRESENTAR ESTRUCTURA SECUNDARIA A-HÉLICE DE LOS PAMs SINTETIZADOS EVALUADOS POR EL PROGRAMA K2D3.....	61
<b>TABLA 8.</b> CARACTERÍSTICAS DE LAS NPS DE PLGA-LA6: TAMAÑO, MORFOLOGÍA Y CARGA. ND: NO SE DETERMINÓ. DS: DESVIACIÓN ESTÁNDAR. ....	62
<b>TABLA 9.</b> CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL 50 Y 90% DEL CRECIMIENTO BACTERIANO DE LOS PAMs LA1 A LA6 FRENTE A <i>ESCHERICHIA COLI</i> O157:H7. DS: DESVIACIÓN ESTÁNDAR.....	68
<b>TABLA 10.</b> CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL 50 Y 90% DEL CRECIMIENTO BACTERIANO DE LOS PAMs LA1 A LA6 FRENTE A <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> RESISTENTE A LA METICILINA. DS: DESVIACIÓN ESTÁNDAR. ....	72
<b>TABLA 11.</b> CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS DE LA6 Y NPS DE PLGA-LA6 FRENTE A <i>ESCHERICHIA COLI</i> O157:H7 Y <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> RESISTENTE A LA METICILINA. DS: DESVIACIÓN ESTÁNDAR .....	76

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO A.</b> GRUPOS PROTECTORES EMPLEADOS EN LA ESTRATEGIA FMOC/TBU. TODOS LOS AMINOÁCIDOS PRESENTE EL GRUPO F-MOC EN EL GRUPO AMINO TERMINAL.....	87
<b>ANEXO B.</b> CROMATOGRAMAS DE LOS PAMs SINTÉTICOS BASADOS EN LF: A. LA1, B. LA2, C. LA3, D. LA4, E) LA5 Y F) LA6. FASE ESTACIONARIA:.....	89
<b>ANEXO C.</b> SOPORTE SÓLIDO UTILIZADO EN LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA... 90	90
<b>ANEXO D.</b> AGENTE DE CONDENSACIÓN Y ADITIVOS EMPLEADOS EN LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA F-MOC.....	91
<b>ANEXO E.</b> TABLA DE L NÚMERO DE ACCESO DE LAS SECUENCIAS DE LACTOFERRINA CON IDENTIDAD POR ENCIMA DEL 90% DE LA BASE DE DATOS DE LA NCBI.....	92
<b>ANEXO F.</b> CROMATOGRAMAS Y CURVA DE CALIBRACIÓN DEL PAM LA6 POR RP-HPLC. 94	94
<b>ANEXO G.</b> ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE NPS DE PLGA EN AUSENCIA DE PÉPTIDO LA6 FRENTE A: A. <i>ESCHERICHIA COLI O157:H7</i> , B. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> RESISTENTE A LA METICILINA. ....	96
<b>ANEXO H.</b> ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE POLIETILENIMINA A DIFERENTES DILUCIONES FRENTE A: A. <i>ESCHERICHIA COLI O157:H7</i> , B. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> RESISTENTE A LA METICILINA. (CONCENTRACIÓN INICIAL DE POLIETILENIMINA: 0.05% P/V).....	97
<b>ANEXO I.</b> ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE POLOXAMER A DIFERENTES DILUCIONES FRENTE A: A. <i>ESCHERICHIA COLI O157:H7</i> , B. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> RESISTENTE A LA METICILINA. (CONCENTRACIÓN INICIAL DE POLOXAMER: 0.1% P/V).....	98

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>PAM</b>	Péptido Antimicrobiano
<b>DEPRAMs</b>	Diseño y predicción de péptidos antimicrobiano (Design and Prediction Antimicrobial Peptides)
<b>F-moc</b>	9-fluorometoxicarbonil
<b>MBH</b>	4-metilbencilhidrilamina
<b>Lf</b>	Lactoferrina
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>SARM</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
<b>RP-HPLC</b>	Cromatografía Líquida de alta eficiencia en fase reversa (Reverse Phase High performance liquid chromatography)
<b>CD</b>	Dicroísmo circular (Circular Dichroism) Espectrometría de Masas por Desorción/Ionización con Láser asistida por una matriz con detección de tiempo de vuelo (mass spectrometry Desorption/Ionization Matrix Assisted Laser detection by a time of flight)
<b>MALDI-ToF/ToF</b>	
<b>Nps</b>	Nanopartículas
<b>PLGA</b>	Ácido Poli-láctico co-glicólico
<b>PLA</b>	Ácido Poli- láctico
<b>A/O/A</b>	Emulsión acuosa/orgánica/acuosa
<b>BHI</b>	Infusión de cerebro y corazón ( Brain Heart Infusion)
<b>CMB</b>	Concentración mínima Bactericida
<b>CMI</b>	Concentración mínima Inhibitoria
<b>DLS</b>	Dispersión de luz Dinámica ( Dynamic Light scattering)
<b>DS</b>	Desviación Estándar
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>MH</b>	Müeller- Hinton
<b>%P/V</b>	Porcentaje Peso- volumen
<b>PEI</b>	Polietilenimina
<b>Pz</b>	Potencial Zeta
<b>rpm</b>	Revoluciones por minutos
<b>STEM</b>	Microscopía Electrónica de Barrido En modo de Transmisión (Scanning Transmission Electronic Microscope)
<b>DESD</b>	Doble emulsión- Difusión de solvente
<b>AcOEt</b>	Acetato de Etilo
<b>NCBI</b>	Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (National Center for Biotechnology Information)
<b>CHA</b>	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid)

## RESUMEN

**Título:** DESARROLLO DE NUEVOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS NANOESTRUCTURADOS BASADOS EN LACTOFERRINA CON POTENCIAL ANTIBIÓTICO FRENTE A *Escherichia coli* O157:H7 Y *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A LA METICILINA.

**Autor:** ALBA NELLY JOHANNA LÓPEZ RODRÍGUEZ

**Palabras Claves:** Lactoferrina, péptidos antimicrobianos, Nanopartículas de PLGA, bacterias patógenas.

**Descripción:** En este trabajo de investigación, usando herramientas bioinformáticas, se predijeron y diseñaron seis (6) péptidos sintéticos con potencial antimicrobiano basados en Lf. Los péptidos antimicrobianos diseñados se sintetizaron en Fase Sólida por la técnica de F-moc (Rink amida MBH), que incluyeron modificaciones sistemáticas en su estructura primaria y fueron denominados como LA1 a LA6, con predicción de sus propiedades fisicoquímicas.

Los péptidos se purificaron por Cromatografía Líquida de alta eficiencia en fase reversa, los cuales se obtuvieron con una pureza por encima del 90%, mostrando una estructura secundaria con perfil  $\alpha$ -hélice, de acuerdo con sus espectros de Dicroísmo Circular. La estructura primaria de los PAMs fue caracterizada por Espectrometría de Masas por Desorción/Ionización con Láser asistida por una matriz con detección de tiempo de vuelo.

Posteriormente, los péptidos sintéticos fueron evaluados frente a las cepas patógenas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Escherichia coli* O157:H7. En general, los PAMs demostraron propiedades inhibitorias frente a las bacterias patógenas. Los PAMs nombrados como LA2, LA3 y LA6 presentaron concentración mínima inhibitoria entre 50 y 100  $\mu$ M frente a SARM. Mientras que los PAMs designados como LA4, LA5, y LA6 fueron más efectivos frente a *Escherichia coli* O157:H7, con concentración mínima inhibitoria entre 25 y 100  $\mu$ M. Las actividades antibacteriana se realizaron por el método de microdilución en caldo, con un control positivo de las bacterias patógenas en ausencia de los PAMs. Así, el PAM LA6 por sus propiedades antimicrobianas fue funcionalizado con Nanopartículas (Nps) de PLGA mejorando dos veces su actividad antimicrobiana frente a SARM y *E. coli* O157:H7 respecto al péptido libre.

\*Proyecto de grado.

\*\*Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Rodrigo Torres Sáez

## ABSTRACT

**Title:** DEVELOPMENT OF NEWS SYNTHETICS PEPTIDES BASED NANOSTRUCTURED LACTOFERRIN WITH POTENTIAL ANTIBIOTIC AGAINST *Escherichia coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant.\*

**Author:** ALBA NELLY JOHANNA LÓPEZ RODRIGUEZ

**Keywords:** Lactoferrin, antimicrobial peptides, PLGA nanoparticles, pathogenic bacteria.

In this research work, using bioinformatics tools, six synthetic peptides with antimicrobial potential based on Lf were predicted and designed. Designed AMPs were synthesized by solid phase F-moc technique (link amide 4MBH) including systematic modifications in the primary structure and these were designated as LA1 to LA6, with prediction of their physicochemical properties.

PAMs were purified by PR-HPLC, obtaining peptides with purity above 90%, showing a secondary structure with  $\alpha$ -helix profile, according to their CD spectra. Primary structure of PAMs was characterized by mass spectrometry Desorption/Ionization Matrix Assisted Laser detection by a time of flight (MALDI-Tof).

Subsequently, synthetic peptides were tested against pathogenic strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Escherichia coli* O157:H7. In general, PAMs displayed inhibitory properties against pathogenic bacteria. PAMs named as LA2, LA3 and LA6 showed minimum inhibitory concentration (MIC) between 50 and 100  $\mu$ M against MRSA. While AMPs designated as LA4, LA5 and LA6 were more effective against *Escherichia coli* O157:H7, with minimum inhibitory concentration (MIC) between 25 and 100  $\mu$ M. Antibacterial activities were performed by the broth microdilution method using as positive control pathogenic bacteria in the absence of AMPs.

Thus, LA6 PAM, for their antimicrobial properties, was encapsulated in PLGA nanoparticles improving two fold their antimicrobial activity against MRSA and *E. coli* O157:H7 regarding to the free peptide.

\*Graduation project

\*\*Faculty of Science. School of Chemistry. Director: Rodrigo Torres Sáez.

## INTRODUCCIÓN

La necesidad de obtener nuevos compuestos antimicrobianos eficientes en el tratamiento de enfermedades infecciosas de alta prevalencia e infecciones sistémicas de difícil manejo terapéutico, ha generado un gran interés dentro de la comunidad científica.

En consecuencia, los péptidos antimicrobianos se han convertido en una alternativa importante que promete tener aplicaciones en el ámbito farmacéutico para el tratamiento de infecciones microbianas. Entre estos se destaca la lactoferrina (Lf) (Hancock & Sahl, 2006; Zhang, Rozek, & Hancock, 2001), una glicoproteína multifuncional que ha presentado propiedades antimicrobianas frente a un amplio rango de microorganismos (Zelezetsky & Tossi, 2006). Además, se considera una componente importante del sistema inmune innato que exhibe propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antibacterianas y antivirales, entre otras (Brouwer, Rahman, & Welling, 2011).

Por lo anterior, se han diseñado PAMs basados en Lf (Hocquellet et al., 2010), con posibles mejores características de actividad antimicrobiana respecto a la glicoproteína y un mecanismo de acción que induce a una menor resistencia microbiana en comparación con los antibióticos convencionales. Sin embargo, 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 cortos por proteólisis y rápida eliminación del torrente sanguíneo, lo cual requiere administración repetida que restringe en ocasiones su uso terapéutico. (Sohani & Gaikwad, 2013)

En este sentido, la encapsulación de péptidos en nanopartículas poliméricas se han planteado como una solución factible competente para la administración oral, propiedades de liberación específicas, biocompatibilidad con tejidos y células, que mejora la biodisponibilidad de las moléculas conservando la funcionalidad de los PAMs. (des Rieux, Fievez, Garinot, Schneider, & Prétat, 2006)

Por lo tanto, este trabajo de investigación se dirigió hacia la obtención de nuevos y mejores PAMs sintéticos basados en Lf. Los nuevos péptidos sintéticos fueron diseñados mediante técnicas bioinformáticas basadas en secuencias homólogas de Lf de diferentes proteínas, que se encuentran disponibles en la base de datos APD: "Collection Antimicrobial Peptides" (Camp). Posteriormente, se realizó su síntesis en fase sólida utilizando la metodología de F-moc en la modalidad de bolsas de té de polipropileno. Estos péptidos se purificaron y caracterizaron por PR-HPLC con una pureza entre el 90-98%, por espectrometría de masas desorción/ ionización asistida por láser con tiempo de vuelo y por Dicroísmo Circular.

Además, el péptido LA6, que exhibió la mejor actividad antibacteriana, fue encapsulado con nanopartículas poliméricas de ácido poli-láctico co-glicólico (PGLA) por el método de doble emulsión/difusión de solvente. El péptido nanoestructurado se caracterizó por microscopía electrónica de barrido en modo de transmisión (STEM), Dispersión de luz dinámica (DLS) y cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC).

Finalmente, los péptidos sintéticos y el péptido nanoestructurado fueron evaluados frente a las cepas patógenas de *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina.

## 1 MARCO CONCEPTUAL Y ANTECEDENTES

### 1.1 Péptidos antimicrobianos y mecanismo de acción.

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son biomoléculas efectoras del sistema inmune innato y son de gran interés por ser muy efectivos contra un amplio espectro de acción antimicrobiana (bacterias, hongos, virus). En general, los PAMs son relativamente pequeños (<30kDa), se caracterizan por su diversidad en la secuencia de aminoácidos (aa), presentan carga neta catiónica y estructura  $\alpha$ -hélice en su mayoría, y además una capacidad de plegamiento en conformaciones anfipáticas (Haney, Nazmi, Lau, Bolscher, & Vogel, 2009; van der Kraan et al., 2004). En contraste con la mayoría de antibióticos, que se dirigen por lo general a dianas específicas, los PAMs pueden actuar sobre las membranas bacterianas u otros tipos de dianas intracelulares. Además, los PAMs muestran un amplio espectro de actividad antimicrobiana, lo cual los hace eficaces contra bacterias *Gram*-positiva y *Gram*-negativa, hongos, virus, parásitos y algunos tipos de células cancerígenas.

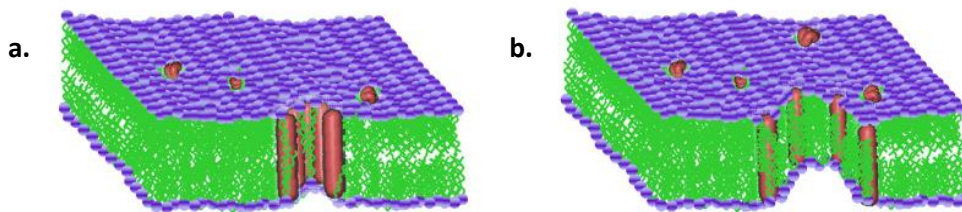
Aunque el número y diversidad de PAMs en la naturaleza es muy amplio (ver la base de datos de péptidos antimicrobianos: <http://aps.unmc.edu/AP/>), ya se conocen formas estructurales que son comunes por la mayoría de los PAMs. En general, los PAMs poseen longitudes de la secuencia peptídica de unos 30 aminoácidos y carga catiónica entre +2 y +9, que les permite una mejor interacción con la membrana celular de bacterias patógenas como *E. coli*. Ellos poseen un promedio de  $\geq 30\%$  de residuos hidrofóbicos en su conformación, de manera que adoptan estructuras anfipáticas en el ambiente. Estas propiedades le confieren una mejor solubilidad en ambientes acuosos e interacciones con las membranas lipídicas de los microorganismos con que interactúa, lo cual se refleja en su mecanismo de acción antimicrobiano (Hancock & Sahl, 2006; Zhang et al., 2001). Se han documentado diferentes estudios sobre la relación estructura-función de los PAMs (Hocquellet et al., 2010; Zelezetsky & Tossi, 2006) que dependen de las propiedades biofísicas tales como: estructura secundaria, carga total e hidrofobicidad, las cuales influyen en la interacción con membranas modelo y

células biológicas. Teniendo en cuenta esta información, se han propuesto cuatro modelos que explican el mecanismo de acción de los PAMs:

➤ **Modelo de ruptura por barril**

El mecanismo de ruptura por barril describe la formación de canales/poros transmembranales generados por paquetes de  $\alpha$ -hélice anfipáticas, de manera que las superficies hidrofóbicas interactúan con el núcleo lipídico de la membrana y las superficies hidrofílicas apuntan hacia adentro produciendo un poro acuoso. La formación de poros transmembranales implica la unión monomérica de péptidos a la membrana en forma helicoidal seguida por la inserción de las hélices dentro del núcleo hidrofóbico de la membrana formando un poro entre 1-2 nm de diámetro. La inserción progresiva de monómeros adicionales incrementa el tamaño del poro conduciendo a la pérdida del contenido celular, y de este modo, a la muerte celular, tal como se describe en la figura 1a. La formación del poro depende de la reorientación de las hélices del estado paralelo al estado perpendicular a lo largo de la membrana.

**Figura 1. Mecanismo de acción de los PAMs con el modelo de: a. bastón-barril. b. Poro toroide.** Los péptidos atraviesan la membrana y forman un poro alineado. (Engler et al., 2012)



**Fuente:** Engler et al, 20112

➤ **Modelo poro toroide**

Los péptidos antimicrobianos se insertan sobre la membrana e inducen monocapas de lípidos para curvarse continuamente a través del poro, de manera que el centro acuoso esté cubierto por ambos, los péptidos insertados y los grupos

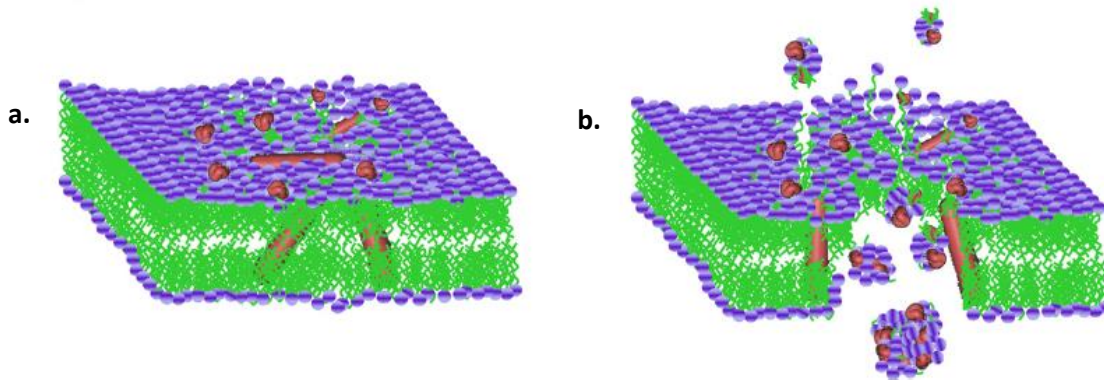
de cabeza de los lípidos. Este tipo de poro transmembranal es inducido por magaininas, protegrinas y melitina. En la formación de un poro toroide como se muestra en la figura 1b, las caras polares de los péptidos se asocian con los grupos de cabeza polares de los lípidos. Luego en estas aperturas los lípidos forman láminas normal y se conectan con las dos extensiones de la membrana hasta obtener una curva continua desde la parte superior a la parte inferior con forma de un agujero toroide con diámetro entre 3-10 nm; el poro está revestido tanto por los péptidos como de los grupos de cabeza de los lípidos, que tienden a apantallar y enmascarar las cargas de los péptidos catiónicos.(Engler et al., 2012)

➤ **Modelo de capa**

En este modelo, los péptidos están en contacto con la cabeza de los fosfolípidos en la zona externa de la membrana y afectan su permeabilidad. Los péptidos se enlazan primero a la superficie de la membrana y la cubren a manera de capa. En este modelo, los péptidos no son insertados dentro del núcleo hidrofóbico de la membrana ni se ensamblan con las superficies hidrofílicas una frente a la otra.

Los siguientes son los mecanismos por etapas implicados en el modelo capa: (1) unión preferencial de los péptidos a la cabeza de los fosfolípidos, (2) alineación de monómeros de los péptidos en la superficie de la membrana, de tal manera que la superficie hidrofílica se enfrenta a la cabeza de los fosfolípidos o a moléculas de agua, ocasionando la reorientación de los residuos hidrofílicos hacia el núcleo hidrofóbico de la membrana. (3) desintegración de la membrana debido a que el péptido altera la curvatura de la bicapa, tal como se describe en la Figura 2a.(J Cruz, Ortiz, Guzmán, Fernández-Lafuente, & Torres, 2014; Oren, 1999; Vila-Farrés, Giralt, & Vila, 2012)

**Figura 2. Mecanismo de acción de los PAMs con el modelo de: a. capa. b. Canal agregado.** Los péptidos se alinean paralelamente a la superficie de la membrana y forman una capa.(Engler et al., 2012)



**Fuente:** Engler et al, 20112

➤ **Modelo de canal agregado :**

Recientemente, muchos estudios han proporcionado pruebas de mecanismos adicionales consistentes, en los cuales se destacan que no solo incrementar la permeabilidad de la membrana es suficiente para causar la muerte celular. De acuerdo con esto, el modelo de canal agregado o también conocido como “detergente” por su acción similar, induce un colapso masivo de la integridad de la membrana. Nanoestructuras antimicrobianas autoensambladas tienden a inducir “defectos superficiales” grandes que resultan en la desintegración de la membrana, debido a las interacciones electrostáticas fuertes entre nanopartículas y células microbianas, y una gran masa de cada nanopartícula perturba la integridad de la pared bacteriana.

La acción inicial del péptido involucra una concentración crítica micelar para que ocurra la agregación, donde se forman canales de agregación para el escape de iones y moléculas pequeñas, y así los PAMs puedan atravesar la membrana. Estos péptidos han demostrado que causan una perturbación para formar dominios específicos péptido-lípido en la membrana con una fase de segregación lateral zwitteriónica de fosfolípidos aniónicos y luego la formación de una fase de lípido no laminar. (Bond, Parton, Clark, & Sansom, 2008)

## **Interacción de los PAMs con dianas intracelulares**

Existe evidencia que indica que los PAMs pueden interactuar con dianas intracelulares. (Brown & Hancock, 2006) Los PAMs pueden unirse al ADN, ARN y proteínas, así como participar en los procesos que causan inhibición en el proceso de síntesis de la pared celular y síntesis de proteínas, e interferir con la filamentación de citocinesis de la célula bacteriana *in vitro* e *in vivo*. Los PAMs han desarrollado mecanismos únicos para la translocación al citoplasma, con el fin de alterar la formación de la membrana citoplasmática mediante la inhibición de la síntesis de la pared celular, síntesis de ácidos nucleicos, síntesis de proteínas o actividad enzimática. (Vila-Farrés et al., 2012)

Existen dos mecanismos diferentes que permiten a los PAMs ingresar al interior de las bacterias; el primer mecanismo ha sido completamente desconocido, es la translocación espontánea de PAMs a través de la membrana. El otro mecanismo es basado en la permeabilización de la membrana y se clasifica principalmente en dos grupos dependiendo de la estructura del PAM. Los dos mecanismos propuestos son uno para alfa- hélice y otro para beta-plegado. El primer mecanismo, también conocido como el modelo Shai-Matusaki-Huang, se basa en la unión del PAM en paralelo a lo largo de la membrana.

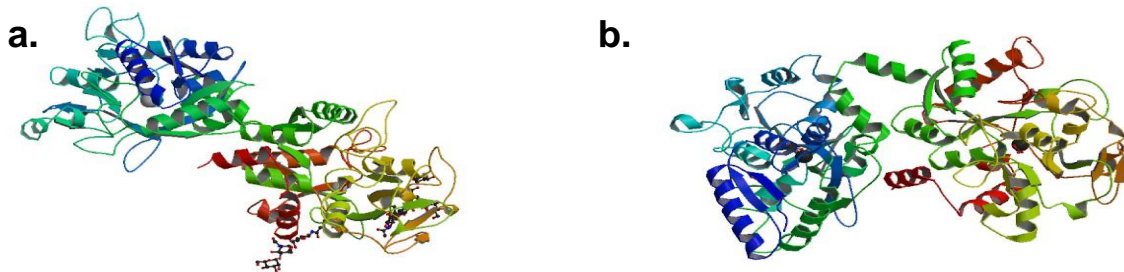
La parte apolar del PAM se dispone hacia la membrana, y por lo tanto, una parte del PAM logra penetrarla. El siguiente paso, es el cambio de algunos PAMs de una forma transversal a paralela para formar algunos poros toroidales. Este mecanismo actúa de la misma manera como se propuso anteriormente para el modelo de poro toroide, pero solo como un estado de transitorio sin que se produzca una completa permeabilización de la membrana. Es necesario destacar la importancia que la relación entre membrana lipídica – péptido sea alta, lo que probablemente provoca una perturbación de la membrana, según el modelo agregado, por el contrario si ocurre una relación baja membrana lipídica – péptido, los PAMs entrarán fácilmente a la bacteria.

Las dianas intracelulares para los PAMs son algunos procesos intracelulares que pueden resultar en la muerte celular, como la transcripción de ADN o el plegamiento de proteínas.(Vila-Farrés et al., 2012)

## 1.2 Lactoferrina y su potencial antimicrobiano

La Lactoferrina (Lf), también conocida como Lactotransferrina, es una glicoproteína monomérica no hémica de unión al hierro de 80 KDa perteneciente a la familia de las Transferrinas (Mishra et al., 2013) y producida por diversas especies de animales mamíferos.

**Figura 3.** Lactoferrina: a. bovina (origen *Bos taurus*: P24627), b. Humana (origen *Homo sapiens*: P02788).



**Fuente:** Protein Data Bank NCBI.

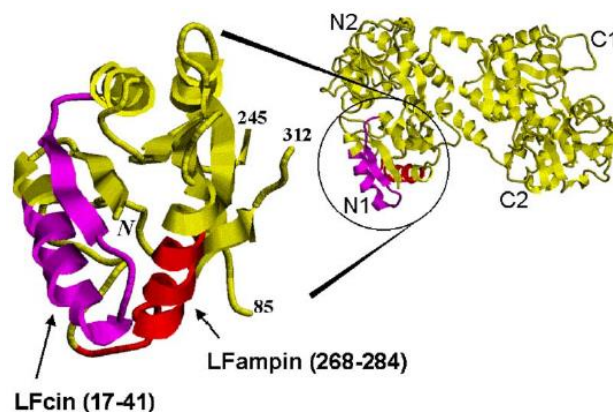
La Lf presenta dos regiones conocidas como lóbulos terminal N y C que, a su vez, están organizados en dos dominios: N1 y N2, C1 y C2. En cada lóbulo N2 y C2 reside un lugar donde el ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) se une sinérgicamente con el ion carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ). Por su capacidad de unir  $\text{Fe}^{3+}$  reversiblemente, la Lf puede existir como holo Lf (asociada a  $\text{Fe}^{3+}$ ) o apo Lf (libre de  $\text{Fe}^{3+}$ ). La Lf es una molécula fuertemente catiónica con un punto isoeléctrico entre 8.5-9.0. A diferencia de la Transferrina serina que empieza a liberar iones  $\text{Fe}^{3+}$  a pH 6, la Lf es capaz de retenerlos a valores de pH tan bajos como 3.5-4.0 (Serrano, 2006).

En la actualidad se han aislado, de los dominios tanto de la Lactoferrina bovina como de la humana, PAMs que ejercen mayor efecto antimicrobiano, como Lactoferrincina (Lfcina 17-30) y Lactoferrampina (LFampina) 265-284.(Haney, Lau, & Vogel, 2007). Los PAMs derivados de la Lf presentan mayor efectividad sobre cepas como *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 y *E. coli* O111, que son resistentes a antibióticos.

La LFcina 17-30 se obtuvo de la hidrólisis del dominio N de la Lf bovina con la enzima pepsina, que además de presentar actividad bactericida, se le atribuye capacidad de bloquear la adherencia bacteriana y de inhibir la invasión celular de bacterias patógenas intracelulares como *Yersinia pseudotuberculosis* y *Listeria monocytogenes*. (Haney et al., 2009)

Por su parte, LFampina 268-284 un péptido antibacteriano del dominio N1 de la Lactoferrina Bovina, se comprobó que tiene actividad antibacteriana contra cepas de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, y antifúngico contra *Candida albicans*.

**Figura 4.** Diagrama de la cinta de la N1-dominio de la Lf bovina. La figura se construyó utilizando gráfico Molecular RasWin (Protein Data Bank código acceso 1BLF).(van der Kraan et al., 2004).



**Fuente:** Van der Kraan et al, 2004

La actividad bacteriostática e inhibición se ha demostrado en diferentes bacterias como muestra la tabla 1.

La Lf *in vitro* e *in vivo* exhibe adherencia celular a bacterias causantes de diarrea como *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* HB101, *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *Listeria monocytogenes* y especies de *Shigella*. También exhibe actividad enzimática de serina-proteasa sobre diversos sustratos, que al parecer presentan su sitio activo en el dominio N. (Serrano, 2006)

**Tabla 1.** Evaluación de la actividad de Lf frente a Bacterias. hLF: Lactoferrina humana, bLF: Lactoferrina bovina, rhLF: Lactoferrina humana recombinante. (González-Chávez, Arévalo-Gallegos, & Rascón-Cruz, 2009)

<b>Bacteria</b>	<b>Estudio modelo</b>	<b>Agente administrado</b>
<b>Gram- positive</b>		
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>In vitro</i>	hLF
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>In vitro</i>	hLF
<i>Clostridium sp</i>	<i>In vitro</i>	hLF y bLF
<i>Haemophilus influenza</i>	<i>In vivo</i>	bLF
<b>Gram- negativa</b>		
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>In vivo</i>	hLF
<i>Micrococcus sp</i>	<i>In vitro</i>	hLF y bLF
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>In vivo</i>	bLF
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>In vitro</i>	hLF

<b>Gram- negativa</b>		
<b><i>Chlamydomphilia psittact</i></b>	<i>In vitro</i>	hLF y bLF
<b><i>Escherichia coli enteropat6gena</i></b>	<i>In vitro</i>	hLF
<b><i>Escherichia coli enteroagregativa</i></b>	<i>In vitro</i>	hLF
<b><i>E. coli adherente difusa</i></b>	<i>In vitro</i>	hLF
<b><i>Helicobacter felis</i></b>	<i>In vitro</i>	rhLF
<b><i>Helicobacter pylori</i></b>	<i>In vitro</i>	bLF
<b><i>Legionella pneumophila</i></b>	<i>In vitro</i>	bLF
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	<i>In vitro</i>	hLF
<b><i>Shigella spp</i></b>	<i>In vitro</i>	hLF
<b><i>Vibrio cholerae</i></b>	<i>In vitro</i>	hLF

**Fuente:** Gonz1lez-Ch1vez, Ar1valo Gallegos & Rasc3n-Cruz. 2009

### 1.3 Sntesis de P1ptidos en Fase S3lida (SPFS)

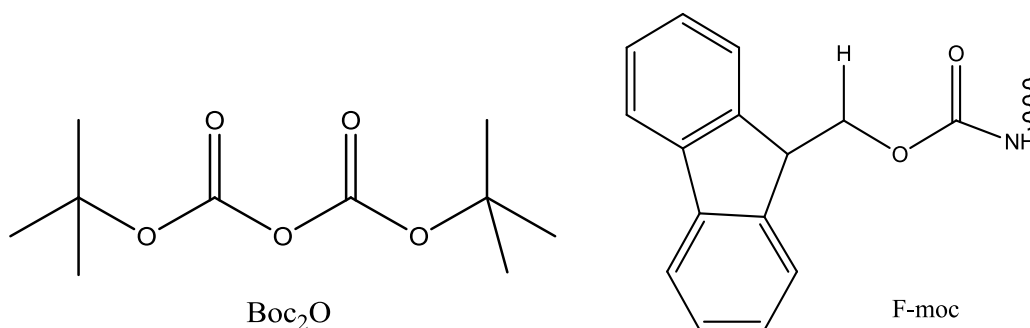
La SPFS fue descrita por primera vez por Merrifield (Oesterlin, 1963), y modificada posteriormente por Sheppard (Therton, Sheppard, 1990). En la actualidad es la metodologfa m1s aplicada para obtener p1ptidos sint1ticos. Este m1todo se basa en la uni3n del amino1cido carboxi-terminal (C-terminal) a un soporte insoluble y su posterior elongaci3n secuencial, amino1cido tras amino1cido, de la cadena peptfdica en forma cfclica. Presenta ventajas respecto a la sntesis de p1ptidos en soluci3n, como mayores rendimientos, lavados de mayor eficiencia y un filtrado sencillo de los p1ptidos con una opci3n de automatizaci3n del proceso de sntesis.

La formaci3n de enlace p1ptido de la resina peptfdica se lleva a cabo siempre por el extremo carboxilo mediante la adici3n sucesiva de los amino1cidos que tienen el extremo  $\alpha$ -amino protegido y las cadenas laterales de los amino1cidos convenientemente protegidos tambi1n.

Existen dos estrategias distintas para la síntesis de péptidos en fase sólida: la estrategia *tert*-butoxicarbonil /Benzil (Boc/Bzl) (Oesterlin, 1963) y la estrategia 9-fluorometoxicarbonil/*tert*-butil (F-moc/tBu) (Fields, Noble 1990). Boc/Bzl utiliza el grupo Boc como protector de los grupos  $\alpha$ -amino terminal y grupos Bzl como protector de las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales. Fmoc/tBu emplea el grupo F-moc como protector temporal del grupo  $\alpha$ -amino terminal y grupos del tipo tBu para proteger las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales (Ver figura 5).

La cadena peptídica se sintetiza sobre un soporte polimérico insoluble o resina por la unión del aminoácido C-terminal o un conector al que se le unirá el primer aminoácido. El crecimiento de la resina peptídica se lleva a cabo desde el extremo carboxilo terminal hacia el extremo del amino terminal de la secuencia de aminoácidos del péptido diseñado.

**Figura 5.** Grupos protectores Boc y F -moc.

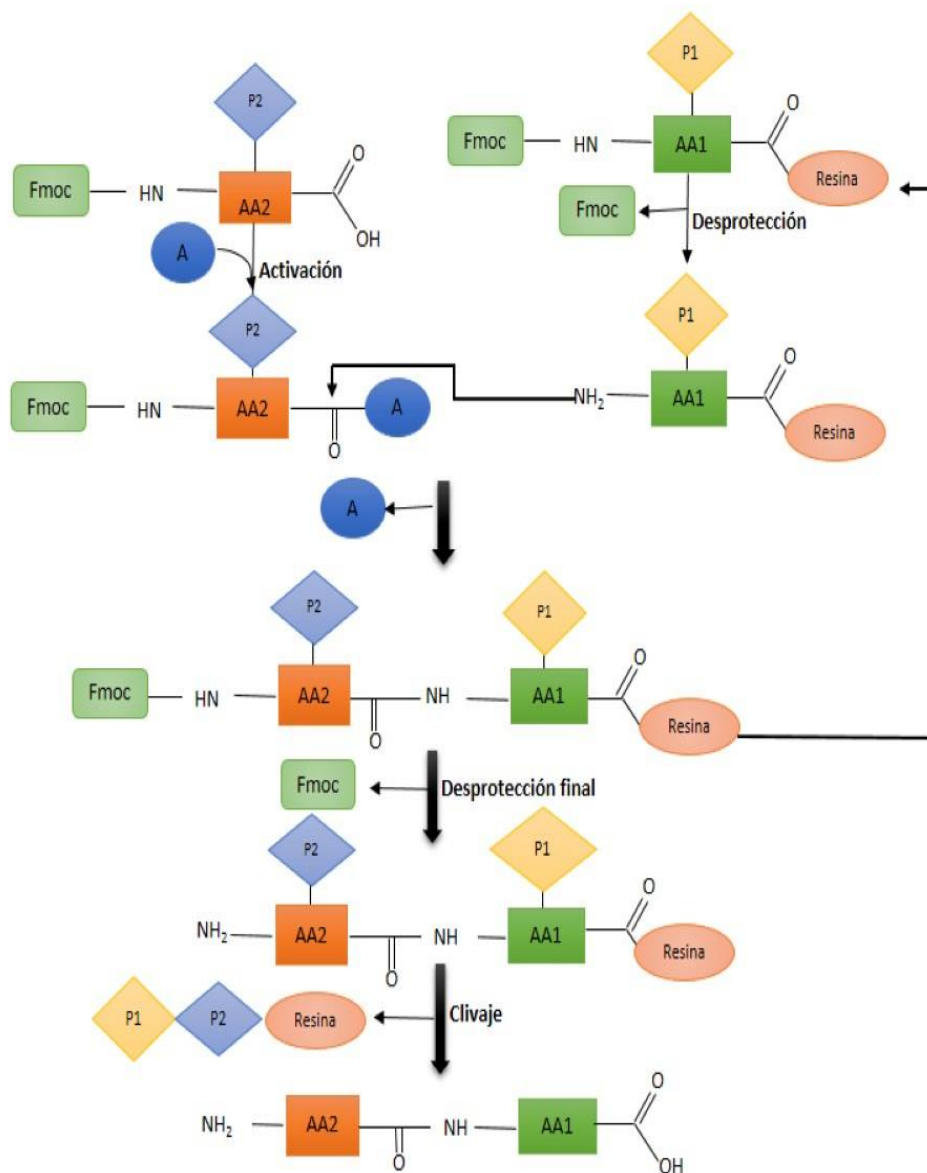


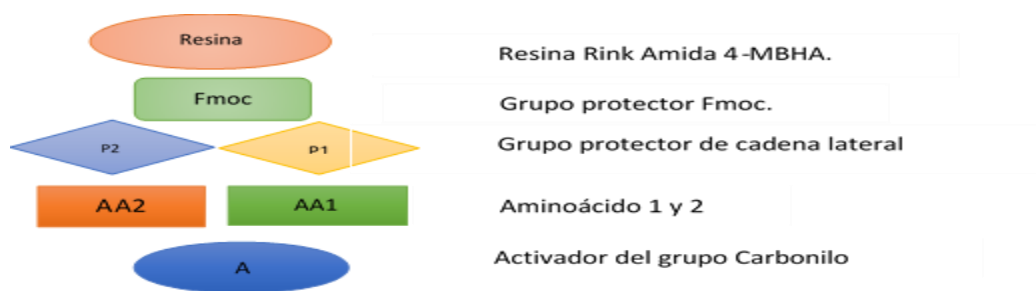
**Fuente:** Fields, Noble, 1990.

El grupo protector  $\alpha$ -amino se elimina antes de la unión del siguiente aminoácido. La eliminación del grupo protector Boc se realiza en medio ácido, mientras que la eliminación del grupo F-moc se realiza en medio básico, habitualmente con solución de piperidina. Una vez el grupo amino se encuentra libre, se enlaza al siguiente aminoácido previamente activado, formando el enlace peptídico. El proceso de acoplamiento requiere la activación del grupo carboxilo del aminoácido siguiente, de modo que la reacción de condensación ocurra en el menor tiempo que minimice la racemización y aumente la susceptibilidad del

acople con el grupo amino de la cadena de péptido en formación. Este proceso de desprotección y acoplamiento es consecutivo y cíclico hasta alcanzar la secuencia del péptido diseñado. Una vez sintetizada la cadena peptídica, ésta se separa del soporte polimérico y se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos, habitualmente en una única etapa (Figura 6).

**Figura 6.** Esquema de la metodología de la síntesis de péptidos en fase sólida Fmoc.





Fuente: Autor

### 1.3.1 Soporte sólido

En los últimos años se ha desarrollado un gran número de matrices poliméricas o resinas para la síntesis de péptidos en fase sólida. El soporte polimérico o resina debe ser inerte en las condiciones empleadas durante la síntesis, estable mecánicamente e insoluble en los disolventes empleados.

Las resinas en proceso de síntesis incrementan el área superficial de contacto con los disolventes, lo cual es importante para el desarrollo eficiente de la síntesis. Además, deben estar convenientemente funcionalizadas para poder unir el aminoácido o el conector. Los soportes sólidos más comunes son: 4-metilbencilhidrilamina (MBHA), 4-hidroximetilfenilacetamidometil (PAM), resinas funcionalizadas con hidroximetil usadas para *t*-Boc/Bzl y 4-(2',4'- dimetoxifenil-aminofenil) fenoximetilpoliestireno (Rink) para Fmoc/*t*Bu. (Guy & Fields, 1997)

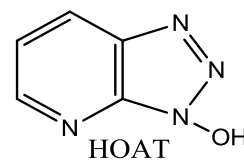
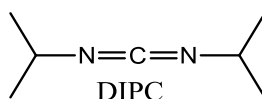
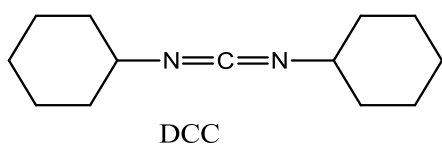
### 1.3.2 Reactivos de acoplamiento

Para que la formación del enlace peptídico sea eficiente y se minimicen los procesos de racemización, es necesaria una buena activación del grupo carboxilo del aminoácido a acoplar. Las carbodiimidas son los reactivos de acoplamiento más utilizados en la síntesis de péptidos. La N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) fue el primer reactivo descrito para el acoplamiento, siendo hasta el día de hoy la más utilizada. Además, es particularmente apropiada para trabajar en ambientes apolares como los originados por las resinas de poliestireno. Otra de las carbodiimidas más utilizadas es la N,N-diisopropilcarbodiimida (DIPC), la cual es

mucho mejor que la anterior debido a su alta solubilidad. Cuando se emplean las carbodiimidas como agentes de condensación se recomienda la utilización de aditivos como el 1-hidroxi 7- azabenzotriazol (HOAT), que aceleran la reacción y reducen el riesgo de racemización (Figura 7) (Konig et al, 1970)

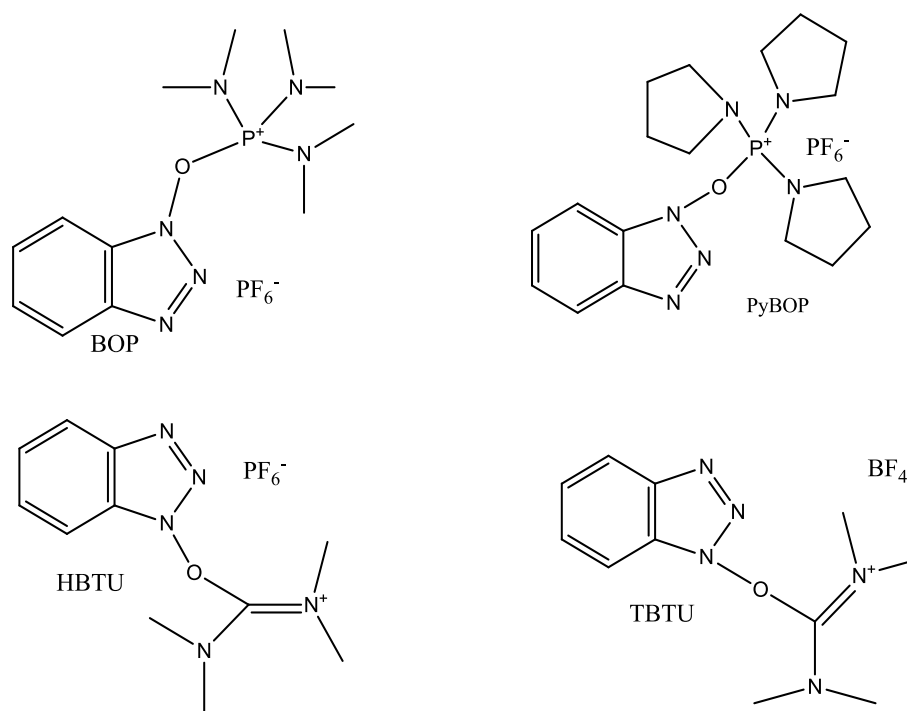
Otros reactivos de acoplamiento son las sales de fosfonio y uranio, las cuales, en presencia de una base (DIPEA), pueden convertir el carboxilato del aminoácido protegido en una especie activada. Las sales de fosfonio más empleadas son el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi tris-(dimetilamino) fosfonio (BOP) y el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris-(pirrolidino) fosfonio (PyBOP), derivadas del HOAT. Entre las sales de uranio, se encuentran el Tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU) entre las más comunes (Figura 8).(Guzman, Barberis, & Illanes, 2007)

**Figura 7.** Estructura de las carbodiimidas y aditivos utilizados en la síntesis de péptidos en fase sólida.



Fuente: Konig et al, 1970

**Figura 8.** Estructura de algunas sales de fosfonio (BOP y PyBOP) y sales de uronio (HBTU y TBTU) utilizadas como agente de acoplamiento.



**Fuente:** Guzman, Barberis, & Illanes, 2007

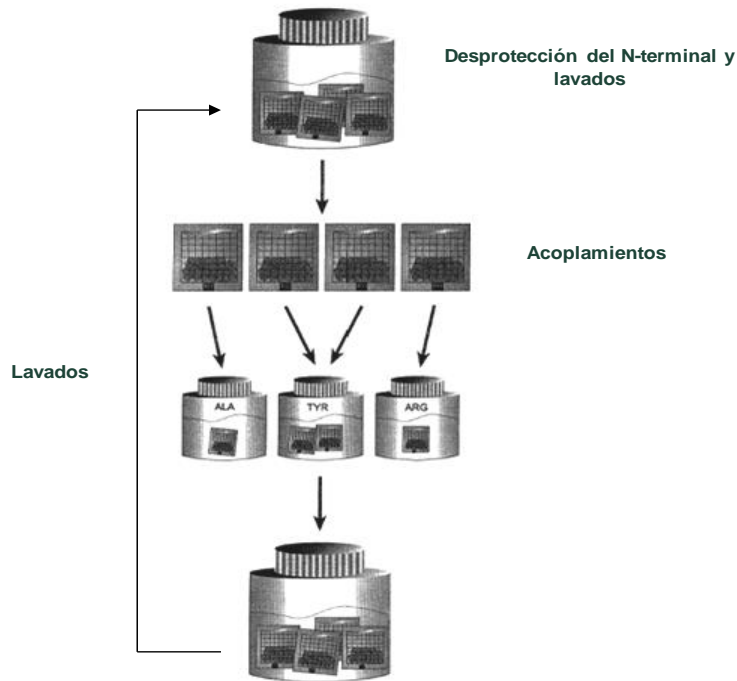
### 1.3.3 Síntesis múltiple de péptidos

Entre las técnicas más empleadas para la síntesis múltiple de péptidos se encuentra la síntesis simultánea en fase sólida F-moc en bolsas de polipropileno, la cual fue desarrollada por Richard A. Houghten (Houghten, 1985) y se conoce popularmente como síntesis en bolsas de té. Esta técnica consiste en colocar dentro de las bolsas una resina que usualmente es 4-MBHA. Cada bolsa es etiquetada para identificar el péptido que se va a sintetizar dentro de ella. Las etapas de desprotección y los lavados se realizan en un mismo recipiente con todas las bolsas juntas. Para el acoplamiento, cada bolsa se separa y adiciona el aminoácido respectivo, y así sucesivamente hasta completar la secuencia (figura 9).

Una vez finalizada la síntesis de la secuencia diseñada, se realizan la desprotección de los grupos de las cadenas laterales y el clivaje de la resina en

una misma etapa con la bolsa que contiene cada péptido con su respectivo etiquetado.

**Figura 9.** Síntesis Múltiple de péptidos en fase sólida por la metodología en bolsas de té



**Fuente:** Houghten, 1985

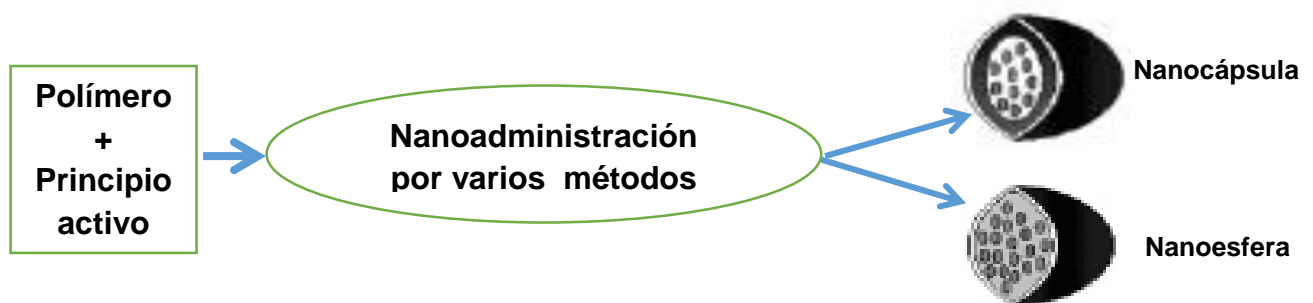
#### 1.4 Nanoencapsulación de PAMs y Nanopartículas poliméricas.

Las proteínas y otras biomoléculas como anticuerpos, antígenos, factores de crecimiento, y péptidos bioactivos son reconocidos por sus aplicaciones terapéuticas en diversas enfermedades. Estas proteínas y péptidos terapéuticos tienen potencial para el desarrollo de nanoproteínas y nanopéptidos terapéuticos por su dimensión a nanoescala, alta actividad específica terapéutica, y otras numerosas actividades enzimáticas específicas. Una variedad de sistemas de nanopartículas como: liposomas, nanopartículas de lípido sólido y microesferas/Nanopartículas poliméricas, etc. están siendo utilizadas para la

nanoencapsulación de proteínas y péptidos con el fin de mejorar la acumulación y biodisponibilidad del fármaco al interior de las células blancas debido a la eficiencia y facilidad de la internalización.

Las Nanopartículas (Nps) poliméricas pueden ser definidas como partículas sólidas coloidales que contienen la sustancia activa para formar nanocompuestos y de acuerdo con su organización estructural se clasifican como *nanocápsulas* o *nanovesículas* y *nanoesferas*. En general, las nanopartículas poliméricas biodegradables presentan una matriz que puede contener el principio activo en su interior o en su superficie como se presenta en la figura 10, donde nanoesferas se definen como sistemas nanoparticulados de carácter matricial por dispersión del principio activo, y nanocápsulas se define como nanosistemas vesiculares que presentan una cavidad interior que contiene el principio activo. (Yadav, Kumari, & Yadav, 2011).

**Figura 10.** Representación gráfica de los tipos de nanopartículas poliméricas.



**Fuente:** Yadav, Kumari & Yadav, 2011

La ventaja principal de un sistema polimérico para sistemas de liberación de péptidos y proteínas son el control y la focalización del fármaco, distribución corporal modificada y mejora de la captación celular. El nanovehículo polimérico es biodegradable, no antigénico, relativamente fácil de preparar y permite un control total sobre la distribución de tamaño. Los materiales poliméricos utilizados para la formulación incluyen polímeros sintéticos y naturales. (Yadav et al., 2011)

### **1.4.1 Polímeros naturales**

Los polímeros naturales como el quitosano y la gelatina son utilizados en campo de nanoencapsulación de péptidos y proteínas. El quitosano es el polisacárido más abundante en la naturaleza que presenta baja toxicidad y alta susceptibilidad para biodegradación, propiedades mucoadhesivas y capacidad para mejorar la permeabilidad/absorción del fármaco proteico a sitios de la mucosa; sin embargo, su baja solubilidad a pH 6 es uno de sus principales desventajas junto con la pérdida de la capacidad de permeabilidad y absorción del fármaco a pH fisiológico, por tanto, se puede utilizar para mejorar la permeabilidad y la absorción de una variedad de fármacos peptídicos en condiciones neutra y pH básico.

Por otro lado, la gelatina se presenta como un polímero natural que tiene una amplia aplicación en la industria de alimentos y formulaciones médicas. Es un nanomaterial de origen natural que se utiliza para la liberación controlada de péptidos terapéuticos debido a su naturaleza biodegradable y no tóxica. Esta contiene ambos grupos catiónicos y aniónicos con funcionalidad hidrofílica, y debido a ello se le otorga su uso frecuente en la encapsulación de péptidos ácidos y básicos.

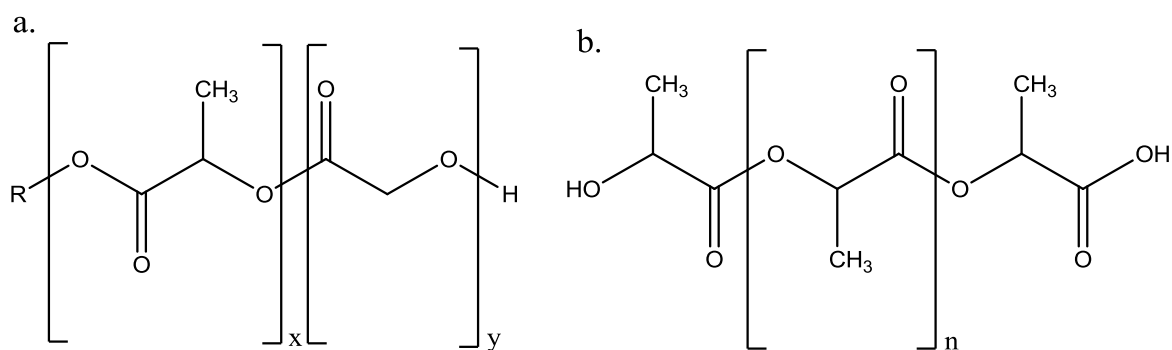
La insulina ha sido exitosamente administrada en nanopartículas de quitosano, donde las NPs de quitosano cargadas de insulina demostraron un mayor efecto en los niveles de insulina en comparación con la insulina administrada oralmente para hipoglucemia e insulinemia. (Sohani & Gaikwad, 2013)

### **1.4.2 Polímeros sintéticos**

Los polímeros sintéticos pueden extender la liberación del fármaco en períodos de días a varias semanas. Algunos de los polímeros sintéticos biodegradables y biocompatibles, como ácido poli-láctico co-D,L-glicólico (PLGA), ácido poli-láctico (PLA) y  $\epsilon$ -policaprolactona (PLC) son utilizados para encapsular fármacos de proteínas. Las nanopartículas de PLGA y PLA son unos de los nanosistemas más

exitosos utilizados para el desarrollo de nanomedicinas basadas en proteínas y demuestran ser biodegradables en la naturaleza. Estos sufren hidrólisis en el cuerpo para producir los monómeros metabolitos biodegradables, como el ácido láctico y ácido glicólico.

**Figura 11. Estructura de: a. Ácido poli-láctico co- glicólico** (x: número de unidades de ácido láctico, y: número de unidades de ácido glicólico) **b. Ácido poli-láctico** (n: número de cadenas).(Makadia & Siegel, 2011)



**Fuente:** Makadia & Siegel, 2011.

Dado que los dos monómeros son eficazmente degradados por nuestro organismo, presentan una mínima toxicidad sistémica. Además, el PLGA presenta excelentes propiedades físico-mecánicas que se pueden variar de acuerdo con su relación de monómeros, por ejemplo, a una relación de monómeros 50:50, este polímero sintético exhibe el perfil de degradación más rápido. Su aprobación por FDA incrementó su uso en el campo de nanomedicinas para péptidos y proteínas.(Danhier et al., 2012)

La insulina y calcitonina, una proteína y un péptido, respectivamente, son ejemplos que han demostrado un excelente efecto del proceso de encapsulación en nanopartículas de polímeros sintéticos que lograron respuesta biológica a largo plazo después de la administración de las nanopartículas.

### 1.4.3 Métodos de encapsulación de proteínas y péptidos

La encapsulación de las proteínas y péptidos a nanoescala es la primera etapa hacia el desarrollo de nanomedicinas de péptidos terapéuticos. La nanoencapsulación adecuada y específica del péptido y proteína se puede lograr mediante una metodología adecuada de nanoencapsulación.

**Figura 12.** Métodos de nanoencapsulación de péptidos.



**Fuente:** Autor.

Varios métodos son viables para la adsorción o encapsulación de proteínas y péptidos sobre nanovehículos incluyendo polimerización emulsión, polimerización interfacial, evaporación de solvente, precipitación por sales, coacervación, combinación de sonicación, tecnología capa por capa, difusión de solvente/desplazamiento de solvente, y gelación ionotrópica, entre otras. (Sohani & Gaikwad, 2013)

La selección de un método para la encapsulación de péptidos y proteínas está basada en sus propiedades fisicoquímicas y estructurales como: tamaño, carga y porcentaje de encapsulación. Cada una de las proteínas y péptidos requieren una etapa específica de condiciones para su estabilización, solubilización, y liberación controlada. Entre los métodos de encapsulación de proteína y péptidos más destacados se encuentran:

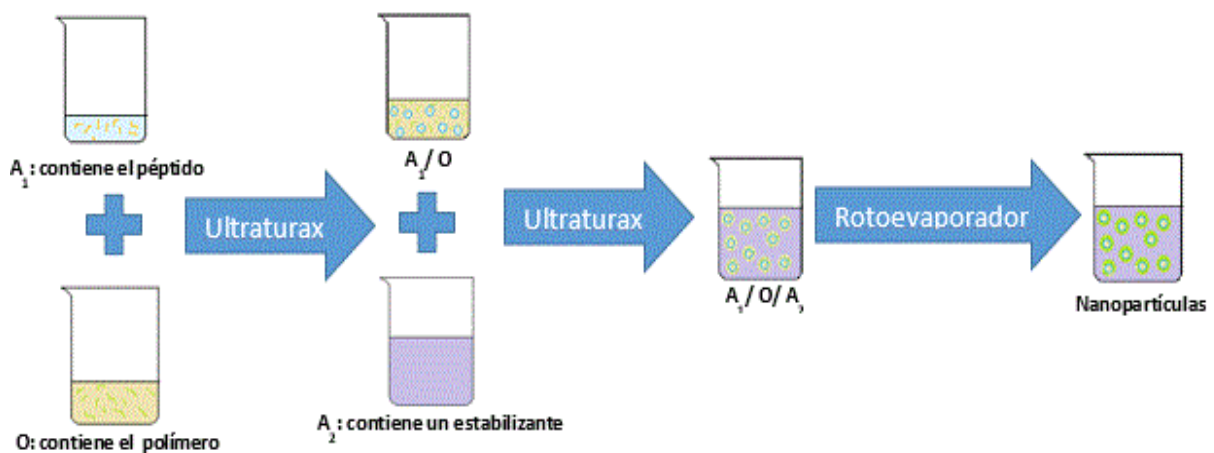
1. Polimerización-Emulsificación: este método es basado en el uso de fase continua acuosa u orgánica. En la fase continua acuosa, los fármacos de proteínas y los polímeros son disueltos en un solvente acuoso sin surfactante o emulsificador mediante el uso del mecanismo de polimerización aniónico con radiación de alta energía. En la fase continua orgánica, los polímeros son disueltos en disolventes orgánicos por surfactantes vía dispersión en disolventes.
2. Evaporación de solvente: en este método los polímeros junto con las proteínas son disueltas en solventes orgánicos volátiles (DCM, acetona,  $\text{CHCl}_3$ , 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.
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 de una solución acuosa mediante adición de cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc. 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.
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.

5. Coacervación: es un proceso 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-electrolito 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 grande 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.
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. (Danhier et al., 2012)

Finalmente, se han propuesto combinaciones de las técnicas anteriormente mencionadas, las que buscan mejorar las propiedades de superficie, eficiencia de encapsulamiento, conservar la funcionalidad del principio activo, entre otras, y que se ven reflejados en su aplicación. Así, Cohen y col. (Cohen-Sela, Chorny, Koroukhov, Danenberg, & Golomb, 2009a) desarrollaron la técnica de doble emulsión/ difusión de solvente para moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular. Esta consiste en combinar un sistema de doble emulsión de la técnica de evaporación de solvente/doble emulsión con un solvente orgánico parcialmente soluble en agua, como el acetato de etilo que es menos tóxico que el diclorometano (DCM). Con el uso de la técnica de doble emulsión/difusión de solvente se podría alcanzar un mejor porcentaje de encapsulación para este tipo de moléculas en nanopartículas poliméricas sintéticas de tamaño nanométrico. Y además sugiere el uso de surfactantes más biocompatibles (Ej. poloxamer 407).

**Figura 13.** Representación esquemática del método de Doble emulsión – Difusión de solvente



**Fuente:** Autor.

En la tabla 2, se resumen algunos péptidos y proteínas encapsuladas en diferente nanopartículas y por diferentes métodos de encapsulación.

**Tabla 2.** Métodos de nanoencapsulación de proteínas y péptidos. (Danhier et al., 2012; Kumari, Yadav, & Yadav, 2010; Yadav et al., 2011)

<b>Proteína y péptido</b>	<b>Material de nanovehículo</b>	<b>Método de encapsulación</b>
Suero de albumina bovina	Gelatina	Emulsión
Insulina	Polimetilmetacrilato	Emulsión
hGF2	PLA	Doble emulsión
Ganciclovir	Albumina	Coacervación
		Doble emulsión-
Triptorelin		evaporación de solvente
Insulina		Evaporación de solvente
Insulina		Agua/aceite/sólido
Toxoide Tetánico	PLGA	Evaporación de solvente
ADN		Evaporación de solvente
Lisozima		Multi- emulsión

**Fuente:** Danhier et al., 2012; Kumari, Yadav, & Yadav, 2010; Yadav et al., 2011

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

Diseñar y sintetizar péptidos nanoestructurados basados en Lactoferrina con efecto antimicrobiano frente a bacterias patógenas de *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM).

### 2.2 Objetivo específicos

- Diseñar nuevos péptidos análogos de Lf mediante técnicas de bioinformática.
- Sintetizar secuencias peptídicas en fase sólida basadas en Lactoferrina con posible actividad antimicrobiana.
- Estandarizar la encapsulación en nanopartículas poliméricas de ácido poliláctico co-glicólico (PLGA) de un péptido basado en Lactoferrina con la mayor actividad antimicrobiana.
- Determinar las propiedades físico-químicas de los péptidos sintéticos basados en Lf y los encapsulados en nanopartículas de PLGA, usando técnicas espectrofluorimétricas, ópticas y de potencial Zeta.
- Determinar y comparar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los péptidos sintéticos basados en Lactoferrina libre y encapsulados contra cepas infectivas de *Escherichia Coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM)

### 3 METODOLOGÍA

#### 3.1 Materiales

Los Fmoc-L-aminoácidos fueron adquiridos por GL BioChempep (Shanghai) Ltd, la resina Rink amida 4MBHA fue obtenida de Merck Novabiochem, los medios de cultivos líquidos y sólidos de Luria Bertani, Müeller Hinton e Infusión cerebro corazón fueron adquiridos de Merck. *E. coli* O157:H7 fue donada por el cepario de la Universidad Pontificia Javeriana de Colombia y SARM fue donada por el cepario del Hospital Universitario de Santander (Escuela de Bacteriología). Ácido poliláctico co-glicólico (PM: 38000-54000, en relación 50:50 monómeros), Poloxamer 407 ((C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O.C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>x</sub>, PM:9840-14600 g/mol), Polietilenimina (PM: 1800-2000 g/mol) y Acetato de etilo (PM: 88.1 g/mol) fueron adquiridos de AlfaAesar. Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico y HPLC. La metodología general propuesta se muestra en la figura 14.

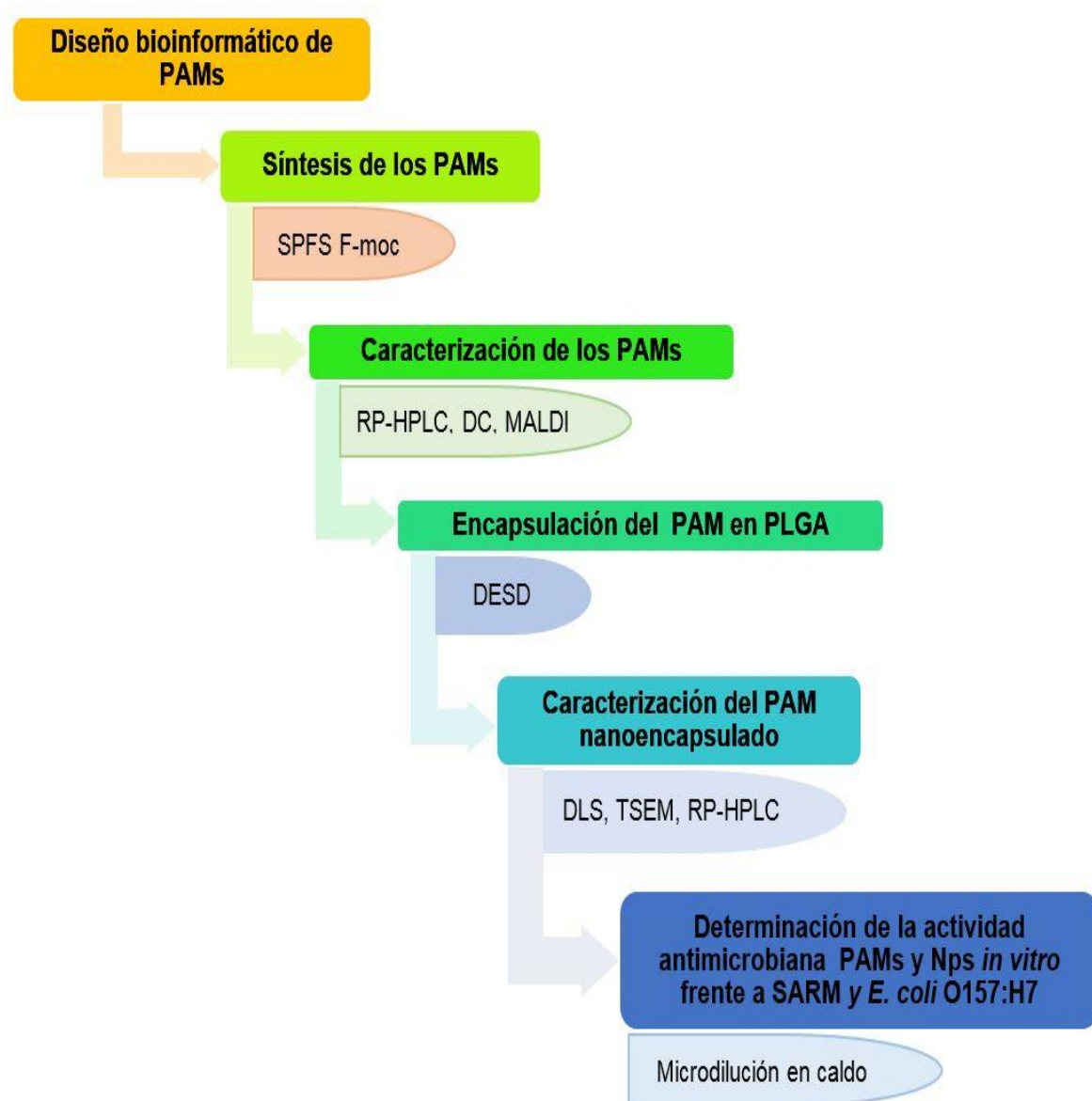
#### 3.2 Predicción y diseño de péptidos antimicrobianos

Las secuencias de aminoácido de la familia de Transferrina – incluyendo la Lf-reportadas en la base de datos *Collection of Ant-Microbial Peptides* (Camp) (<http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial/>) fueron tomadas como modelo para la realización del análisis racional mediante Design and Prediction Antimicrobial Peptides (DEPRAMPs). La secuencia LA1 se seleccionó como base para realizar un análisis racional usando las herramientas de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) y ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), con las cuales finalmente se realizó una búsqueda de secuencias de proteínas homólogas con un 90% de identidad y un alineamiento múltiple de secuencias. (Hocquellet et al., 2010)

Las propiedades Físicoquímicas que se seleccionaron para los péptidos fueron las siguientes: estructura secundaria  $\alpha$ -hélice, PAM anfipático, número de aminoácidos (>17Aa), carga catiónica (Q: +2-+9), índice de inestabilidad (II <40),

Hidrofobicidad (>50%) y tamaño del péptido (<30KDa). Estas propiedades se predijeron con las herramientas bioinformáticas de la Camp (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/>), CPH models 3.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>), y heliQuest (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>).

**Figura 14.** Esquema general de la metodología

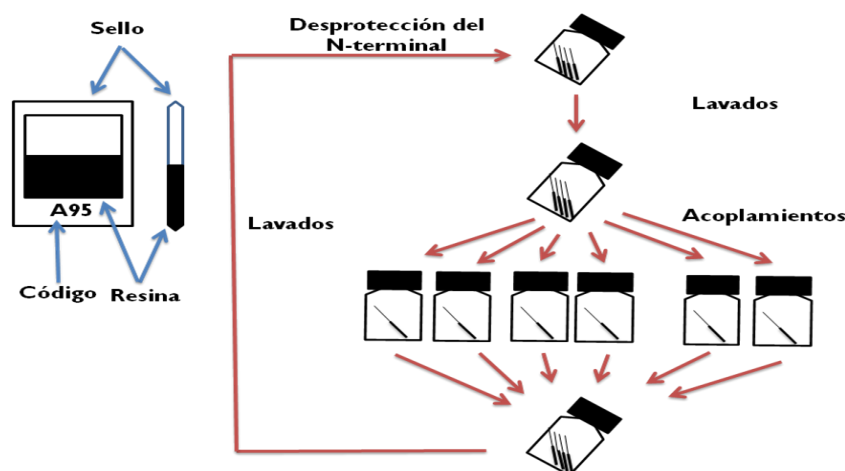


**Fuente:** Autor.

### 3.3 Síntesis y caracterización de péptidos antimicrobianos.

Los péptidos se obtuvieron mediante síntesis química en fase sólida, utilizando la estrategia de síntesis simultánea F-moc en fase sólida con bolsa de polipropileno soportados en una resina Rink amida 4MBHA (capacidad: 0.56 mmol/gramo) (Figura 11) (Walker, Protocols, & Pennington, 1994; Lloyd-Williams et al , 1997). Las bolsitas de polipropileno fueron marcadas y selladas. Los aminoácidos fueron acoplados con DIPEA y Dimetilformamida (DMF) en exceso (7 equivalentes DIPEA /5 equivalentes HOAT, TBTU, HBTU) como reactivos de acoplamiento (Figura 12). El indicador azul de bromofenol (1% (P/V) en DMF) se adicionó en solución en cada etapa de acoplamiento para el seguimiento de la reacción de desprotección de grupo  $\alpha$ -amino terminal (Gaggini, Porcheddu, Reginato, Rodriquez, & Taddei, 2004; Krchňák, Vägner, Pavel, & Lebl, 1988) La desprotección del grupo F-moc se llevó a cabo con piperidina al 25% (V/V) en DMF para dos tiempos; a los 20 y 30 minutos. Las resinas peptídicas fueron clivadas con Ácido trifluoroacético/agua/Trihidroxipropilsilano/Etanoditiol (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/EDT) (92.5:2.5:2.5:2.5) entre 2 - 4 h y se precipitaron con éter frío (-20 – -70° C). Los péptidos se liofilizaron y se conservaron a -20°C.(Biosystems, 1997).

**Figura 15.** Metodología experimental de la síntesis múltiple en fase sólida bolsas de polipropileno.



**Fuente:** Walker, Protocols, & Pennington, 1994

La estructura química de los grupos protectores empleados en la estrategia Fmoc/tBu, los soportes sólidos utilizados, el agente de condensación y los aditivos empleados en la síntesis se encuentran en los anexos 1, 2 y 3 respectivamente.

### **3.3.1 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa.**

Los péptidos fueron purificados en dos columnas preparativas Sephadex G-10 y Sepack C-18 (250 mm x 10 mm) y caracterizados por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC), la cual fue equilibrada utilizando dos sistemas de solventes: (A) H<sub>2</sub>O con 0.01% Ácido trifluoroacético (TFA) y (B) acetonitrilo (ACN) con 0.01% TFA. Se utilizó 70 % B y 30% de A, en 20 min; volumen de inyección 40 µL; detección ultravioleta a 220 nm en una columna C-18. (Aguilar, 2004)

### **3.3.2 Análisis de Espectrometría de Masas**

Los espectros de masas se obtuvieron en un Espectrómetro Bruker Daltonios Serie Microflex para determinar el ion molecular característico para cada PAM. Los ensayos se llevaron a cabo con Espectrometría de masas de Desorción/Ionización de Laser Asistida por una matriz con detección de tiempo de vuelo (MALDI ToF-ToF). Este instrumento usa una radiación láser en N<sub>2</sub> a una longitud de onda de 355 nm con pulsos de 3 ns. La matriz usada fue ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHA). La matriz CHA fue preparada como una solución saturada de concentración 10 mg/mL en Acetonitrilo con ácido fórmico o ácido trifluoroacético 0.1% y agua tipo I con ácido fórmico o ácido trifluoroacético 0.1%(v/v) en proporción 1:1. Las muestras fueron disueltas en agua tipo I para obtener una concentración de 1mg/mL. Finalmente, se tomó una relación 1:1 de matriz - muestra, las cuales fueron mezcladas o depositadas en forma de doble capa para proceder al análisis. (Dave, Headlam, Wallis, & Gorman, 2011)

### **3.3.3 Simulación *in silico* de la estructura secundaria**

Las secuencias de aminoácidos de los péptidos basados en Lf fueron alineadas y comparadas con Transferrinas homólogas, incluyendo la Lf, que están contenidas en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Estas secuencias diseñadas fueron evaluadas en CPH models 3.2, la cual es una herramienta bioinformática de simulación por homología de la estructura secundaria de péptidos y permite la visualización por Pymol Viewer 1.0. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos diseñados fueron proyectadas en diagramas de rueda helicoidal (<http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheelApp.html>).

### 3.3.4 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-810. 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 500  $\mu$ L. (Álvarez, Guzmán, Cárdenas, Marshall, & Mercado, 2014) Una concentración de 1mg/mL del péptido se estabilizó en una mezcla de TFE como se describe en previas publicaciones (Kelly, Jess, & Price, 2005). 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:

$l$ = la longitud del camino óptico (cm)

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

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

Por último, los datos de los espectros de DC obtenidos experimentalmente fueron corridos en el programa K2D3 (<http://k2d3.ogic.ca/>) para calcular la tendencia de



La suspensión de partículas obtenida fue roto-evaporada para eliminar el acetato de etilo. A continuación, se adicionó PEI a una concentración de 0.05% (P/V) ajustando el pH a 7.4. Finalmente, las NPs fueron purificadas y lavadas para eliminar los reactivos en exceso de la síntesis. Las Nps PLGA-péptido fueron caracterizadas por DLS y STEM. La metodología general de la síntesis se muestra en la figura 16.

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

Para caracterizar la morfología y el tamaño de las Nps PLGA-péptido se depositaron 5  $\mu$ L de la muestra en un *grid* con recubrimiento de oro (100-400 Mesh) para ser analizados por Microscopía electrónica de Barrido con cañón de emisión de campo en modo transmisión (FE-STEM, QUANTA FEG 650), que se encuentra en el Parque tecnológico de Guatiguará 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, proporcionando información sobre la forma y textura.

#### **3.4.2 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 0.6 mL de la solución de Nps PLGA-Péptido de una concentración de 2mg/mL 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°C. Para la

determinación de la carga superficial el equipo se colocó en modo Zeta, donde una dilución de 1/10 de la muestra se depositó en una celda capilar plástica DST 1060 con electrodo de oro a una concentración de 0.2 mg/mL de suspensión de nanopartículas, donde opera con un potencial de 148 V. Todas las muestras se realizaron por triplicado a pH: 7.4 y temperatura ambiente. (Hoo, Starostin, West, & Mecartney, 2008; Mattison, Morfesis, & Kaszuba, 2003)

### **3.4.3 Cuantificación del LA6 cargado en Nps de PLGA por cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en fase reversa (RP-HPLC).**

Para la cuantificación de la cantidad de péptido en nanopartículas de PLGA, 800  $\mu$ L de la suspensión de partículas fueron centrifugados (14000 rpm, 30 min) y 700  $\mu$ L del sobrenadante fueron removidos. Se adicionaron 350  $\mu$ L 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 700  $\mu$ L del sobrenadante que contiene el péptido fue analizado por RP-HPLC a las mismas condiciones de corrida para el péptido libre. (Wieber, Selzer, & Kreuter, 2011a)

Los patrones de la curva de calibración del Péptido LA6 libre se realizaron en un rango de concentraciones de 0 a 70 ppm, que junto con la muestra obtenida de la extracción de las Nps se cuantificó por RP-HPLC. La concentración inicial del péptido LA6 fue de 1 mg/mL en la metodología de doble emulsión - difusión de solvente. El sistema cromatográfico fue equilibrado utilizando dos soluciones: (A) H<sub>2</sub>O con 0.01% Ácido trifluoroacético (TFA) y (B) acetonitrilo (ACN) con 0.01% TFA. Se utilizó para la corrida de las muestras 70 % B y 30% de A en 20 min, volumen de inyección 40  $\mu$ L y detección ultravioleta a 220 nm en una columna C-18. (Aguilar, 2004).

La eficiencia de encapsulación (%EE) y péptido LA6 cargado (PC) en el sistema nanométrico de PLGA fueron calculados de acuerdo a las ecuaciones (1) – (2), respectivamente. (Silva et al., 2013; Wieber, Selzer, & Kreuter, 2011)

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

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

### 3.5 Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los PAMs y los PAMs nanoencapsulados.

Para determinar la actividad antibacteriana de los péptidos LA1 a LA6 y las Nps de PLGA- LA6 frente a *E. coli* O157:H7 y SARM se utilizó la siguiente metodología:

✓ *Método de microdilución en caldo*

El método de microdilución para la estimación de los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) fue realizado en placas de 96 pozos de acuerdo con los protocolos descritos por varios autores. (Fothergill, 2012)

Se preparó un preinóculo de *E. coli* O157:H7 y SARM en caldo Luria-Bertani (LB) durante 14h y Müller Hinton (MH) durante 12h, respectivamente, a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una concentración bacteriana de  $4,6 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia /mL (UFC/mL). Se realizó la cinética de crecimiento durante 8h con 100 µL del inóculo bacteriano haciendo medición cada hora con una densidad óptica inicial entre 0.08-0.13 según la escala de Mcfarland. Con anterioridad las microplacas contienen las diluciones seriadas de los PAMs (0.5, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 µM) y Nps de PLGA-LA6 (1, 5, 10, 25 y 50 µM). Las medidas de absorbancia de las microplacas se realizaron en un espectrofotómetro de microplaca ELISA (Biorad, imarck) a 595 nm, las cuales se conservaron a 37°C y 200 rpm. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue definida como la menor concentración de PAM o Nps PLGA-LA6 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 inhibe el 50% y 90% del crecimiento bacteriano, respectivamente.

Posterior a la cinética de crecimiento, se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de cada pozo que contenía las diferentes concentraciones de los PAMs y se incubó en 900  $\mu\text{L}$  de medio Infusión Cerebro Corazón (BHI, por sus siglas en inglés) en tubos eppendorf a 37°C durante 12 a 14 horas. Seguidamente, se tomó una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  de cada tubo y se transfirió a placas de agar BHI con el fin de confirmar si existía o no un efecto bactericida en aquellas donde no hubo crecimiento de colonias bacterianas. El valor de la concentración mínima bactericida (CMB) se determinó como aquella donde hubo inhibición del 100% del crecimiento bacteriano en comparación con el control positivo (bacteria en medio de cultivo). (Jenniffer Cruz et al., 2014)

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Diseño y síntesis de péptidos

El diseño del péptido antimicrobiano tomado como base (péptido LA1) se obtuvo con una selección de proteínas que pertenecen a la familia de Transferrinas, dentro de la cual se encuentra la Lf. La secuencia de aminoácidos de cada proteína fue tomada de la base de datos Camp y evaluadas en DEPRAMPs.

La búsqueda de proteínas homólogas a secuencias del péptido LA1 se realizó utilizando la base de datos NCBI, las cuales presentaron una alta homología con una identidad mayor o igual al 90%. Los números de acceso del GenBank de las proteínas alineados se encuentran documentados en el anexo 5. El programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) se utilizó para alinear las secuencias y realizar el análisis de las regiones en la secuencia del péptido LA1.

De acuerdo con el resultado obtenido por ClustalW se realizaron las siguientes modificaciones con el fin de mejorar la posible actividad antimicrobiana de los PAMs: i) Eliminación de la prolina (Pro, P) en todas los péptidos; ii) Sustitución de Alanina (Ala, A) por Lisina (Lys, K) en LA2; iii) sustitución de tirosina (tyr, Y) por Triptófano (Tryp, W) en LA3; iv) Sustitución de Isoleucina (Ile, I) por Lisina (Lys, K); v) sustitución de Leucina (Leu, L) por glicina (Gly, G). (Hocquellet et al., 2010; Vila-Farrés et al., 2012). El cambio evolutivo se indica con un símbolo en la parte inferior de cada aminoácido en la secuencia base LA1: asterisco (\*): aminoácido conservado; dos puntos (:): sustitución por un aminoácido con características iguales; punto (.): sustitución por un aminoácido con características similares y la ausencia de marca ( ): no conservación.

Estas modificaciones fueron debido a que aminoácidos como la prolina desestabilizan estructura secundaria alfa-hélice, una de las propiedades más relevantes en los PAMs. En cuanto las sustituciones por K, G y W, se realizaron con la finalidad de aumentar la carga neta positiva, disminuir el volumen y

umentar la hidrofobicidad de los péptidos, parámetros fisicoquímicos característicos de un PAM. (Brown & Hancock, 2006; Hancock & Sahl, 2006)

Con las herramientas bioinformáticas de CAMP y heliQuest se evaluaron las siguientes propiedades fisicoquímicas: probabilidad de presentar actividad antimicrobiana de los péptidos (PAM), carga neta a pH 7 (Q), peso molecular (PM: g/mol), Hidrofobicidad (h), índice de inestabilidad (II), punto isoeléctrico a pH 7 (PI), momento hidrofóbico ( $\mu H$ ) y volumen ( $\text{Å}^3$ ) (ver tabla 3).

**Tabla 3.** Propiedades evaluadas como herramientas bioinformáticas en CAMP.

Nombre	Secuencia de Aa	PAM	Q	PM	h	II	PI	$\mu H$	V ( $\text{Å}^3$ )
LA1	GGYIYIAGKCGLVPVLA . * :: * * * ; * * * * * .	87.7	+1	1694.07	0.779	29.34	8.8	0.05	2050
LA2	GGYIYIAGKCGLV_VLK	91.6	+2	1654.05	0.702	1.17	9.5	0.185	2680
LA3	GGWIYIAGKCGLV_VLK	95.5	+2	1677.09	0.782	14.19	9.66	0.254	2029
LA4	GGWIYKAGKCGLV_VLK	98.3	+3	1692.10	0.608	14.19	10.05	0.296	2047
LA5	GGKIYKAGKCGLV_VLK	96.0	+4	1634.06	0.406	-4.14	10.3	0.266	1977
LA6	GGYIYIAGKCGLV_VGK	91.2	+2	1597.94	0.596	-4.14	9.27	0.203	1934

Según los resultados obtenidos se muestra en la tabla 3, los péptidos sintéticos análogos a LA1 denominados LA2, LA3, LA4, LA5 y LA6, presentaron las siguientes características: Porcentaje de probabilidad de ser un PAM mayor del 90%, carga neta catiónica (+2 a +4), a excepción del LA1 con un 87.7% y carga +1. Esta propiedad de carga positiva les confiere una interacción electrostática con la membrana fosfolipídica de las bacterias u otros microorganismos cargada negativamente y una selectividad antimicrobiana en relación con los tejidos del huésped. (Zelezetsky & Tossi, 2006)

Evaluado el índice de inestabilidad de cada PAM se encontraron valores entre -4.14 y 29.34 que pronosticó una excelente estabilidad después de ser sintetizados; respecto a la hidrofobicidad y al índice hidrofóbico calculados son de

carácter anfipático para todos los péptidos y los volúmenes no mayores a 2680 Å<sup>3</sup>.

## 4.2 Caracterización de los péptidos antimicrobianos basados en Lf

### 4.2.1 Purificación por RP-HPLC.

Los PAMs sintéticos basado en Lf fueron desalinizados y purificados por Sephadex G-10 y SePpak C-18 y RP-HPLC, donde se obtuvieron los cromatogramas con una señal principal y una pureza entre 94 y 98.6%, (ver Anexo 2), que se interpretó como la ausencia de deleciones. En cuanto a los tiempos de retención se observaron tiempos característicos para cada péptido no mayor a 2 minutos (ver tabla 4), en su orden de elución el primero fue LA5 comprobando ser el péptido con menor hidrofobicidad seguido del LA4, LA2, LA6, LA3 y LA1.

Los tiempos de retención obtenidos de los PAMs fueron cercanos entre sí, debido a que las modificaciones sistemáticas realizadas fueron conservando la estructura secundaria, luego los péptidos interactuaron con la fase estacionaria (columna C-18) de manera similar.

**Tabla 4.** Tiempos de retención y porcentaje de pureza de los PAMs LA1, LA2, LA3, LA4, LA5 y LA6

Nombre	Tiempo de retención (minutos)	Pureza (%)
LA1	1.937	97.3
LA2	1.912	98.6
LA3	1.919	94.1
LA4	1.893	97.8
LA5	1.875	96.3
LA6	1.913	95.5

**Fuente:** Autor

#### 4.2.2 Análisis de Espectrometría de Masas

Mediante Espectrometría de masas MALDI-ToF-ToF se identificó la masa molecular de los PAMs LA1 a LA6 (ver figura 14), donde se observó una correspondencia entre el ion molecular calculado y experimental, cabe resaltar que es una técnica de ionización suave con aparición de un ion pico de base ( $m/z$ ), ya sea el ion monoprotonado o el ion catiónico en los espectros de masas. Sin embargo, en el espectro del LA4 se presentó una señal de menor intensidad por debajo de la señal del ion pico de base que podría ser debido a una deleción causada en el proceso de clivaje.

Las señales observadas por encima de la señal del ion del pico de base en los espectros de masas se deben a la presencia de cationes de sodio ( $\text{Na}^+$ ) y/o potasio ( $\text{K}^+$ ), los cuales forman aductos catiónicos salinos con los péptidos por interacción electrostáticamente y son inherentes a la técnica analítica.(Du, 2003) En la tabla 5 se resumen el ion molecular calculado (<http://db.systemsbioology.net/>) y experimental que caracteriza a cada PAM sintetizado en relación con los pesos moleculares (ver tabla 5). La exactitud de los espectros de masas se determinó según (Jürsen, 2004) mediante la ecuación (3):

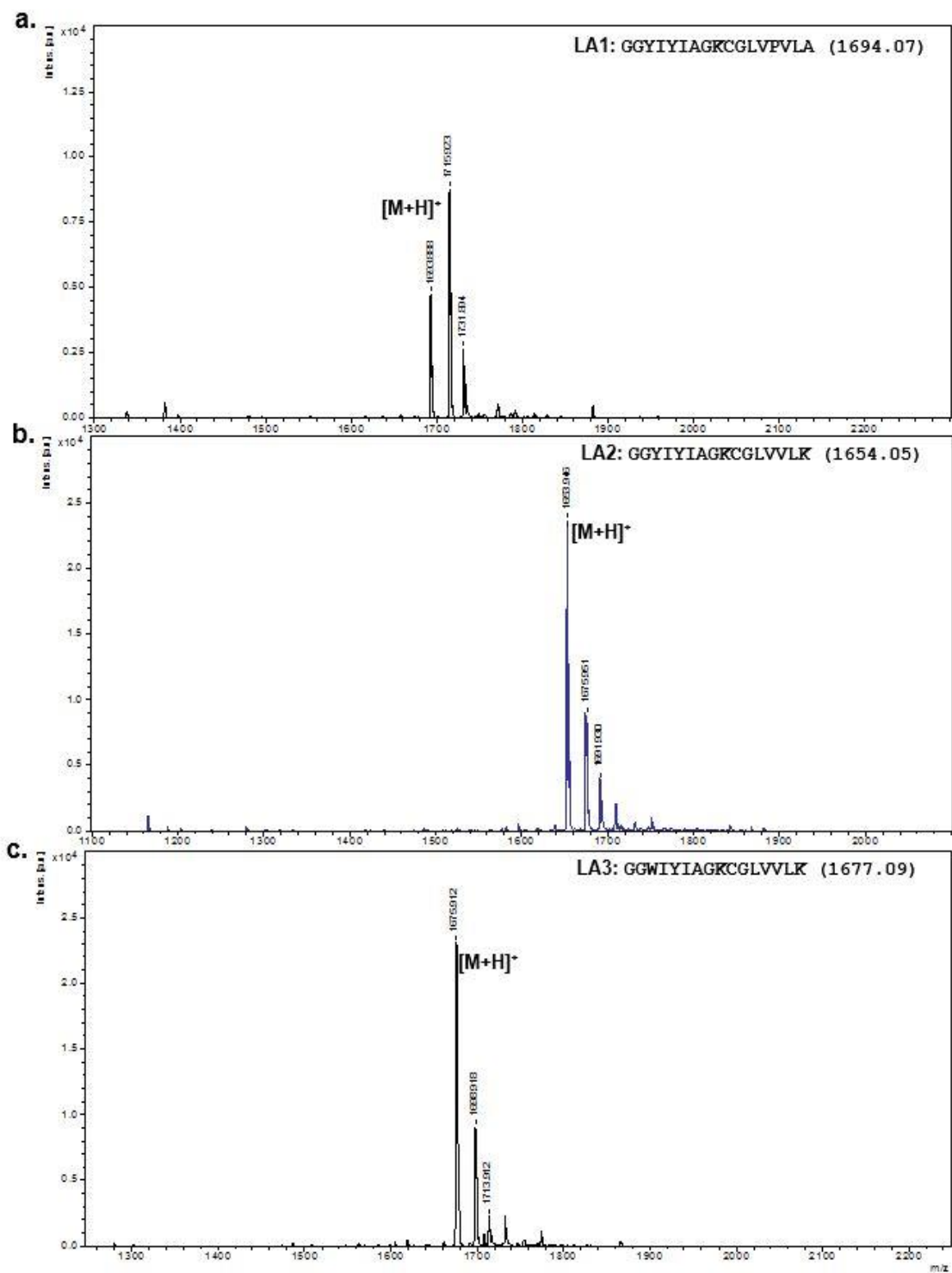
$$\text{ppm} = \frac{\text{masa exacta calculada} - \text{masa exacta experimental}}{\text{masa exacta calculada}} * 10^6 \quad (3)$$

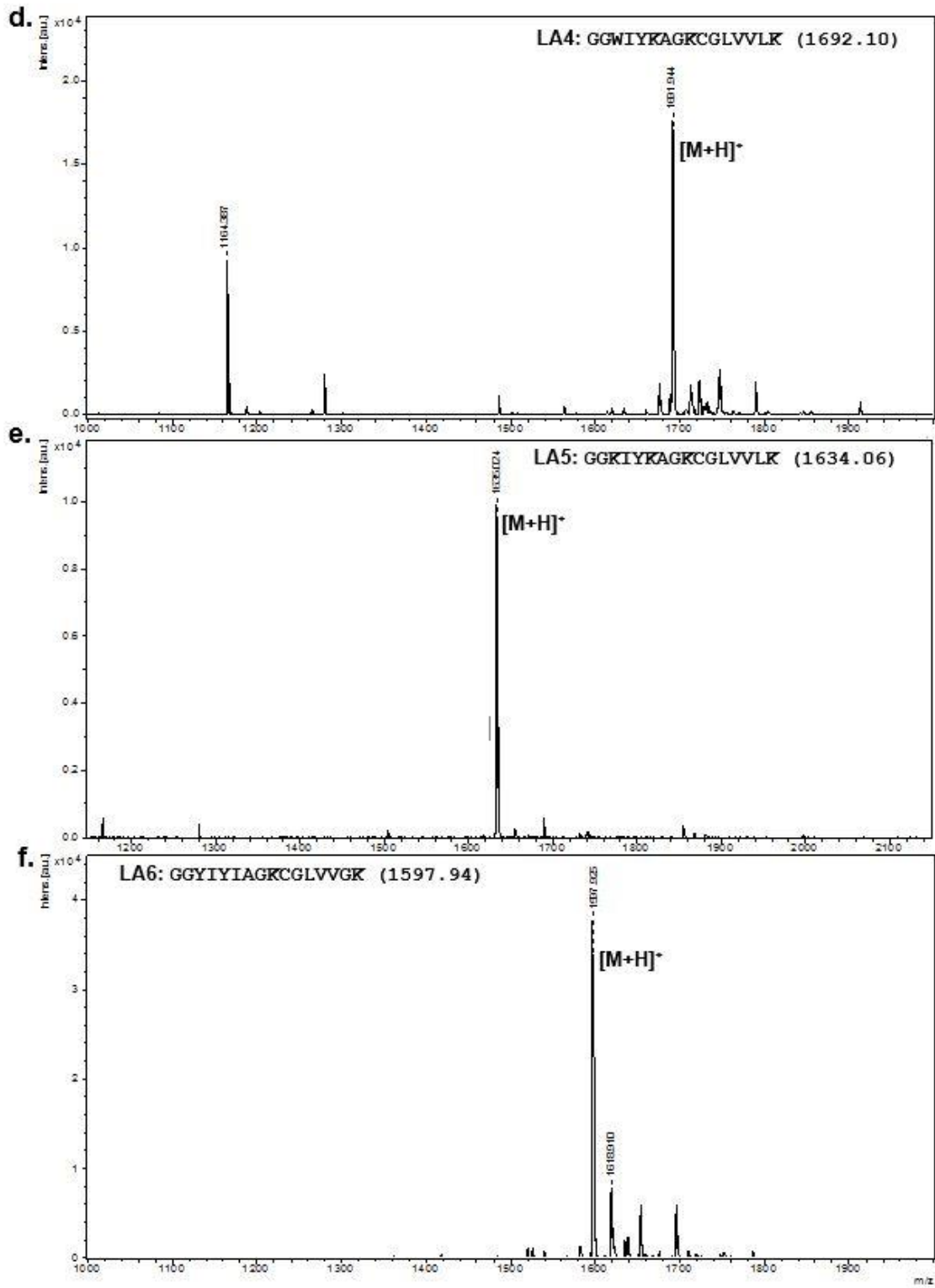
**Tabla 5.** Ion molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de los PAMs LA1, LA2, LA3, LA4, LA5 y LA6. Relación masa/carga:  $m/z$ . Partes por millón (ppm)

Péptido	$[\text{M}+\text{H}]^+$ Experimental ( $m/z$ )	$[\text{M}+\text{H}]^+$ Calculado ( $m/z$ )	Exactitud (ppm)
LA1	1693.888	1693.9346	27.5
LA2	1653.946	1653.9397	-3.8
LA3	1676.925	1676.9556	18.2
LA4	1691.944	1691.9665	13.3
LA5	1633.957	1633.9822	15.4
LA6	1597.925	1597.8771	-29.9

**Fuente:** Autor

**Figura 17.** Espectros de masas: a. LA1, b. LA2, c. LA3, d. LA4, e. LA5 y f. LA6. Espectrometría de masas MALDI ToF-ToF. Matriz CHA en relación 1:1, CHA:PAM.





Fuente: Autor.

### 4.2.3 Simulación *in silico* de la estructura secundaria

Se realizó la evaluación de la estructura secundaria de los péptidos LA1 a LA6 *in silico* en CPH models 3.2, donde se predijeron 5 estructuras secundarias  $\alpha$ -hélice y una  $\beta$ -plegada. Esta última no fue consistente con el espectro de DC experimental correspondiente al LA5 posiblemente debido a que CPH models es un servidor de modelado de homología de proteínas, donde el reconocimiento de plantilla se basa en la alineación de perfil-perfil guiada por estructura secundaria y predicciones de exposición. Por lo anterior, el péptido LA5 en la predicción podría haber presentado mayor homología con secuencias de proteínas de perfil  $\beta$ -plegada, sin embargo, experimentalmente se observó un perfil de estructura secundaria  $\alpha$ -hélice para este.

Las 5 estructuras secundarias  $\alpha$ -hélice mencionadas corresponden a los PAMs LA1, LA2, LA3, LA4 y LA6, las cuales se confirmaron experimentalmente acorde a su espectro de DC. Todas las simulaciones fueron visualizadas en el programa de PYMOL Viewer 1.0 y algunos aminoácidos fueron enlazados en SPDBV 4.04 con minimización de energía debido a luxaciones sufridas en CPH models 3.2 (ver figura 18). En las estructuras se observó que los aminoácidos expuestos al medio son los alifáticos y aromáticos, y que a partir de la cisteína la estructura secundaria de los péptidos toma una forma extendida.

El resumen de las estructuras secundarias de los PAMs se encuentra en la tabla 6 y el resultado de la visualización en la figura 18.

**Tabla 6.** Estructuras Secundarias (E2D) simuladas en CPH models 3.2 de los PAMs sintetizados.

Nombre	E2D
LA1	$\alpha$ - hélice
LA2	$\alpha$ - hélice
LA3	$\alpha$ - hélice
LA4	$\alpha$ – hélice
LA5	$\beta$ - plegada
LA6	$\alpha$ – hélice

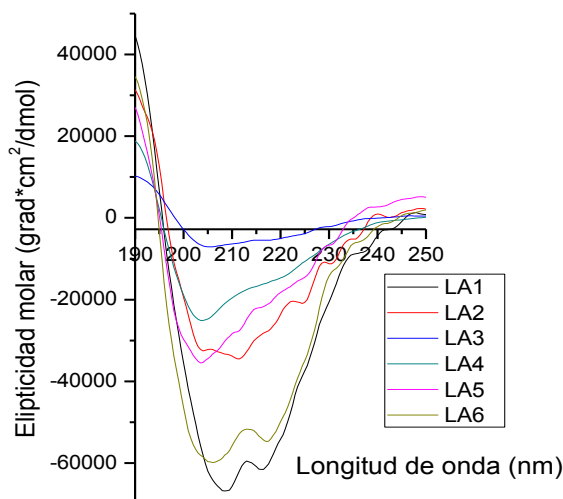
**Fuente:** Autor



#### 4.2.4 Dicroísmo circular

Por dicroísmo circular se caracterizó la estructura secundaria de los PAMs: LA1, LA2, LA3, LA4, LA5 y LA6, en condiciones simuladas de membrana en solución de TFE al 30% (v/v). En los espectros de DC (ver figura 19) se presentaron las bandas características de absorción en el Ultravioleta lejano de perfil  $\alpha$ -hélice como lo son dos bandas negativas a 222 nm y 208 nm, junto con una banda positiva a 193 nm. (Greenfield, 2006) Esto confirmó experimentalmente que todos los PAMs sintetizados mostraron perfil  $\alpha$ -hélice, de acuerdo con las estructuras secundarias simuladas por CPH models 3.2, a excepción del LA5 que se predijo  $\beta$ -plegada. Además, se evaluaron los datos de los espectros de DC experimentales en el programa K2D3, donde se obtuvo una tendencia por encima del 95% de presentar estructura secundaria  $\alpha$ -hélice (ver tabla 7).

**Figura 19.** Espectro de dicroísmo circular del LA1 a LA6. Solución de TFE al 30% (V/V). Concentración del PAM: 1mg/mL.



**Fuente:** Autor.

**Tabla 7.** Tendencia de presentar estructura secundaria  $\alpha$ -hélice de los PAMs sintetizados evaluados por el programa K2D3.

Nombre	Porcentaje de $\alpha$ -hélice
LA1	95.31
LA2	95.31
LA3	95.31
LA4	95.31
LA5	95.33
LA6	95.31

**Fuente:** Autor.

### 4.3 Síntesis y caracterización de nanopartículas de PLGA-LA6.

Se sintetizaron Nps de PLGA-LA6 por la metodología de doble emulsión/ difusión de solvente, que combina las ventajas de dos técnica bien conocidas: un sistema de doble emulsión que minimiza la salida del principio activo hidrofílico del centro acuoso y el acetato de etilo que es farmacéuticamente más aceptado y considerado menos tóxico que el Diclorometano.

La suspensión de Nps que se obtuvo fue una solución blanca. Estas Nps se caracterizaron por DLS y FE-STEM después de la remoción del acetato de etilo a presión reducida y fueron purificadas con filtros ULTRAFREE MC Amicon de 30 kDa con solución tampón fosfato 1 mM. Mediante los resultados por DLS se determinó un tamaño hidrodinámico promedio alrededor de 227.4 nm con un índice de polidispersión de 0.134, que se interpreta como una distribución estrecha de tamaño en la población de nanopartículas sintetizadas, con una carga superficial de + 7.98 mV, que en general le otorga una buena estabilidad.(Wu, Zhang, & Watanabe, 2011). Así las micrografías de FE - STEM mostraron vehículos en el rango de tamaño nanométricos (200-400 nm) como se resume en la tabla 8.

**Tabla 8.** Características de las Nps de PLGA-LA6: tamaño, morfología y carga.

ND: no se determinó. DS: desviación estándar.

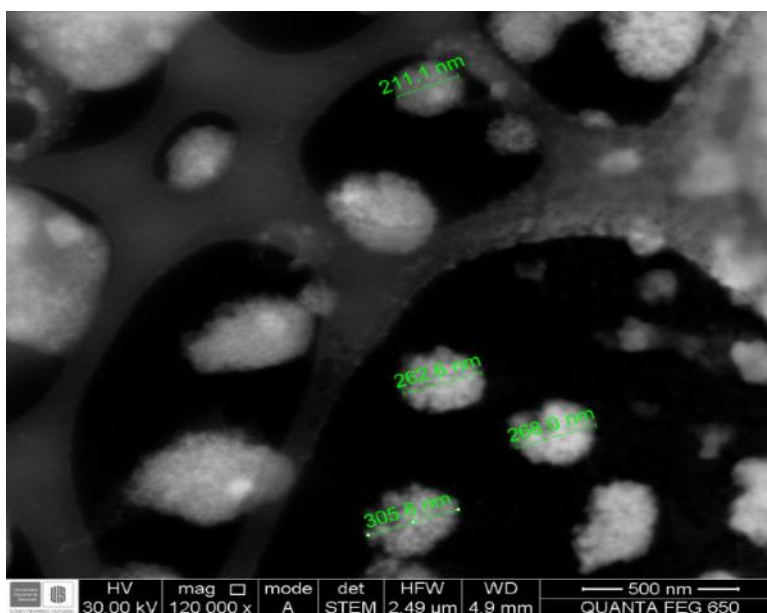
	<b>FE - STEM ± DS (nm)</b>	<b>Tamaño hidrodinámico promedio ± DS(nm)</b>	<b>Potencial Zeta ± DS (mV)</b>
Nps PLGA-LA6	262 ± 23	227.4 ±11.9	+7.98 ±0.45
Nps de PLGA	ND	260.9 ±1.7	+ 5.57± 0.38

**Fuente:** Autor

#### 4.3.1 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 30 KV, donde se observó una superficie homogénea. Todas las Nps formaron unidades individuales.

**Figura 20.** Micrografía por FE- STEM en modo de transmisión de Nps PLGA-LA6. Con un voltaje de aceleración del 30KV y magnificación de 120000x.



**Fuente:** Autor.

La morfología de las Nps PLGA-LA6 fue ovalada con un tamaño alrededor de 262 nm, las cuales están dispersas sin formación de aglomerados como se puede

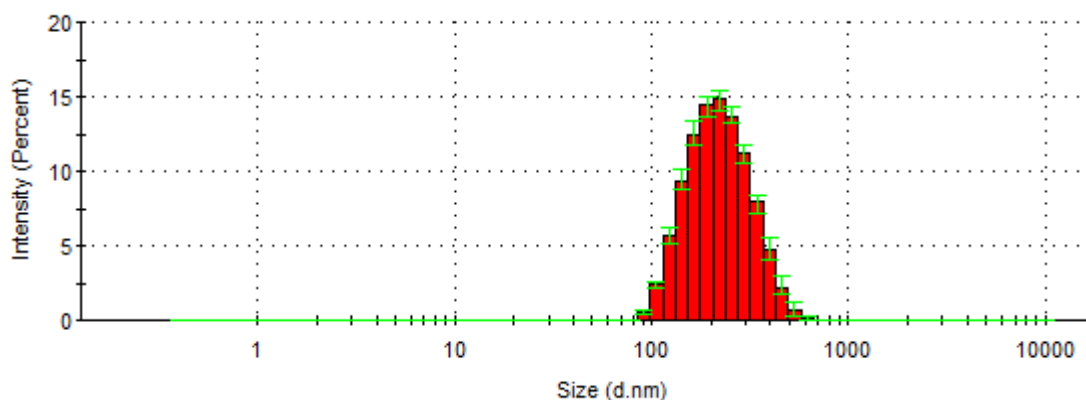
observar en la figura 20. Estas características de las Nps son determinantes para la actividad antimicrobiana como se reporta en estudios de inhibición del crecimiento bacteriano de las nanopartículas en diferentes formas y tamaños.(Huh & Kwon, 2011)

#### 4.3.2 Dispersión de luz en modo dinámico

En el histograma de la distribución de tamaño hidrodinámico promedio de las Nps PLGA-LA6 sintetizadas por DESD (Ver figura 21), se observan poblaciones de tamaño a partir de 98.3 nm como tamaño inferior hasta 615.2 nm de tamaño superior, con una población de tamaño hidrodinámico en promedio de 227.4 nm y un índice de polidispersión de 0.134.

Las Nps presentan una distribución monomodal de tamaños como se ilustra en el histograma.(Hoo et al., 2008) Este tamaño promedio de Nps está en los rangos de uso terapéutico en equilibrio con la carga neta.(Cohen-Sela et al., 2009) De esta manera, se logró obtener Nps con tamaños de acuerdo a la literatura entre 200-400 nm utilizando la metodología de DESD. (Huh & Kwon, 2011).

**Figura 21. Histograma del tamaño hidrodinámico promedio de Nps PLGA-LA6.** Condiciones: PLGA 2,5 mg/mL: 4 mL de Acetato de etilo como fase orgánica, 1 mg/mL de LA6: 1mL como fase acuosa interna, 0.01% (P/V) Poloxamer 407 y 0.05% (P/V) de Polietilenimina como fase acuosa externa. La medida del tamaño hidrodinámico se realizó por triplicado.



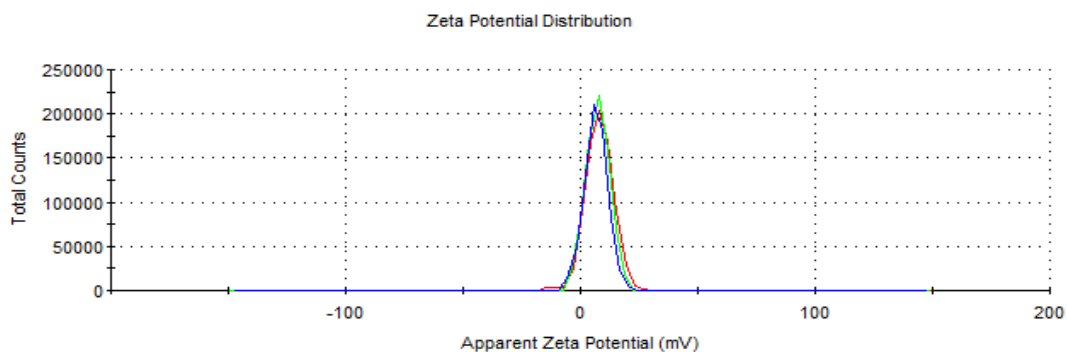
**Fuente:** Autor.

### 4.3.3 Potencial Zeta

El potencial Zeta ( $\zeta$ ) es el potencial eléctrico en el plano de corte, y por lo general se expresa 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, al tiempo que es clave para el control electrostático de un coloide de una dispersión coloidal. 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  $\zeta < 30$  mV o  $\zeta > 30$  mV son considerado altos. (Herr et al., 2000)

En la figura 22 se aprecian la distribución de la carga superficial de la nanosuspensión en conteos totales del potencial zeta medido para las Nps PLGA-LA6 sintetizadas empleando la metodología de DESD. Estas Nps presentaron una carga superficial en promedio de +7.98 mV. Las NPs con Potencial Zeta más positivos o más negativos por encima de 30 mV producen una excelente estabilidad, mientras que entre 30 - 5 mV generalmente resultan en una buena y aceptable estabilidad a corto plazo con una agregación rápida. (Wu et al., 2011) En este sentido, la medida del potencial de las Nps PLGA-LA6 indicó una estabilidad a corto plazo (dos días) y una fácil agregación.

**Figura 22. Histograma de distribución de carga superficial de Nps PLGA-LA6.** Condiciones: PLGA 2,5 mg/mL: 4 mL de Acetato de etilo como fase orgánica, 1 mg/mL de LA6: 1mL como fase acuosa interna, 0.01% (P/V) Poloxamer 407 y 0.05% (P/V) de Polietilenimina como fase acuosa externa. La medida de la carga superficial se realizó por triplicado (cada color es una medición).



**Fuente:** Autor.

#### **4.3.4 Cuantificación del péptido LA6 cargado en nanopartículas de PLGA por RP-HPLC.**

La cantidad de péptido LA6 encapsulado en Nps de PLGA se cuantificó por RP-HPLC, donde se observó una señal con un tiempo de retención de 1.913 min que corresponde al tiempo característico del péptido libre LA6.

Se determinó una concentración de péptido cargado de 63.43 ppm en las Nps de PLGA mediante una curva de calibración del péptido libre entre 0 y 70 ppm (ver anexo 6). Esta concentración representa 31.72 µg LA6/mg PLGA de PAM cargado en el sistema de liberación nanométrico de PLGA para realizar la actividad antibacteriana frente a *E. coli* O157:H7 y SARM.

La eficiencia de encapsulación de LA6 en el sistema de liberación de PLGA fue del 31.7 %, la cual es buena para una relación de péptido/ Polímero 1:10 (mg de PAMs/mg de PLGA). En este sentido, se logró aplicar una metodología de DESD para encapsular PAM eficientemente en nanovehículos de PLGA y se realizó una caracterización completa de la suspensión de Nps de PLGA-LA6.

#### **4.4 Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los PAMs y los PAMs nanoencapsulados.**

Se evaluó la actividad antibacteriana de los péptidos LA1 a LA6 y de las Nps PLGA-LA6 frente a *E. coli* O157 y SARM como modelo de bacteria *Gram*-negativa y *Gram*-positiva, respectivamente. Estas actividades 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 muestran a continuación:

##### **4.4.1 Actividad Antibacteriana de los péptidos libres.**

Se evaluó la cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 y SARM en presencia de diferentes concentraciones de LA1 a LA6. En las figuras 23 y 24 se observa un

efecto dosis-respuesta ya que a medida que se aumenta el valor de la concentración de cada péptido mencionado frente a cada cepa modelo, el efecto de inhibición aumenta.

En la figura 23 se muestra la cinética de crecimiento de todos péptidos sintéticos frente a *E. coli* O157:H7, donde se determinó que los PAMs LA1, LA2 y LA3 a una concentración de 100  $\mu$ M solo inhiben entre un 26 y 33% del crecimiento bacteriano respecto al control positivo. Los ensayos bactericidas efectivos se podrían esperar a concentraciones de péptidos por encima de 100  $\mu$ M debido a que se observó crecimiento bacteriano en medio BHI para las concentraciones de péptidos probadas.

Por el contrario, se observó para los PAMs LA4, LA5 y LA6, los cuales demostraron una mayor efectividad frente a *E. coli* O157:H7, resultados de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) del 50% a 75 $\mu$ M, 75 $\mu$ M y 50 $\mu$ M, respectivamente.

Para el péptido LA4 y LA6 se alcanzaron valores de CMI del 90% a 100 $\mu$ M después de 8 horas de exposición con la cepa de *E. coli* O157:H7; sin embargo para el péptido LA5, no se alcanzó una CMI del 90% a 100  $\mu$ M. Este efecto se puede atribuir al cambio de aminoácidos neutros (Ala-Leu-Ile) por Lisina (K), Glicina (G) y/o Triptófano (W). La Lisina (K) es un aminoácido básico que le confiere un aumento a la carga neta positiva a la secuencia peptídica, el triptófano (W) es un aminoácido aromático que aumenta el momento hidrófobo, mientras que la glicina (G) es un aminoácido alifático se le atribuye una disminución en el volumen y una mejor estabilidad a estructura alfa hélice. Esto posiblemente mejoró la interacción péptido-membrana.(Cubellis, Cailliez, & Lovell, 2005)

La interacción inicial del PAM con la membrana de las bacterias Gram-negativa como *E. coli* 157:H7 se inicia con la asociación del péptido con la membrana a través de interacciones electrostáticas entre PAMs catiónicos y Lipopolisacáridos aniónicos. Esto compuestos son uno de los principales componentes de las bacterias Gram-negativas que 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. (Giuliani, Pirri, & Nicoletto, 2007).

Diversos estudios sobre PAMs han determinado la correlación entre las cargas positivas y el aumento en la actividad antimicrobiana, debido a que son esenciales para la atracción electrostática inicial entre el PAM y la membrana bacteriana. (Won, Kang, & Lee, 2009; Yang, Spek, Gong, Zhou, & Kallenbach, 1997; Zelezetsky & Tossi, 2006). La presencia de aminoácidos básicos como arginina (R) y Lisina (K) aumenta la carga neta positiva del péptido, lo que conlleva al aumento de la actividad antimicrobiana. (Su, Doherty, Waring, Ruchala, & Hong, 2010) Por ejemplo la Lisina (K) con su carga positiva de la cadena lateral provee un medio efectivo para que los péptidos puedan interactuar con la membrana bacteriana, lo que facilita las interacciones iónicas con superficies cargadas negativamente tales como lipopolisacáridos (LPS), ácido teicoico o fosfolípidos presentes en la membrana de las bacterias Gram negativas como *E. coli* O157:H7. Por lo anterior, las modificaciones que aumentaron la carga neta positiva de los péptidos LA4, LA5 y LA6 incrementó la actividad antibacteriana, e incluso la glicina (G) en el péptido LA6 mejoró la estabilidad de la estructura 2D. (Lata, Sharma, & Raghava, 2007)

Por otro lado, se presenta el Triptófano (W) como un aminoácido importante para la actividad antimicrobiana, debido a que su estructura molecular presenta una nube electrónica  $\pi$  del anillo aromático Indol, que da lugar a un momento cuadrupolar significativo a medida que se introduce más hacia el núcleo de hidrocarburos que constituyen la bicapa lipídica. Esto causa una interrupción de las interacciones hidrófobas altamente favorables de las cadenas acil – lípidos. (Chan, Prenner, & Vogel, 2006). Por ejemplo, una simulación del péptido Dermaseptina S3 muestra la inserción del residuo de Trp por la región N-terminal penetrando en la capa interfacial de la membrana. Otras simulaciones de pentapéptidos muestran que el residuo de Trp puede asociarse con las cargas

positivas de las cabezas de grupos de colina de la bicapa lipídica. De esta manera, el reemplazo de Triptófano por Lisina en el péptido LA5 posiblemente causó la disminución de la actividad antibacteriana frente a *E. coli* O157:H7 respecto al LA4.(Aliste, Maccallum, & Tieleman, 2003; Zhang et al., 2001)

Recientemente, Castillo et al, 2001 demostraron que las apideacinas, péptidos cortos ricos en prolina-arginina, requieren una interacción estereoespecífica para entrar a células *Escherichia coli* y matar a las células por medio de la inhibición de síntesis de proteínas.(Bond et al., 2008; Kraus & Peschel, 2006; Lee, Hung, Chen, & Huang, 2008)

En la tabla 9 se resumen los valores de la CMI al 50 y 90% de cada péptido frente a *E. coli* O157:H7. En el caso del péptido LA1, este fue el único péptido que a una concentración de 100  $\mu$ M frente a *E. coli* O157:H7 y SARM logró solo una inhibición del 33% del crecimiento bacteriano. En consecuencia, su acción bacteriostática o bactericida sobre las cepas estudiadas podría ser mayor a 100  $\mu$ M y, además, podría mostrar acción antimicrobiana frente a otros microorganismos.

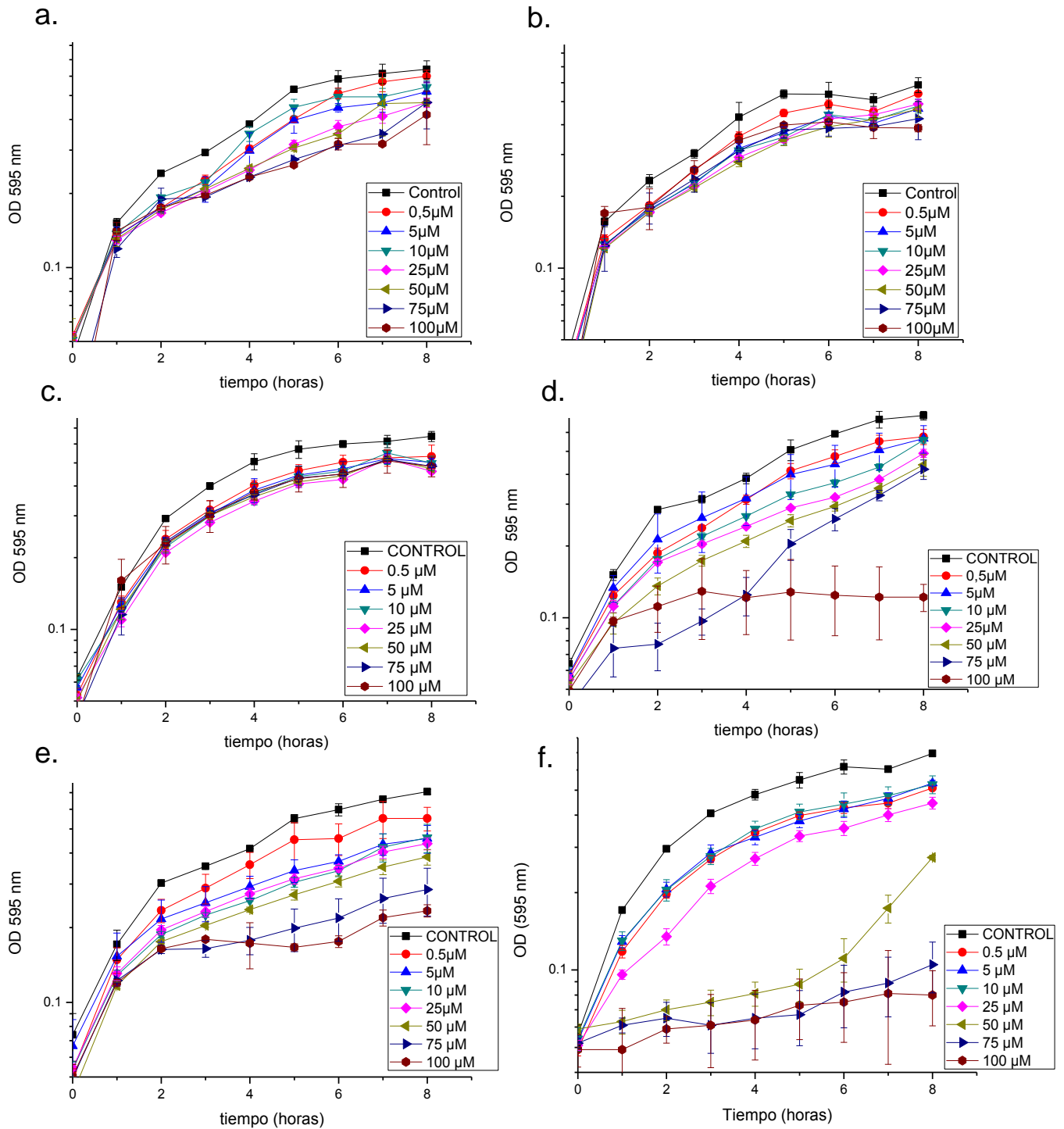
**Tabla 9.** Concentración mínima inhibitoria del 50 y 90% del crecimiento bacteriano de los PAMs LA1 a LA6 frente a *Escherichia coli* O157:H7. DS: Desviación estándar.

Péptido antimicrobiano	Actividad antimicrobiana frente a <i>E. coli</i> O157:H7	
	CMI <sub>50</sub> ±DS ( $\mu$ M)	CMI <sub>90</sub> ±DS ( $\mu$ M)
LA1	>100	>100
LA2	>100	>100
LA3	>100	>100
LA4	75 ±0.04	100 ±0.02
LA5	75 ±0.06	>100
LA6	50 ±0.01	100 ± 0.02

**Fuente:** Autor

**Figura 23. Actividad antimicrobiana de: a. LA1 b. LA2 c. LA3 d. LA4 e. LA5 f. LA6 frente a *Escherichia coli* O157:H7 por método de microdilución en caldo.**

Todos los ensayos se realizaron por triplicado a 595 nm y se midió la densidad óptica (OD) durante 8 horas.



Fuente: Autor.

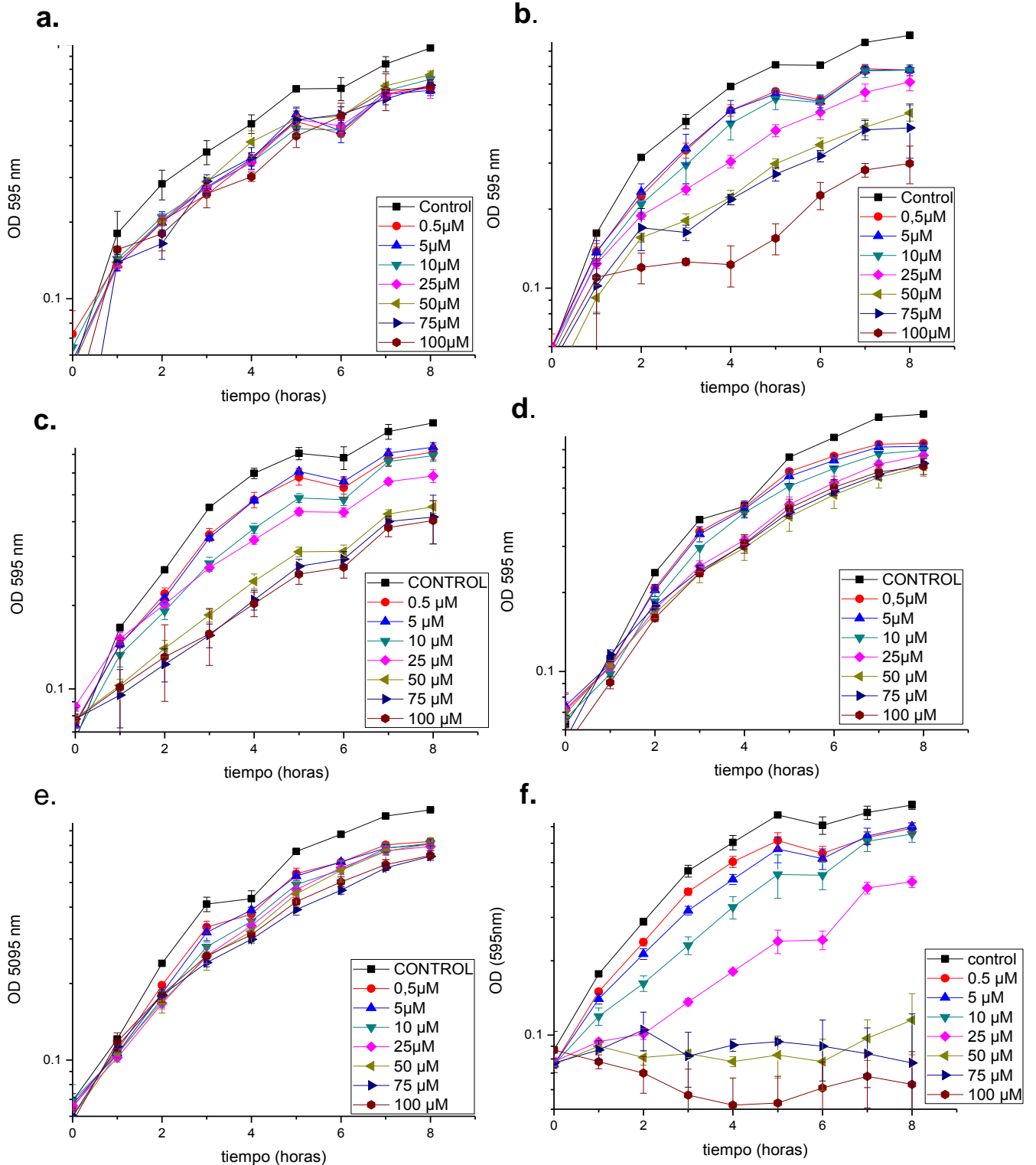
Los PAMS LA4, LA5 y LA6 presentaron una actividad antibacteriana frente a *E. coli* O157:H7 mayor que el PAM LA1, donde inhibieron el 50% de crecimiento bacteriano con concentraciones entre 50 y 75  $\mu\text{M}$  ( $\text{CMI}_{50}$ ). Estos resultados se encuentran en el rango de los valores reportados dentro de las concentraciones mínimas inhibitorias de derivados de la Lf, ya sea bien por modificaciones estructurales o purificación de dominios aminoácidos de la glicoproteína, que constituyen una alternativa en el diseño de nuevos agentes terapéuticos naturales o sintéticos. (Brouwer et al., 2011; Tossi, Tarantino, & Romeo, 1997).

El péptido LA1 fue seleccionado como péptido modelo por DEPRAMs con selectiva racional debido a que cumplió los parámetros mínimos de PAMs. Los parámetros evaluados por Camp (base de datos) y CPH models 3.2 tales como momento hidrófobico, estructura 2D, y anfipaticidad, son en medida comparables con PAMs reportados en la literatura. (Fjell, Hiss, Hancock, & Schneider, 2012; Liu, Fang, Huang, Pan, & Wu, 2008; Zhang et al., 2001)

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 50 $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$  y 25 $\mu\text{M}$  de los péptidos LA2, LA3 y LA6, respectivamente. Por el contrario, para los péptidos LA1, LA4 y LA5 se reportaron inhibición del crecimiento bacteriano entre 30 y 40%, tal como se muestra en la figura 23 y se resume en la tabla 10.

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. (Lee et al., 2008)

**Figura 24. Actividad antimicrobiana de: a. LA1 b. LA2 c.LA3 d. LA4 e. LA5 f. LA6 frente a *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina por el método de microdilución. Todos los ensayos se realizaron por triplicado a 595 nm y se midió la densidad óptica (OD) durante 8 horas.**



Fuente: Autor.

**Tabla 10.** Concentración mínima inhibitoria del 50 y 90% del crecimiento bacteriano de los PAMs LA1 a LA6 frente a *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. DS: desviación estándar.

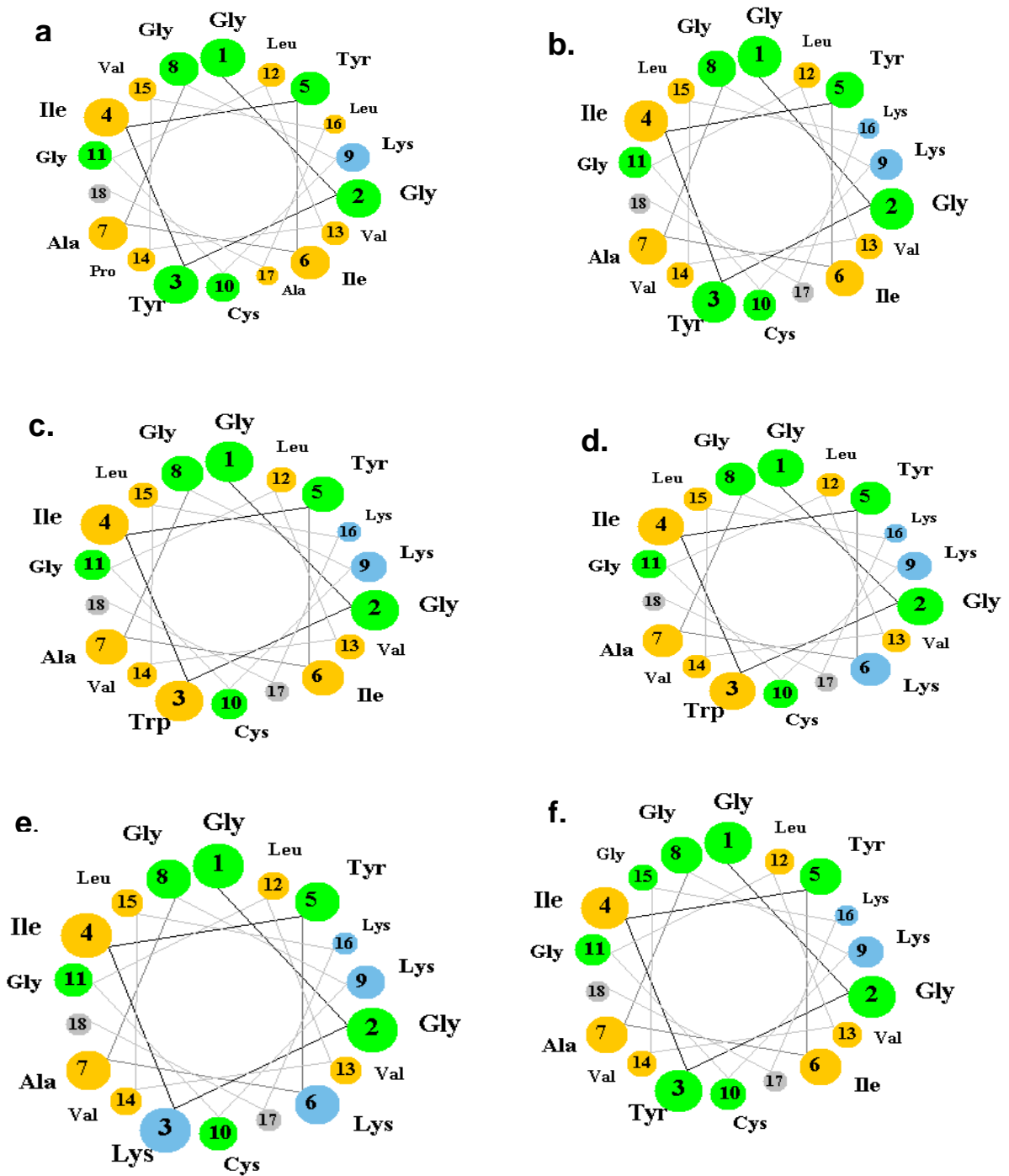
Péptido antimicrobiano	Actividad antimicrobiana frente a SARM	
	CMI <sub>50</sub> ±DS (µM)	CMI <sub>90</sub> ±DS (µM)
LA1	>100	>100
LA2	50 ±0.03	100 ±0.04
LA3	50 ±0.07	>100
LA4	100 ±0.04	>100
LA5	100 ±0.02	>100
LA6	25 ± 0.02	100 ± 0.02

**Fuente:** Autor

Finalmente, la actividad antibacteriana de los PAMs diseñados y sintetizados se le atribuye en gran parte a su estructura secundaria  $\alpha$ -hélice, la cual ha sido ampliamente reportado en la literatura como una relación estructura-actividad para PAMs (Brown & Hancock, 2006; Powers & Hancock, 2003). En el diagrama de helicoidal (Ver figura 25) 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.

Las concentraciones de cada péptido evaluadas y reportadas frente a *E. coli* O157:H7 y SARM en este trabajo de investigación no demostraron muerte del 100% del crecimiento bacteriano, es decir, no se obtuvieron concentración mínima bactericida, en comparación con el control positivo (bacteria crecida en medio de cultivo).

**Figura 25. Diagramas de rueda helicoidal de Edmunson:** a. LA1, b. LA2, c. LA3, d. LA4, e. LA5, f. LA6. Naranja: aminoácido no polar, Verde: aminoácido polar sin carga, Azul: aminoácido básico, gris: ausencia de aminoácido.



Fuente: Autor

#### 4.4.2 Actividad Antibacteriana de las Nps PLGA-LA6

Las Nps PLGA-LA6 obtenidas por la metodología de DESD se evaluaron frente a *E. coli* O157:H7 y SARM por microdilución en caldo. Para cada ensayo, se realizaron controles de Nps PLGA en ausencia de péptido para atribuir la acción antibacteriana únicamente al péptido LA6. De igual manera, se realizaron controles de Polietilenimina y Poloxamer a diferentes diluciones utilizadas en la síntesis de las Nps de PLGA-LA6, los cuales no presentaron inhibición significativa en el crecimiento bacteriano de las cepas modelo en las concentraciones finales esperadas en la suspensión de Nps PLGA-LA6, tal como se observa en los Anexos 8 y 9. De esta forma, se demostró que el sistema nanoestructurado en ausencia de péptido no posee actividad antimicrobiana (ver anexo 7).

Para realizar la actividad antimicrobiana de las Nps PLGA-LA6 se tomaron como referencias los valores de CMI del 50% para cada cepa modelo del péptido LA6 libre.

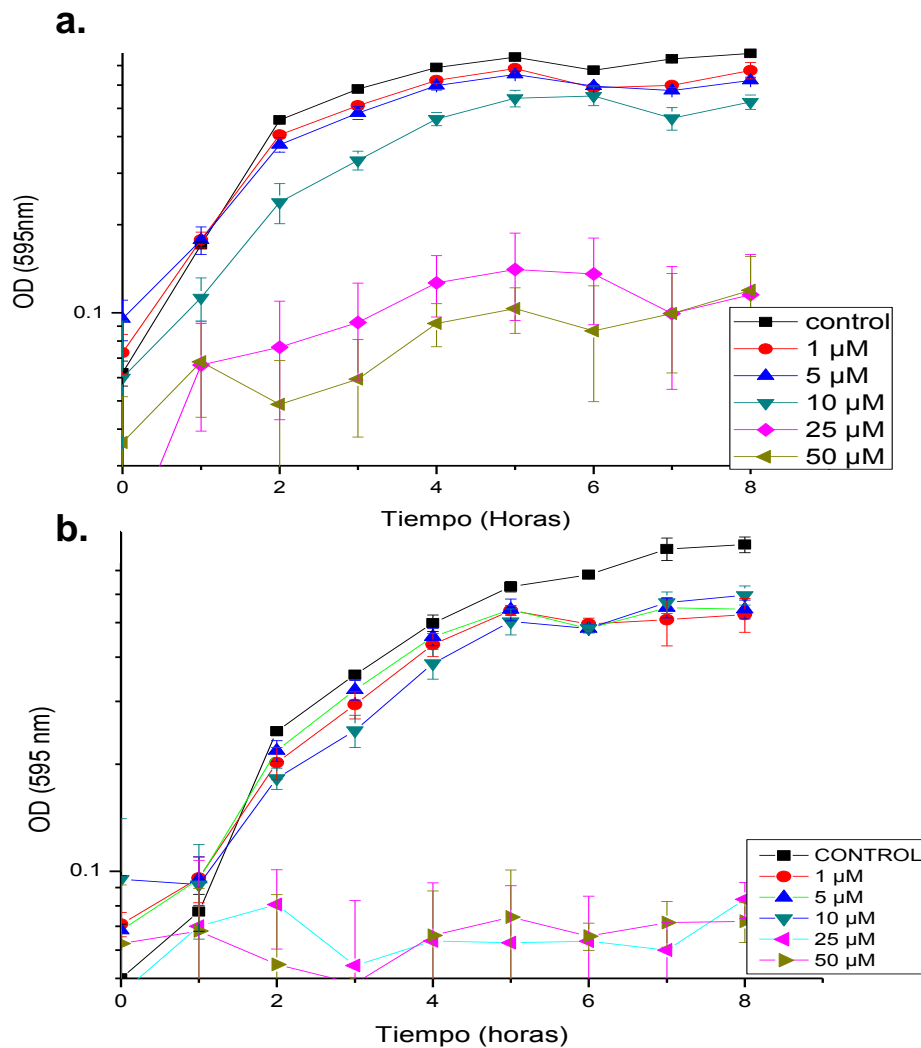
En la figura 26a se observa la cinética de crecimiento de las Nps de PLGA-LA6 frente a *E. coli* O157:H7, donde se observa una CMI del 50% y 90% de 25  $\mu$ M y 50  $\mu$ M, respectivamente, que en comparación al péptido libre fue dos veces más activo.

También se muestra en la figura 26b la cinética de crecimiento de las Nps de PLGA-LA6 frente a SARM, donde se observa una CMI del 50% de 10  $\mu$ M y una CMI del 99% de 25  $\mu$ M, y que respecto al péptido libre disminuye 2.5 veces el valor de CMI para esta cepa.

De esta manera, se demostró que las Nps PLGA-LA6 inhiben significativamente el crecimiento bacteriano a concentraciones más bajas respecto al péptido LA6 libre para ambas cepas modelo, lo que posiblemente se deba a un aumento en la biodisponibilidad del PAM en su diana de acción antimicrobiana (Ver tabla 11) y que las Nps PLGA permiten mantener la integridad conformacional del PAM (Kumari et al., 2010).

Las concentraciones de Nps PLGA-LA6 que demostraron una inhibición mayor del 90% del crecimiento bacteriano se evaluaron para determinar la CMB. Sin embargo, ninguna concentración evaluada mostro efecto bactericida, confirmando el efecto bacteriostático del péptido LA6 libre.

**Figura 26. Actividad antimicrobiana de las Nps PLGA-LA6 frente a: a. *Escherichia coli* O157:H7, b. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina por método de microdilución en caldo.** Todos los ensayos se realizaron por triplicado a 595 nm y se midió la densidad óptica (OD) durante 8 horas.



Fuente: Autor.

**Tabla 11.** Concentraciones mínimas inhibitorias de LA6 y Nps de PLGA-LA6 frente a *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. DS: desviación estándar

	<i>E. coli</i> O157:H7		SARM	
	CMI <sub>50±DS</sub> ( $\mu$ M)	CMI <sub>90±DS</sub> ( $\mu$ M)	CMI <sub>50±DS</sub> ( $\mu$ M)	CMI <sub>99±DS</sub> ( $\mu$ M)
<b>Nps de PLGA-LA6</b>	25 $\pm$ 0.04	50 $\pm$ 0.03	10 $\pm$ 0.03	25 $\pm$ 0.01
<b>LA6</b>	50 $\pm$ 0.01	100 $\pm$ 0.02	25 $\pm$ 0.02	100 $\pm$ 0.02

**Fuente:** Autor.

De lo anterior se concluye que sistemas de liberación de Nps de PLGA para fármaco peptídicos, como el candidato LA6 mejoran la acción antimicrobiana frente a cepas patógenas evaluadas en este trabajo. De igual forma la metodología utilizada de DESD permitió exitosamente sintetizar nanovehículos para moléculas anfipáticas como los péptidos diseñados.

## 5 CONCLUSIONES

- Se sintetizaron los nuevos PAMs basados en Lf por la metodología en fase sólida F-moc con pureza entre el 94- 98%.
- Los péptidos diseñados fueron más activos frente a *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina que el péptido base LA1.
- Los péptidos sintéticos LA4 y LA5 presentaron una CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> frente a *Escherichia coli* O157:H7, de 75 y 100 µM, respectivamente.
- Los péptidos sintéticos LA2 y LA3 presentaron una CMI<sub>50</sub> frente a *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina al usar una concentración de péptido de 50 y 100 µM, respectivamente. El péptido LA2 también presentó una CMI<sub>90</sub> a una concentración de 50 µM frente a SARM.
- El péptido LA6 (GGYIYIAGKCGLVVGGK) presentó la mayor actividad antibacteriana para *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, alcanzando un CMI<sub>50</sub> de 50 y 25 µM, respectivamente, y un CMI<sub>90</sub> de 100 µM para *E. coli* O157:H7 y 50 µM para SARM.
- El aumento de la actividad antimicrobiana de los PAMs LA4, LA5 y LA6 sobre *Escherichia coli* O157:H7 se debió posiblemente al aumento en la carga neta positiva del péptido por adición del aminoácido Lisina (K).
- Se demostró que en un ambiente simulado de membrana, los PAMs LA1 a LA6 presentaron estructura secundaria  $\alpha$ -hélices anfipáticas
- Utilizando la metodología de Doble emulsión/Difusión de solvente se logró obtener nanopartículas sin aglomerados de forma ovalada con tamaño promedio de 227.4 nm y carga superficial de +7.98 mV.
- Las nanopartículas PLGA- LA6 fueron más efectivas frente a las dos cepas estudiadas en comparación con el péptido libre.
- Las nanopartículas de PLGA-LA6 disminuyeron el valor de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> del péptido LA6 frente a *Escherichia coli* O157:H7 a 25 y 50 µM, respectivamente. Mientras que frente a *Staphylococcus aureus* resistente a

la metilina el valor de  $CMI_{50}$  y  $CMI_{90}$  fueron de 10 y 25  $\mu M$ , respectivamente.

## 6 RECOMENDACIONES

- Evaluar la actividad antimicrobiana de los PAMs diseñados frente a diferentes microorganismos debido a que solo se evaluó su efecto antibacteriano sobre las cepas estudiadas y se predijeron como PAMs lo que involucra distintos microorganismos, por ejemplo *Candida albicans*.
- Realizar los ensayos de citotoxicidad en líneas celulares de eritrocitos o Fibroblastos para los PAMs con mayor actividad antibacteriana.
- Funcionalizar los PAMs con nanopartículas de oro y/o plata para evaluar su actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *E. coli* O157:H7 y SARM para determinar si existe algún efecto sinérgico.
- Estudiar las interacciones de los PAMs diseñados y de las Nps de PLGA-LA6 con la membrana bacteriana de las cepas estudiadas mediante Espectroscopía de Fluorescencia empleado marcadores Fluorescente u otra técnica
- Obtener imágenes de las bacterias *E. coli* O157:H7 y SARM por Microscopía Electrónica de transmisión antes y después de la acción del péptido sobre las bacterias.
- Determinar el tipo de nanoencapsulado de las Nps PLGA-péptido utilizando un marcador Fluorescente
- Optimizar mediante un diseño experimental la carga de péptido sobre las Nps de PLGA.
- Determinar mediante el uso de sondas como Sytox Green o Bisoxonol la formación de poros transitorios o permeabilización de la membrana bacteriana.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M. (2004). *HPLC of Peptides and proteins: Methods and protocols* (Vol. 251, pp. 3–10).
- Aliste, M. P., Maccallum, J. L., & Tieleman, D. P. (2003). Molecular Dynamics Simulations of Pentapeptides at Interfaces : Salt Bridge and, 8976–8987.
- Alvarez, C. a, Guzmán, F., Cárdenas, C., Marshall, S. H., & Mercado, L. (2014). Antimicrobial activity of trout hepcidin. *Fish & Shellfish Immunology*, (May), 1–9.
- Biosystems, A. (1997). *Cleavage , Deprotection , and Isolation of Peptides after Fmoc Synthesis* (pp. 1–12).
- Bond, P. J., Parton, D. L., Clark, J. F., & Sansom, M. S. P. (2008). Coarse-grained simulations of the membrane-active antimicrobial Peptide maculatin 1.1. *Biophysical Journal*, 95(8), 3802–15.
- Brouwer, C. P. J. M., Rahman, M., & Welling, M. M. (2011). Discovery and development of a synthetic peptide derived from lactoferrin for clinical use. *Peptides*, 32(9), 1953–63.
- Brown, K. L., & Hancock, R. E. W. (2006). Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology*, 18(1), 24–30.
- Chan, D. I., Prenner, E. J., & Vogel, H. J. (2006). Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(9), 1184–202.
- Cohen-Sela, E., Chorny, M., Koroukhov, N., Danenberg, H. D., & Golomb, G. (2009a). A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 133(2), 90–5.
- Cohen-Sela, E., Chorny, M., Koroukhov, N., Danenberg, H. D., & Golomb, G. (2009b). A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 133(2), 90–5.
- Cruz, J., Ortiz, C., Guzmán, F., Cárdenas, C., Fernandez-Lafuente, R., & Torres, R. (2014). Design and activity of novel lactoferrampin analogues against O157:H7 enterohemorrhagic escherichia coli. *Biopolymers*, 101(4), 319–28.

- Cruz, J., Ortiz, C., Guzmán, F., Fernández-Lafuente, R., & Torres, R. (2014). Antimicrobial peptides: promising compounds against pathogenic microorganisms. *Current Medicinal Chemistry*, 21(20), 2299–321.
- Cubellis, M. V., Cailliez, F., & Lovell, S. C. (2005). Secondary structure assignment that accurately reflects physical and evolutionary characteristics. *BMC Bioinformatics*, 6 Suppl 4, S8.
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., & Prémat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 161(2), 505–22.
- Dave, K. a, Headlam, M. J., Wallis, T. P., & Gorman, J. J. (2011). Preparation and analysis of proteins and peptides using MALDI TOF/TOF mass spectrometry. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan ... [et Al.]*, Chapter 16(February), Unit 13.
- Des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y.-J., & Prémat, V. (2006). Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 116(1), 1–27.
- Du, J. (2003). Rearrangement mechanism of the sodium adducts of Fmoc protected amino acids. *Chinese Science Bulletin*, 48(21), 2317.
- Engler, A. C., Wiradharma, N., Ong, Z. Y., Coady, D. J., Hedrick, J. L., & Yang, Y.-Y. (2012). Emerging trends in macromolecular antimicrobials to fight multi-drug-resistant infections. *Nano Today*, 7(3), 201–222.
- Fjell, C. D., Hiss, J. a, Hancock, R. E. W., & Schneider, G. (2012). Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 11(1), 37–51.
- Fothergill, A. W. (2012). Interactions of Yeasts, Moulds, and Antifungal Agents, 65–75.
- Gaggini, F., Porcheddu, A., Reginato, G., Rodriguez, M., & Taddei, M. (2004). Colorimetric tools for solid-phase organic synthesis. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 6(5), 805–10.
- Giuliani, A., Pirri, G., & Nicoletto, S. F. (2007). *Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics*. *Central European Journal of Biology* (Vol. 2, pp. 1–33).

- González-chávez, S. A., Arévalo-gallegos, S., & Rascón-cruz, Q. (2009). International Journal of Antimicrobial Agents Lactoferrin: structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33, 301.e1 – 301.e8.
- Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, 1(6), 2876–90.
- Guy, B. C. A., & Fields, G. B. (1997). [5] CLEAVAGE AND DEPROTECTION AFTER Fmoc SPPS 67, 289(1990), 1–3.
- Guzman, F., Barberis, S., & Illanes, A. (2007). Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(2).
- Hancock, R. E. W., & Sahl, H.-G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, 24(12), 1551–7.
- Haney, E. F., Lau, F., & Vogel, H. J. (2007). Solution structures and model membrane interactions of lactoferrampin, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768(10), 2355–64.
- Haney, E. F., Nazmi, K., Lau, F., Bolscher, J. G. M., & Vogel, H. J. (2009). Novel lactoferrampin antimicrobial peptides derived from human lactoferrin. *Biochimie*, 91(1), 141–54.
- Herr, A., Molho, J., Santiago, J., Mungal, M., Kenny, T., & Garguilo, M. (2000). Electroosmotic capillary flow with nonuniform zeta potential. *Analytical Chemistry*, 72(5), 1053–7.
- Hocquellet, A., Odaert, B., Cabanne, C., Noubhani, A., Dieryck, W., Joucla, G., ... Costaglioli, P. (2010). Structure-activity relationship of human liver-expressed antimicrobial peptide 2. *Peptides*, 31(1), 58–66.
- Hoo, C. M., Starostin, N., West, P., & Mecartney, M. L. (2008). A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(S1), 89–96.
- Houghten, R. A. (1985). General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids *Immunology*: Houghten, 82(August), 5131–5135.
- Huh, A. J., & Kwon, Y. J. (2011). “Nanoantibiotics”: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal*

*of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 156(2), 128–45.

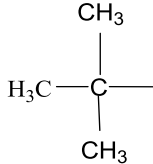
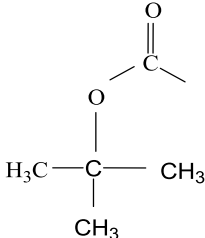
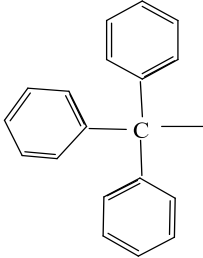
- Jürsen, G. (2004). *Mass Spectrometry* (Springer., pp. 88–92). Heidelberg Germany.
- Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1751(2), 119–39.
- Kraus, D., & Peschel, a. (2006). Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 306, 231–50.
- Krchňák, V., Vägner, J., Pavel, S., & Lebl, M. (1988). NONINVASIVE CONTINUOUS MONITORING OF SOLID-PHASE PEPTIDE SYNTHESIS BY ACID-BASE INDICATOR\* Viktor KRCHNAK“, Josef VAGNER“, Pavel SAFAR“ and Michal LEBL.” *Collection Czechslovak Chem. Commun*, 53, 1965–1988.
- Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 75(1), 1–18.
- Lata, S., Sharma, B. K., & Raghava, G. P. S. (2007). Analysis and prediction of antibacterial peptides. *BMC Bioinformatics*, 8, 263.
- Lee, M.-T., Hung, W.-C., Chen, F.-Y., & Huang, H. W. (2008). Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(13), 5087–92.
- Liu, L., Fang, Y., Huang, Q., Pan, Q., & Wu, J. (2008). A New Structure-Activity Relationship of Linear Cationic  $\alpha$ -helical Antimicrobial Peptides, 167–170.
- Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 3(3), 1377–1397.
- Mattison, K., Morfesis, A., & Kaszuba, M. (2003). A Primer on Particle Sizing Using Dynamic Light Scattering, (December).
- Mishra, B., Leishangthem, G. D., Gill, K., Singh, A. K., Das, S., Singh, K., ... Dey, S. (2013). A novel antimicrobial peptide derived from modified N-terminal domain of bovine lactoferrin: design, synthesis, activity against multidrug-resistant bacteria and *Candida*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828(2), 677–86.

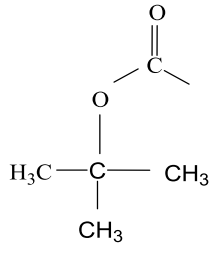
- Oesterlin, C. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of. In *Synthesis of a Tetrapeptide* (pp. 2149–2154).
- Oren, Z. (1999). Mode of Action of Linear Amphipathic  $\alpha$ -Helical. *Inc. Biopoly*, 47, 451–463.
- Perez-Iratxeta, C., & Andrade-Navarro, M. a. (2008). K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC Structural Biology*, 8, 25.
- Powers, J.-P. S., & Hancock, R. E. W. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24(11), 1681–91.
- Serrano, M. E. D. (2006). Actividades antibacterianas de lactoferrina Resumen Introducción Propiedades antimicrobianas de Lf Características estructurales y distribución de lactoferrina, 26(2), 58–63.
- Silva, a L., Rosalia, R. a, Sazak, a, Carstens, M. G., Ossendorp, F., Oostendorp, J., & Jiskoot, W. (2013a-b). 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 : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 83(3), 338–45.
- Sohani, O. R., & Gaikwad, U. B. (2013). Nanoencapsulation system for delivery of protein and peptide-A review, 2(2), 58–64.
- Su, Y., Doherty, T., Waring, A. J., Ruchala, P., & Hong, M. (2010). Roles of Arginine and Lysine Residues in the translocation of a cell- Penetrating Peptide from 13C, 31P, 19F Solid-State NMR. *Biochemistry*, 48(21), 4587–4595.
- Tossi, a, Tarantino, C., & Romeo, D. (1997). Design of synthetic antimicrobial peptides based on sequence analogy and amphipathicity. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 250(2), 549–58.
- Van der Kraan, M. I. a, Groenink, J., Nazmi, K., Veerman, E. C. I., Bolscher, J. G. M., & Nieuw Amerongen, A. V. (2004). Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides*, 25(2), 177–83.
- Vila-Farrés, X., Giralt, E., & Vila, J. (2012). Update of peptides with antibacterial activity. *Current Medicinal Chemistry*, 19(36), 6188–98.
- Walker, J. M., Protocols, P. S., & Pennington, M. W. (1994). *Peptide Synthesis Protocols Methods in Molecular Biology* (Vol. 35, pp. 17–63).

- Wieber, A., Selzer, T., & Kreuter, J. (2011a-b). Characterisation and stability studies of a hydrophilic decapeptide in different adjuvant drug delivery systems: a comparative study of PLGA nanoparticles versus chitosan-dextran sulphate microparticles versus DOTAP-liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 421(1), 151–9.
- Won, H.-S., Kang, S.-J., & Lee, B.-J. (2009). Action mechanism and structural requirements of the antimicrobial peptides, gaegurins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(8), 1620–9.
- Wu, L., Zhang, J., & Watanabe, W. (2011). Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(6), 456–69.
- Yadav, S. C., Kumari, A., & Yadav, R. (2011). Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation. *Peptides*, 32(1), 173–87.
- Yang, J., Spek, E. J., Gong, Y., Zhou, H., & Kallenbach, N. R. (1997). The role of context on alpha-helix stabilization: host-guest analysis in a mixed background peptide model. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 6(6), 1264–72.
- Zelezetsky, I., & Tossi, A. (2006). Alpha-helical antimicrobial peptides--using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(9), 1436–49.
- Zhang, L., Rozek, a, & Hancock, R. E. (2001). Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(38), 35714–22.

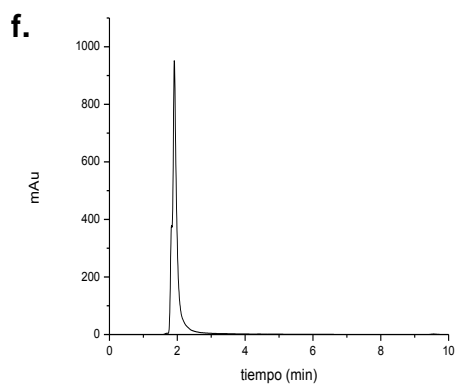
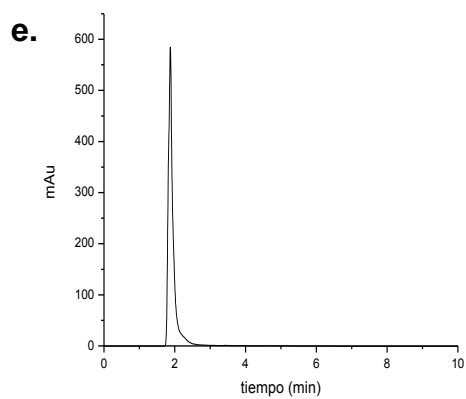
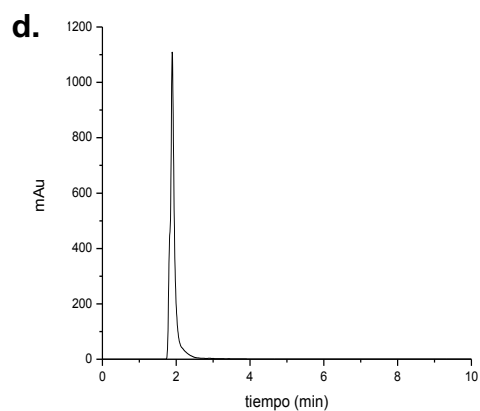
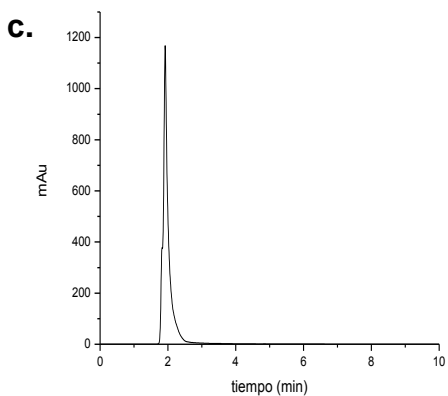
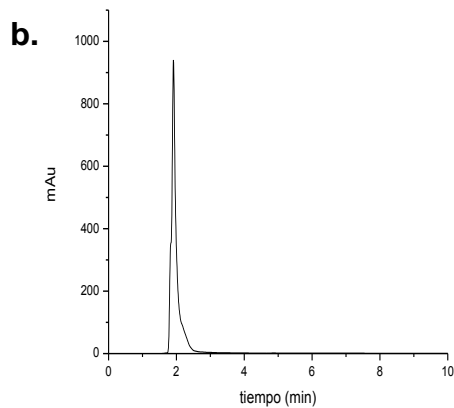
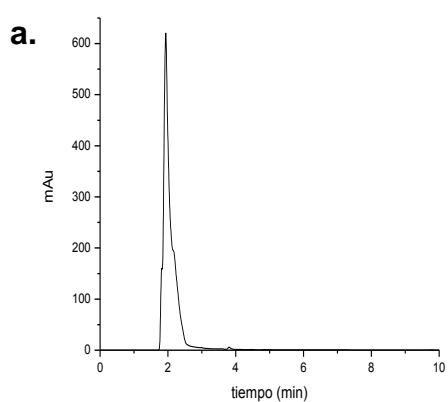
## ***ANEXOS***

**Anexo A.** Grupos protectores empleados en la estrategia Fmoc/tBu. Todos los aminoácidos presente el grupo F-moc en el grupo amino terminal. NP: no presenta.

Protector	Aminoácido	Estructura
NP	Glicina, Gly, G Fmoc-Gly-OH	
tBu	Tirosina, Tyr, Y Fmoc-Tyr(tBu)-OH	
NP	Isoleucina, Ile, I Fmoc-Ile-OH	
NP	Alanina, Ala, A Fmoc-Ala-OH	
Boc	Triptófano, Trp, W Fmoc-Trp(Boc)-OH	
Trt	Cisteína, Cys, C Fmoc-Cys(Trt)-OH	
NP	Leucina, Leu, L Fmoc-Leu-OH	

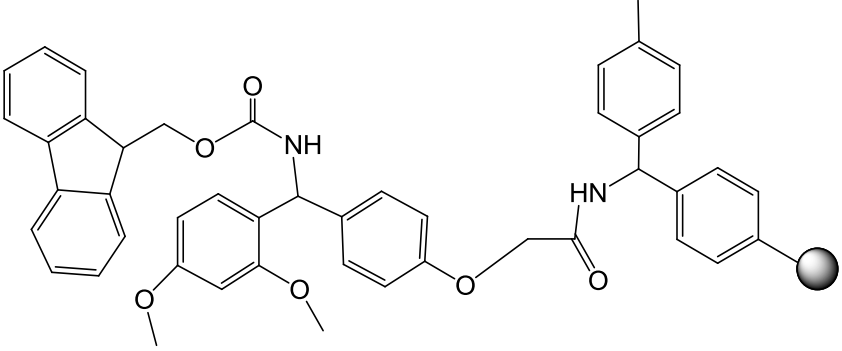
Boc	Lisina, Lys, K Fmoc-Lys(Boc)-OH	
NP	Valina, Val, V. Fmoc-Val-OH	
NP	Prolina, Prol, P Fmoc-Pro-OH	

**Anexo B. Cromatogramas de los PAMs sintéticos basados en Lf: a. LA1, b. LA2, c. LA3, d. LA4, e) LA5 y f) LA6. Fase estacionaria: Columna C- 18 Agilent y Fase móvil 70:30, ACN: H<sub>2</sub>O con 0.01% (V/V) TFA a 220 nm.**

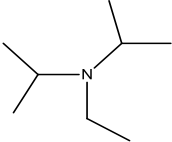
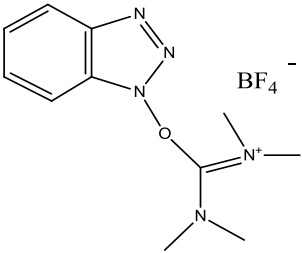
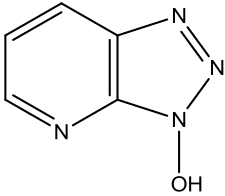
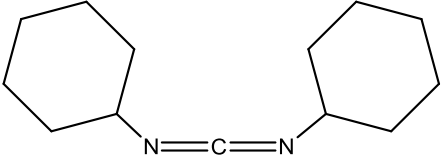


**Fuente: Autor.**

**Anexo C.** Soporte sólido utilizado en la síntesis de péptidos en fase sólida.

Nombre	Estructura
Resina Rink amida MBHA	 <p>The chemical structure shows a resin support (represented by a grey sphere) attached to a 4-aminobenzoyl group. This group is linked via an amide bond to a 2-(2,4,6-trimethoxyphenyl)ethylamine moiety. The nitrogen of this secondary amine is further connected to a 2-(1,3-benzodioxol-5-yl)ethyl group, which is the Rink linker.</p>

**Anexo D.** Agente de condensación y aditivos empleados en la síntesis de péptidos en fase sólida F-moc.

Nombre	Abreviación	Estructura
N,N'-diisopropiletilamina	DIPEA	
Tetrafluorobato de (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio	TBTU	
1-Hidroxi-7-azabenzotriazol	HOAt	
N, N'-diciclohexilcarbodiimida	DCC	

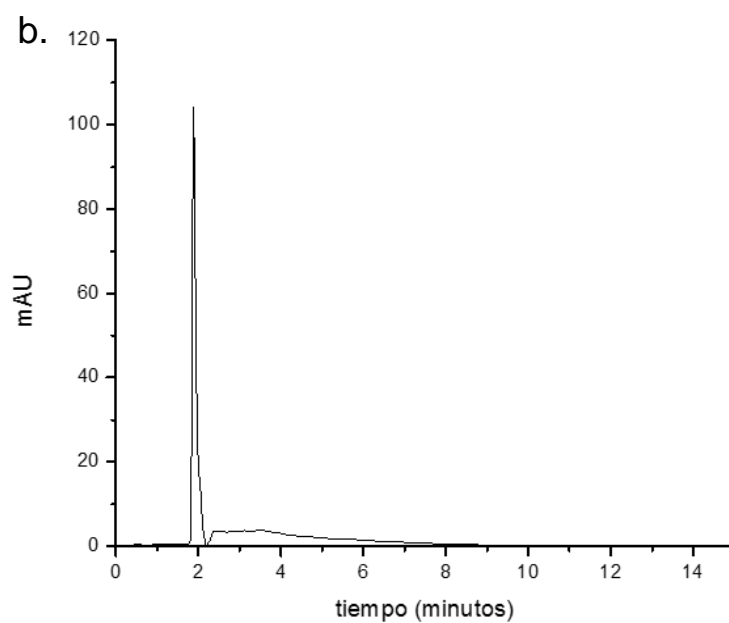
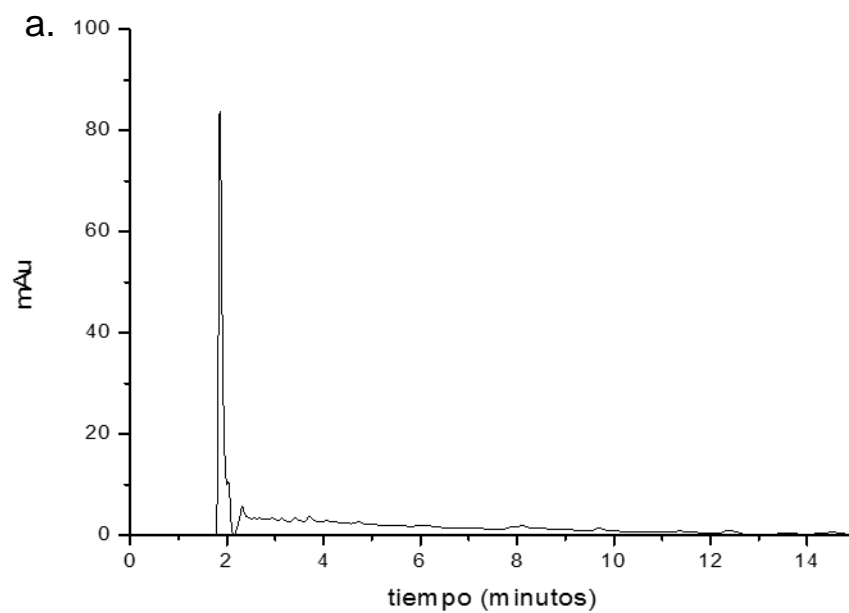
**Anexo E.** Tabla de L número de acceso de las secuencias de Lactoferrina con identidad por encima del 90% de la base de datos de la NCBI.

<b>Nº de acceso</b>	<b>Origen</b>
<u>XP_005669896.1</u>	<i>Sus scrofa</i>
<u>XP_004329553.1</u>	<i>Tursiops truncatus</i>
<u>EPY73426.1</u>	<i>Camelus ferus</i>
<u>AAF82241.1</u>	<i>Camelus dromedarius</i>
<u>XP_006200784.1</u>	<i>Vicugna pacos</i>
<u>XP_004419670.1</u>	<i>Ceratotherium simum simum</i>
<u>XP_005348066.1</u>	<i>Microtus ochrogaster</i>
<u>XP_004278970.1</u>	<i>Orcinus orca</i>
<u>AAF05442.1</u>	<i>Equus caballus</i>
<u>XP_003766655.1</u>	<i>Sarcophilus harrisii</i>
<u>XP_004664256.1</u>	<i>Jaculus jaculus</i>
<u>XP_007457632.1</u>	<i>Lipotes vexillifer</i>
<u>XP_007110315.1</u>	<i>Physeter catodon</i>
<u>XP_008154806.1</u>	<i>Eptesicus fuscus</i>
<u>EPQ14459.1</u>	<i>Myotis brandtii</i>
<u>EFB18587.1</u>	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>
<u>XP_006759720.1</u>	<i>Myotis davidii</i>
<u>ELK16729.1</u>	<i>Pteropus alecto</i>
<u>XP_006097173.1</u>	<i>Myotis lucifugus</i>
<u>XP_006051478.1</u>	<i>Bubalus bubalis</i>
<u>XP_005907899.1</u>	<i>Bos mutus</i>
<u>XP_005201995.1</u>	<i>Bos taurus</i>
<u>ACJ03828.1</u>	<i>Bos grunniens</i>
<u>XP_005966646.1</u>	<i>Pantholops hodgsonii</i>
<u>XP_005675608.1</u>	<i>Capra hircus</i>
<u>XP_004003379.1</u>	<i>Ovis aries</i>
<u>XP_004682510.1</u>	<i>Condylura cristata</i>
<u>XP_003794617.1</u>	<i>Otolemur garnettii</i>
<u>XP_005075151.1</u>	<i>Mesocricetus auratus</i>
<u>XP_002713370.1</u>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
<u>XP_006975579.1</u>	<i>Peromyscus maniculatus bairdii</i>
<u>ACL80331.1</u>	<i>Mus musculus</i>

<u>ACY01187.1</u>	<i>Bos indicus</i>
<u>ABD49105.1</u>	<i>Bos grunniens</i>
<u>XP_006745335.1</u>	<i>Leptonychotes weddellii</i>
<u>EAW79171.1</u>	<i>Homo sapiens</i>
<u>AAD38331.1</u>	<i>Trichosurus vulpecula</i>
<u>O77698.1</u>	<i>Bubalus bubalis</i>
<u>XP_534268.3</u>	<i>Canis lupus familiaris</i>

**Fuente: NCBI.**

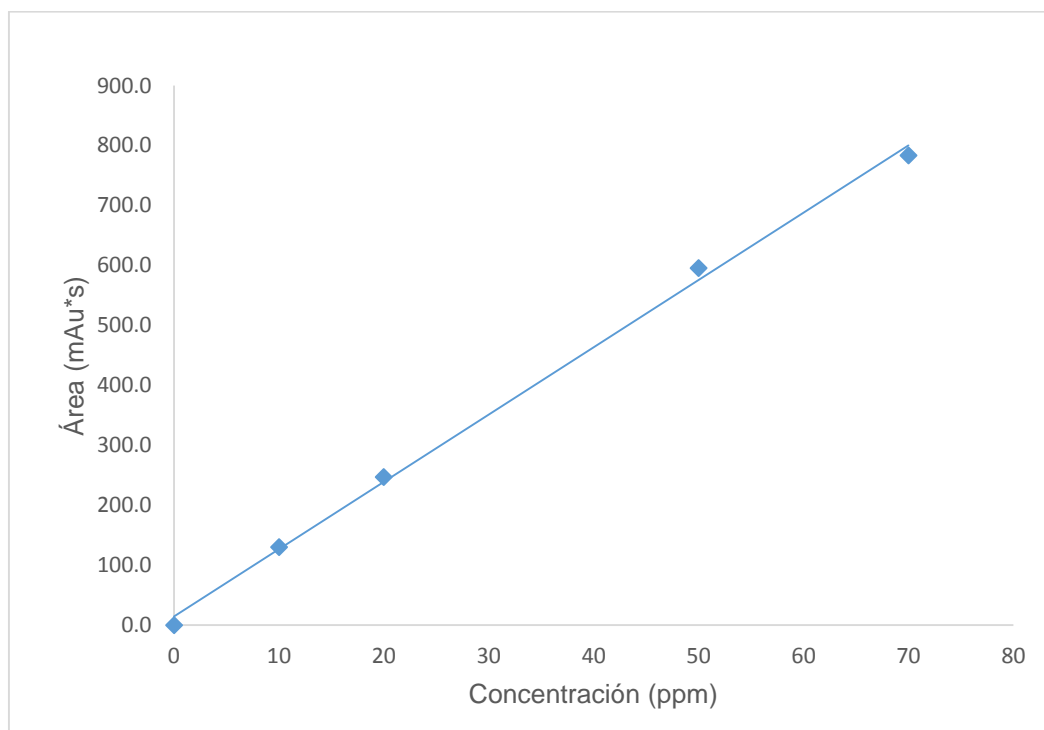
**Anexo F. Cromatogramas y curva de calibración del PAM LA6 por RP-HPLC.**



**Cromatograma de: a. Cuantificación de las Nps de PLGA-LA6. b. Patrón de 70 ppm de la curva de calibración del péptido LA6. Fase estacionaria: Columna**

C- 18 Agilent y Fase móvil Isocrática: 70:30, ACN:H<sub>2</sub>O con 0.01% (V/V) TFA a 220 nm.

### Curva de calibración

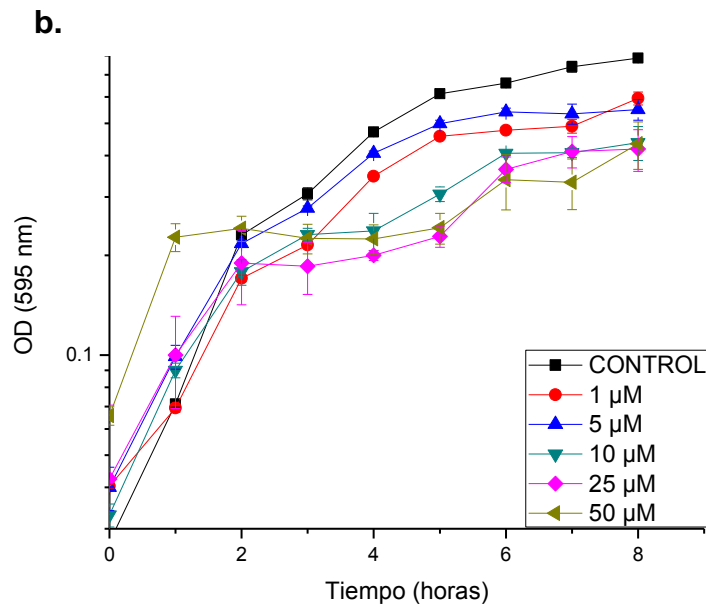
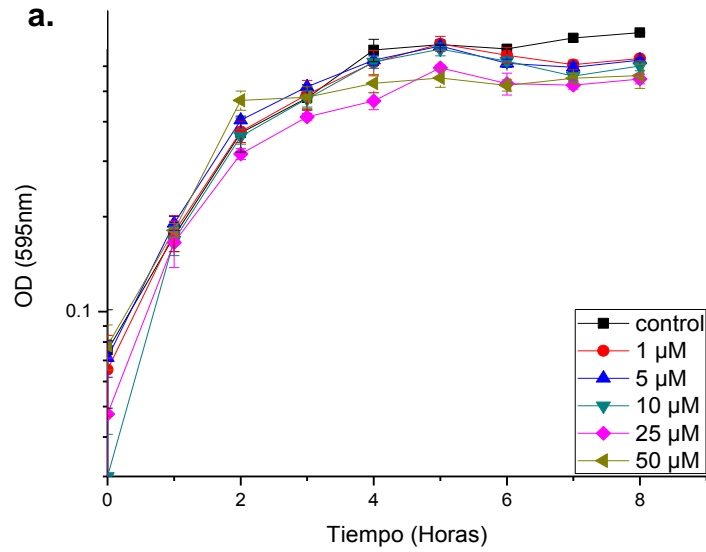


**Ecuación:**  $y = 11.23 + 14.5x$ , Regresión Lineal:  $R^2 = 0.998$ .

Nombre	Área (mAu*s)	Concentración (PPM)
Extracción	726.8	63.43

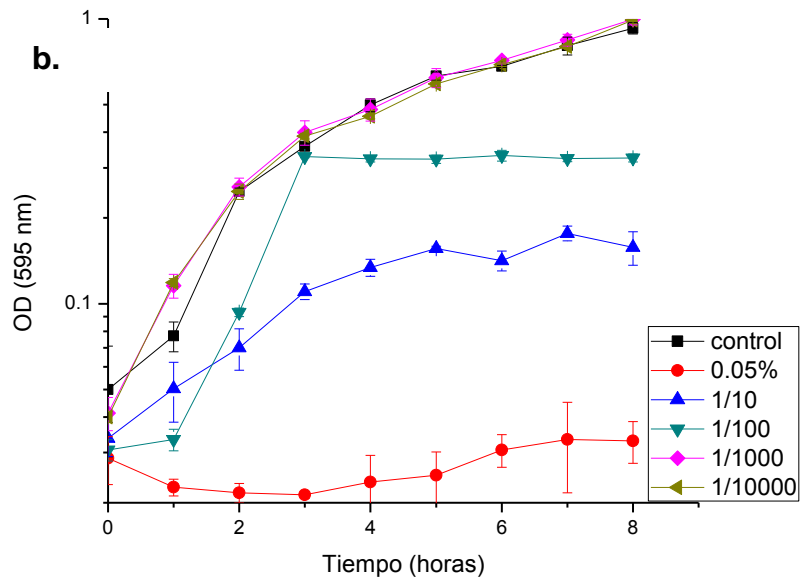
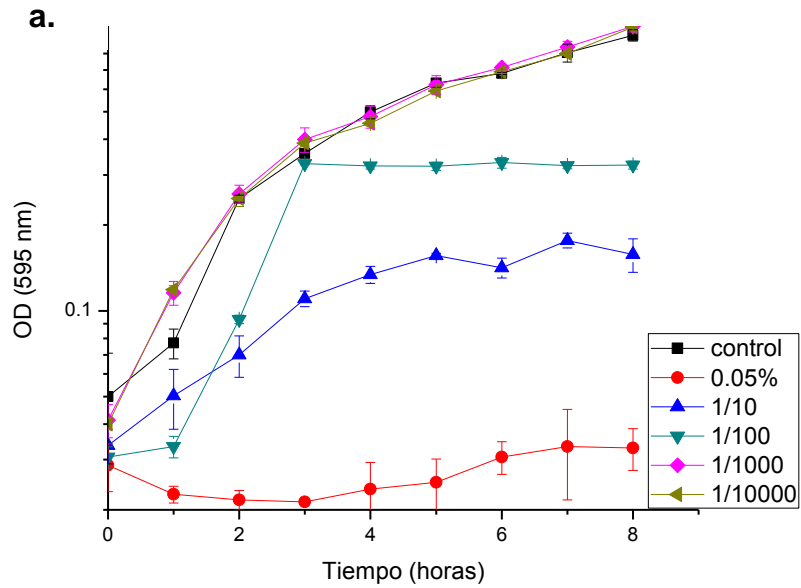
**Fuente:** Autor.

**Anexo G.** Actividad antimicrobiana de Nps de PLGA en ausencia de péptido LA6 frente a: **a.** *Escherichia coli* O157:H7, **b.** *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.



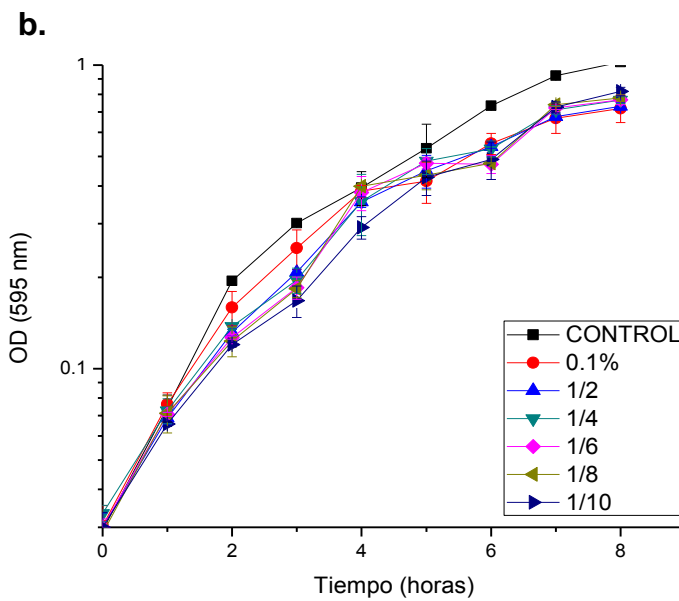
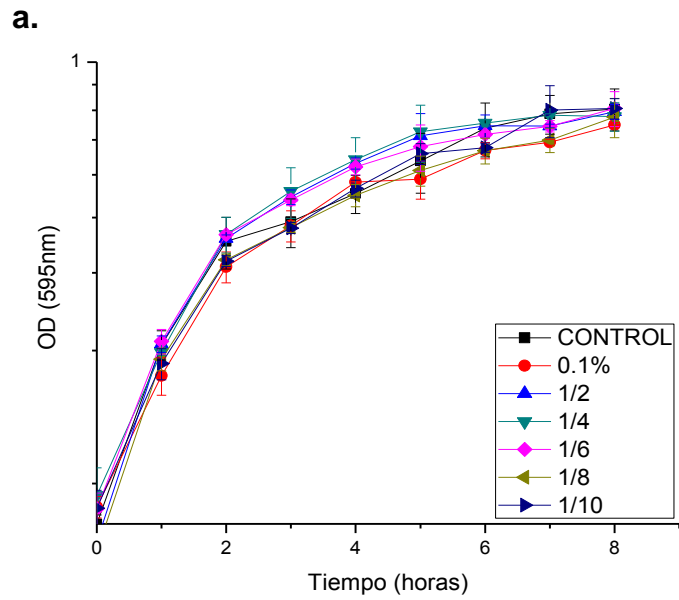
Fuente: Autor.

**Anexo H.** Actividad antimicrobiana de Polietilenimina a diferentes diluciones frente a: **a.** *Escherichia coli* O157:H7, **b.** *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. (Concentración inicial de Polietilenimina: 0.05% P/V).



Fuente: Autor.

**Anexo I.** Actividad antimicrobiana de Poloxamer a diferentes diluciones frente a: **a.** *Escherichia coli* O157:H7, **b.** *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. (Concentración inicial de poloxamer: 0.1% P/V).



Fuente: Autor.