

**PEVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Y *Escherichia coli* K-12 DE PÉPTIDOS ANÁLOGOS AL PÉPTIDO Ib-AMP4 ENCAPSULADOS EN PELLETS DE POLIVINIL ALCOHOL (PVA) Y SOPORTADOS SOBRE ÓXIDOS MESOPOROSOS DE Al(III)-Mg(II)**

**Qca. Johanna Marcela Flórez Castillo**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Química**

**Doctorado en Química**

**Bucaramanga**

**2016**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Y *Escherichia coli* K-12 DE PÉPTIDOS ANÁLOGOS AL PÉPTIDO Ib-AMP4 ENCAPSULADOS EN PELLETS DE POLIVINIL ALCOHOL (PVA) Y SOPORTADOS SOBRE ÓXIDOS MESOPOROSOS DE Al(III)-Mg(II)**

**Qca. Johanna Marcela Flórez Castillo**

**Trabajo de grado presentado para optar por el título de**

**Doctora en Química**

**Director:**

**Dr. Hermínsul de Jesús Cano Calle**

**Co-Director:**

**Dr. Matias Jobbágy**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Química**

**Doctorado en Química**

**Bucaramanga**

**2016**

## DEDICATORIA

*A Dios quien durante toda mi vida ha puesto en mi camino a las personas indicadas para alcanzar mis logros personales y profesionales.*

*A Jose Luis, quien más que mi esposo ha sido mi amigo, mi confidente y mi gran fortaleza para superar los obstáculos y disfrutar los triunfos. Además junto a ti he alcanzado el logro más grande en mi vida.*

*A Mafe, mi hija y mi logro más grande. Haz sido mi motivación y mi alegría desde el momento en que comencé a soñarte.*

## AGRADECIMIENTOS

*Esta investigación fue realizada gracias a la financiación de:*

**COLCIENCIAS** a través del programa “*Apoyo a Doctorados Nacionales*” del año 2009.

La **DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN DE FACULTAD (DIEF) DE CIENCIAS** de la Universidad Industrial de Santander a través de los proyectos 5182 y 1352.

*Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a:*

Dr. Herminsul Cano por aceptar la dirección de este trabajo.

Matias y Mercedes por su enorme colaboración durante mi estancia en el Instituto de Química Física de los Materiales, Medioambiente y Energía-INQUIMAE. Sin ustedes gran parte de este trabajo no hubiese sido posible.

A los miembros del INQUIMAE, Cecilia “Cesped”, Cecilia “Chechu”, Diego, Ana, Carla, Miguel y Noé quienes me recibieron con cariño e hicieron de mi estancia en Argentina algo inolvidable.

Dr. Jose Antonio Henao y al equipo de trabajo del laboratorio de difracción de rayos X del parque tecnológico de Guatiguara, por su apoyo en la obtención de los difractogramas presentados en este trabajo.

Dra. XXXXXXXX por su colaboración en la obtención de las imágenes de microscopía electrónica de barrido mostradas en este trabajo.

A mis amigos Jessika, Andrés, Jenny, Angelita y Sharon por su compañía y buenos momentos.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN	22
<b>CAPITULO 1. FUNDAMENTO TEÓRICO</b>	<b>34</b>
1.1. MONILIASIS DEL CACAO	35
1.2. <i>Escherichia coli</i>	35
1.3. CRECIMIENTO BACTERIANO	36
1.4. MEMBRANA EXTERNA DE <i>Escherichia coli</i>	40
1.5. PARED Y MEMBRANA CELULAR EN HONGOS Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PÉPTIDO ANTIFÚNGICOS	42
1.6. SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA DE PÉPTIDOS	43
1.6.1. Mecanismo de protección Fmoc/tBu	45
1.6.2. Resinas para SPPS: resina Rink Amida	46
1.6.3. Unión del primer aminoácido al soporte sólido	48
1.7. REFERENCIAS	48
<b>CAPITULO 2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIAL CONTRA <i>Escherichia coli</i> K-12 y <i>Moniliophthora roreri</i> (Cif &amp; Par) DEL PÉPTIDO Ib-AMP4 Y SUS ANÁLOGOS SINTÉTICOS</b>	<b>57</b>
2.1. METODOLOGÍA	63
2.1.1. Síntesis en fase sólida de los péptidos análogos al Ib-AMP4	63
2.1.2. Síntesis en fase sólida del péptido Ib-AMP4	64
2.1.3. Purificación y caracterización del péptido Ib-AMP4 y sus análogos	64
2.1.4. Condiciones de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> K-12	64
2.1.5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del péptido Ib-AMP4 y sus análogos	65
2.1.6. Aislamiento de <i>Moniliophthora roreri</i>	65
2.1.7. Determinación de la inhibición del crecimiento micelial del péptido Ib-AMP4 y sus análogos	66
2.1.8. Determinación de la actividad hemolítica de los péptidos análogos Ib-M6 e Ib-A4	66
2.2. RESULTADOS Y ANÁLISIS	67

2.2.1.	Síntesis en fase sólida del péptido Ib-AMP4 y sus análogos	67
2.2.2.	Purificación y caracterización del péptido Ib-AMP4 y sus análogos	68
2.2.3.	Determinación de la actividad antibacteriana contra <i>Escherichia coli K-12</i>	72
2.2.4.	Aislamiento de <i>Moniliophthora roreri (Cif &amp; Par)</i>	76
2.2.5.	Determinación de la actividad antifúngica contra <i>Moniliophthora roreri (Cif &amp; Par)</i> del péptido Ib-AMP4 y sus análogos	78
2.2.6.	Determinación de la actividad hemolítica de los péptidos Ib-M6 e Ib-A4	80
2.3.	CONCLUSIONES	81
2.4.	REFERENCIAS	81
	<b>CAPITULO 3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIAL CONTRA <i>Escherichia coli K-12</i> Y <i>Moniliophthora roreri (Cif &amp; Par)</i> DE LOS PÉPTIDOS Ib—M6 E Ib-A4 ENCAPSULADOS EN PELLETS DE ALCOHOL POLIVINÍLICO (PVA)</b>	<b>90</b>
3.1.	METODOLOGÍA	94
3.1.1.	Preparación de los pellets de PVA-cristal violeta	94
3.1.2.	Caracterización morfológica de los pellets de PVA	94
3.1.3.	Determinación de la cinética de liberación del cristal violeta desde los pellets de PVA	94
3.1.4.	Preparación de los pellets 50P25-M6 y 50P25-A4	95
3.1.5.	Determinación de la actividad antibacteriana contra <i>Escherichia coli K-12</i> de los pellets 50P25-M6	96
3.1.6.	Determinación de la actividad antifúngica contra <i>Moniliophthora roreri (Cif &amp; Par)</i> de los pellets 50P25-A4	96
3.2.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	96
3.2.1.	Caracterización morfológica de los pellets	96
3.2.2.	Cinética de liberación del cristal violeta desde los pellets de PVA	98
3.2.3.	Actividad antimicrobial de los pellets 50P25-M6 y 50P25-A4	99
3.3.	CONCLUSIONES	101
3.4.	REFERENCIAS	102
	<b>CAPÍTULO 4. PREPARACIÓN DE ÓXIDOS MESOPOROSOS DE Al(III)-Mg(II) COMO SOPORTES DE LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIALES Ib-M6 E Ib-A4</b>	<b>111</b>
4.1.	METODOLOGÍA	117
4.1.1.	Preparación de los óxidos mesoporosos de Al(III)-Mg(II)	117

4.1.2.	Caracterización de los óxidos mesoporosos de Al(III)-Mg(II)	118
4.1.3.	Impregnación de los óxidos mesoporosos de Al(III)-Mg(II) con los péptidos Ib-M6 e Ib-A4	118
4.1.4.	Determinación del porcentaje de liberación de los péptidos Ib-M6 e Ib-A4 desde los óxidos mesoporosos sintetizados.	119
4.1.5.	Determinación de la actividad antifúngica contra <i>Moniliophthora rorei</i> de los péptidos Ib-M6 e Ib-A4 atrapados en los óxidos mesoporosos preparados	119
4.2.	<b>RESULTADOS Y ANÁLISIS</b>	119
4.2.1.	Preparación y caracterización de los óxidos mesoporosos de Aluminio	119
4.2.2.	Preparación y caracterización de los óxidos mesoporosos de Al(III)-Mg(II)	123
4.2.3.	Impregnación de los óxidos mesoporosos sintetizados con los péptidos Ib-M6 e Ib-A4	127
4.2.4.	Determinación del porcentaje de liberación los péptidos Ib-M6 e Ib-A4 desde los óxidos mesoporosos sintetizados	129
4.2.5.	Determinación de la actividad antifúngica contra <i>Moniliophthora rorei</i> del péptido Ib-A4 atrapados en los óxidos mesoporosos preparados	131
4.3.	<b>CONCLUSIONES</b>	133
4.4.	<b>REFERENCIAS</b>	134
	<b>CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES GENERALES</b>	143
	<b>CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES</b>	146
	<b>BIBLIOGRAFÍA PRESENTADA EN ESTE LIBRO</b>	148
	<b>ANEXOS</b>	189

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1</b> Mazorcas de cacao con manchas café características de la etapa intracelular del hongo <i>Moniliophthora roreri</i> .	35
<b>Figura 2.</b> Proceso general de la fisión binaria en bacilos como <i>Escherichia coli</i> .	37
<b>Figura 3.</b> Fases de crecimiento bacteriano.	38
<b>Figura 4.</b> Esquema para el recuento de células viables en placa (izquierda) y siembra puntal (derecha). En la imagen se muestra la realización de diluciones exponenciales seriadas del inoculo inicial para posteriormente realizar la siembra respectiva.	39
<b>Figura 5 a)</b> Estructura del lipopolisacárido en bacterias Gram-negativas y <b>b)</b> su disposición en la membrana externa.	41
<b>Figura 6.</b> Representación esquemática de la pared celular de los hongos.	42
<b>Figura 7.</b> Esquema de la síntesis en fase sólida. X representa los grupos protectores del $\alpha$ -amino, Y representa los grupos protectores de las cadenas laterales o permanentes y A el grupo carboxilo activado.	44
<b>Figura 8.</b> Mecanismo de $\beta$ -eliminación para la eliminación del grupo Fmoc en presencia de piperidina como base.	46
<b>Figura 9</b> Representación esquemática de la resina-péptido. La síntesis de los péptidos ocurre en el interior de la red del polímero, la cual ha sido hinchada en presencia de solventes apróticos.	47
<b>Figura 10.</b> Estructura química de la resina Rink Amida	47
<b>Figura 11.</b> Mecanismo de acoplamiento mediado por TBTU	48
<b>Figura 12.</b> Esquema general de los diferentes procesos de permeabilización de la membrana citoplasmática de las bacterias luego de la interacción inicial con los PAMs.	59
<b>Figura 13.</b> Actividad antifúngica de los péptidos LFampB, LFampH y sus análogos frente a <i>Candida albicans</i>	61
<b>Figura 14.</b> Actividad antibacteriana de los péptidos LFampB, LFampH y sus análogos frente a <i>Escherichia coli</i> K-12.	61
<b>Figura 15.</b> Perfil cromatográfico del péptido Ib-AMP4 a) reducido y b) oxidado.	69
<b>Figura 16.</b> Perfiles cromatográficos de los péptidos a) Ib-M1, b) Ib-M2, c) Ib-M3, d) Ib-M4, e) Ib-M5 y f) Ib-M6.	71
<b>Figura 17 a)</b> Concentración mínima inhibitoria y <b>b)</b> concentración mínima bactericida obtenidas para el péptido Ib-AMP4 y los análogos Ib-M.	72

- Figura 18.** Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* K-12 en ausencia (cuadrados negros) y en presencia del péptido Ib-AMP4 a concentraciones de 100µM (círculos rojos), 80µM (triángulos verdes), 50µM (triángulos inversos azules), 30µM (rombos celestes), 20µM (círculos sin relleno) y 10µM (triángulos sin relleno) 73
- Figura 19.** Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* K-12 en presencia de los péptidos a) Ib-M1, b) Ib-M2, c) Ib-M3, d) Ib-M4, e) Ib-M5 y f) Ib-M6. 74
- Figura 20.** Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* K-12 en ausencia (cuadrados negros) y en presencia de los péptidos Ib-A1(círculos rojos), Ib-A2(triángulos verdes), Ib-A3 (triángulos inversos azules), Ib-A4 (rombos celestes), Ib-A5 (círculos sin relleno) e Ib-A6 (triángulos sin relleno) a una concentración de 100µM. 76
- Figura 21.** Procedimiento para el aislamiento de *Moniliophthora roreri* a partir de frutos enfermos de cacao: a) recolección de frutos enfermos, b) obtención de fragmentos triangulares de la sección enferma del fruto, c) esterilización de los fragmentos obtenidos, d) siembra de los fragmentos esterilizados en placas Petri con medio de cultivo PDA y e) obtención de la colonia de *Moniliophthora roreri* después de 10 días de incubación 77
- Figura 22.** Crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en **a)** ausencia de péptido y **b)** en presencia del péptido Ib-M4 a una concentración de 1µM. 79
- Figura 23.** Representación esquemática de los procesos de enfriamiento unidireccional. Los cristales de hielo crecen en la dirección del enfriamiento y el soluto es excluido y solidifica entre los cristales. 92
- Figura 24.** Imágenes de SEM de una sección (perpendicular a la dirección del enfriamiento) de monolitos de PVA. Las barras de escala están a 20 µm. 93
- Figura 25.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de los pellets 25P25 a) con un aumento de 80X, b) 1000X, c) 5000X. Pellets de 50P25 d) con un aumento de 80X, e) 1000X, f) 5000X. Pellets de 75P25 g) con un aumento de 80X, h) 1000X e i) 5000X. Los aumentos de la primera columna corresponden a 100 µm, los de la segunda columna corresponde a 20 µm y los de la tercera a 2 µm. 97
- Figura 26.** Cinética de liberación del cristal violeta en agua desde los pellets con una concentración total de PVA del **a)** 2,5%, **b)** 5.0% y **c)** 7,5%. Para las tres gráficas aplica que la relación de polímero de 0% de PVA-15 se encuentra representada por los círculos rojos, 25% PVA-15 por los triángulos azules, 50% PVA-15 por los cuadros verdes, 75% PVA-15 por los diamantes amarillos y 100% PVA-15 por los triángulos sin relleno. 99
- Figura 27.** Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* K-12 (círculos rojos) en presencia de pellets de 50P25 (cuadrados verde), péptido en buffer tris (10mM, pH 7.4) (triángulos azules), pellets 50P25-M6 (triángulos inversos amarillos). 100
- Figura 28.** Crecimiento de *Moniliophthora roreri* en caldo papa-dextrosa en **a)** ausencia de pellets de PVA y **b)** presencia de pellets 50P25-A4 101

<b>Figura 29.</b> Perfiles de difracción de rayos X y estructuras correspondientes a los materiales mesoporosos MCM-41, MCM-48 y MCM-50.	113
<b>Figura 30.</b> Síntesis de materiales mesoporosos utilizando autoensamble cooperativo.	114
<b>Figura 31.</b> Perfiles de DRX en polvo de material SBA-15 A) sin calcinar y B) calcinado a 500°C.	116
<b>Figura 32.</b> Perfiles de difracción de rayos X a ángulos bajos obtenidos para los óxidos de aluminio mesoporosos sintetizados utilizando cantidades variables en moles de a) HNO <sub>3</sub> al 67% m/m, b) HNO <sub>3</sub> al 67% m/m junto con cantidades desde 0,12 a 0,36 moles de ácido cítrico (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> H <sub>2</sub> O), c) HCl 37% m/m junto con cantidades desde 0,12 a 0,36 moles ácido cítrico (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> H <sub>2</sub> O) y d) cantidades variables da HNO <sub>3</sub> al 67% m/m y HCl 37% m/m en presencia de 0,2 moles de C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> H <sub>2</sub> O	122
<b>Figura 33.</b> Perfiles de difracción de rayos X a ángulos altos obtenidos para cada uno de los óxidos preparados: a) Al-3,0N, b) AM5, c) AM10, d) AM15, e) AM20, f) AM25 y g) AM30. Las reflexiones marcadas con ♦ corresponden a la fase cristalina $\gamma$ del óxido de aluminio.	124
<b>Figura 34.</b> . Isotermas de adsorción de N <sub>2</sub> para cada uno de los óxidos de: a) Al-3,0N, b) AM5, c) AM10, d) AM15, e) AM20, f) AM25 y g) AM30. Inset: Curva de distribución de tamaño de poro para el respectivo material	125
<b>Figura 35.</b> Moles de péptido por gramo de óxido mesoporoso obtenidos para a) Ib-M6 e b) Ib-A4 y moles de péptido por m <sup>2</sup> para c) Ib-M6 e d) Ib-A4	128
<b>Figura 36.</b> Porcentaje de Liberación del péptido a) Ib-A4 a pH 5,6 e b) Ib-M6 a pH 7,4 desde los óxidos mesoporosos sintetizados después de 135 minutos de agitación.	131
<b>Figura 37.</b> Crecimiento micelial de <i>Moniliophthora roreri</i> en presencia de los materiales mesoporosos a) Al-3,0N, AM5, AM10, b) AM15, AM20, AM25 y AM30, todos los materiales se encontraban impregnados con el péptido Ib-A4.	132

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Secuencia de péptidos y variaciones en la carga neta y en la estructura secundaria de los péptidos LFampH y LFampB.	60
<b>Tabla 2.</b> Actividad antifúngica contra <i>F. culmorum</i> del péptido Ib-AMP4 y sus modificaciones estructurales. <E corresponde al ácido piroglutámico y B al ácido alfa-aminobutírico. Las letras en minúscula corresponden a D-aminoácidos.	62
<b>Tabla 3.</b> Secuencias de aminoácidos, carga y masa molecular del péptido Ib-AMP4 y sus análogos sintéticos.	66
<b>Tabla 4.</b> Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Moniliophthora roreri</i> en presencia de de 100µM de los péptidos Ib-A1, Ib-A2, Ib-A3, Ib-A5 e Ib-A6.	79
<b>Tabla 5.</b> Actividad hemolítica del péptido Ib-M6 sobre eritrocitos humanos.	80
<b>Tabla 6.</b> Actividad hemolítica del péptido Ib-A4 sobre eritrocitos humanos.	80
<b>Tabla 7.</b> Descripción de las relaciones totales y relaciones de masas de PVA en los pellets preparados. La concentración de cristal violeta utilizada en cada una de las soluciones fue de 179 mg/L.	95
<b>Tabla 8.</b> Óxidos mesoporosos de aluminio obtenidos al variar las cantidades de HNO <sub>3</sub> al 67% m/m y HCl 37% m/m junto con ácido cítrico (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> H <sub>2</sub> O).	120
<b>Tabla 9.</b> Área superficial, volumen y diámetro de poro de los óxidos mesoporosos de Al(III)-Mg(II) preparados y calcinados a 600 °C.	126
<b>Tabla 10.</b> Potencial zeta en mV a pH 7,4 y 5,6 de los óxidos mesoporosos preparados.	130

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>Anexo A.</b> Consentimiento firmado. Muestras de sangre para pruebas de hemólisis	123
<b>Anexo B.</b> Perfiles cromatográficos de los péptidos de la serie Ib-A.	124
<b>Anexo C.</b> Espectros de masas MALDI-TOF del péptido Ib-AMP4 y sus análogos sintéticos.	125
<b>Anexo D.</b> Porcentaje de impregnación de los péptidos Ib-A4 e Ib-M6 en los óxidos mesoporosos de Al(III)-Mg(II)	128

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ECEH	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
UFC	Unidades formadoras de colonias
KDO	Ácido 2-ceto-3-desoxioctanoico
LPS	Lipopolisacárido
PAMs	Péptidos antimicrobiales
SPPS	Solid-phase peptide synthesis (síntesis en fase sólida)
Boc	Tert-butoxicarbonil
Fmoc	9-Fluorometoxicarbonil
Acm	Acetamidometil
Trt	Tritilio
DMF	Dimetilformamida
DCC	Diclorometano
IPA	Isopropanol
TFA	Ácido trifluoroacético
TBTU	Tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametiluronio
DIPEA	N,N-diisopropiletlenamina
ACC	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico
Arg	Arginina
Cys	Cisteína
Trp	Triptofano
Ala	Alanina
Met	Metionina

Tyr	<i>Tirosina</i>
Pro	<i>Prolina</i>
Gly	<i>Glicina</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assited Laser Desorption of Ions Time of Flight</i>
RP-HPLC	<i>Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa</i>
MHB	<i>Caldo Müller Hilton</i>
PDA	<i>Agar papa dextrosa</i>
CMI	<i>Concentración mínima inhibitoria</i>
CMB	<i>Concentración mínima bactericida</i>
PVA	<i>Polivinil alcohol</i>
SLC	<i>Sistemas de liberación controlada</i>
ISISA	<i>Ice segregation induced self-assembly</i>
SEM	<i>Scanning electron microscopy (microscopía electrónica de barrido)</i>
DRX	<i>Difracción de Rayos X</i>
ADE	<i>Agente director de la estructura</i>
HNO <sub>3</sub>	<i>Ácido nítrico</i>
HCl	<i>Ácido clorhídrico</i>
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> · H <sub>2</sub> O	<i>Ácido cítrico hidratado</i>

## DIVULGACIONES

Durante la realización de este trabajo de tesis doctoral, los resultados obtenidos fueron divulgados mediante la publicación de un artículo científico y la presentación en congresos nacionales e internacionales.

### Artículo

J.M. Flórez-Castillo, Mercedes Perullini, Matias Jobbágy and Herminul de Jesús Cano Calle. Enhancing Antibacterial Activity Against *Escherichia coli* K-12 of Peptide Ib-AMP4 with Synthetic Analogues. *International Journal of Peptide Research and Therapeutic* (2014) Vol 20, Iss 3, 365-369.

### Presentaciones en congresos

J.M. Flórez-Castillo, Carlos Alberto Ortega, Herminul Cano y Jesús Olivero. Diseño computacional y síntesis en fase sólida de péptidos antifúngicos activos contra *Moniliophthora roreri*. XVI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Medellín 2011. Póster.

Johanna Flórez, Matías Jobbágy, Mercedes Perullini y Herminul Cano. Liberación controlada del péptido antibacteriano Ib-M6 desde matrices de alcohol polivinílico (PVA). 31 Congreso Latinoamericano de Química. Lima, Perú 2014. Póster.

Avendaño M. Gloria, J.M. Flórez-Castillo y Herminul Cano. Evaluación de la actividad antifúngica de los péptidos análogos al Ib-AMP4 individuales y funcionalizados con nanopartículas de ZnO contra *Moniliophthora roreri*. 1<sup>er</sup> Simposio Internacional en Biotecnología y Agroindustria. Bucaramanga, 2014.

---

**RESUMEN**

**Título:** Evaluación de la actividad antimicrobiana contra *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) y *Escherichia coli* K-12 de péptidos análogos al péptido Ib-AMP4 encapsulados en pellets de polivinil alcohol (PVA) y soportados sobre óxidos mesoporosos de Al(III)-Mg(II)\*.

**Autor:** Johanna Marcela Flórez Castillo<sup>+</sup>

**Palabras clave:** Péptidos antimicrobianos, *Escherichia coli* K-12, *Moniliophthora roreri* (Cif & Par), polivinil alcohol, óxidos mesoporosos.

**Descripción:**

En este trabajo de investigación se sintetizaron, mediante síntesis en fase sólida, péptidos análogos al péptido antifúngico Ib-AMP4. En estos análogos, la carga y la hidrofobicidad del C-terminal fueron modificadas sustituyendo aminoácidos por residuos de arginina y triptófano. Adicionalmente, se reemplazaron los residuos de cisteína de la secuencia original por residuos de alanina (péptidos Ib-A) o metionina (péptidos Ib-M). Los péptidos sintetizados fueron purificados y caracterizados por RP-HPLC y espectrometría MALDI-TOF, respectivamente.

La actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* K-12 fue determinada utilizando los métodos de macrodilución y conteo de colonias por siembra puntual. Mientras que la actividad antifúngica contra *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) se determinó cuantitativamente midiendo el diámetro de crecimiento micelial en placa y cualitativamente por observación del crecimiento micelial en caldo. Los resultados muestran que los péptidos sintetizados poseen una mayor actividad antimicrobiana que el péptido Ib-AMP4, con valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de 1 a 50  $\mu$ M para *E. coli* y entre 1 a 100  $\mu$ M para *M. roreri*.

Los péptidos análogos Ib-M6 e Ib-A4, fueron encapsulados en pellets de polivinil alcohol. Estas matrices fueron preparadas utilizando el método ISISA. Este método de preparación permitió un control de la estructura por lo que fue posible obtener pellets con microcanales alienados de manera radial cuya estructura fue controlada por la concentración total de PVA. Adicionalmente, los péptidos Ib-M6 e Ib-A4 fueron soportados sobre óxidos mesoporosos de Al(III)-Mg(II), sintetizados utilizando P123 como agente director de la estructura. Estos óxidos presentan una distribución de tamaño de poro homogénea y un área superficial entre 42 y 146 m<sup>2</sup>/g.

Los péptidos encapsulados en PVA y soportados sobre óxidos mesoporosos de Al(III)-Mg(II) no presentan disminución en su actividad antimicrobiana, lo que convierte a estos dos sistemas en buenos candidatos para la liberación de péptidos antimicrobianos como el Ib-A4 y el Ib-M6.

---

\*Tesis de doctorado

<sup>+</sup>Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Dir: Herminsul de Jesús Cano Calle (UIS) y Matias Jobbágy (Universidad de Buenos Aires)

---

**ABSTRACT**

**Title:** Antimicrobial activity against *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) and *Escherichia coli* K-12 of peptides analogous to antifungal peptide Ib-AMP4 encapsulated in polyvinyl alcohol pellets and supported on mesoporous oxides Al(III)-Mg(II)\*.

**Author:** Johanna Marcela Flórez Castillo<sup>+</sup>

**Keywords:** Antimicrobial peptides, *Escherichia coli* K-12, *Moniliophthora roreri* (Cif & Par), polyvinyl alcohol, mesoporous oxide

**Description:**

In this research work, we synthesized, through solid phase synthesis, analog peptides to an antifungal peptide called Ib-AMP4. In these analogs, both net charge and hydrophobicity were modified by replacement of some residues with arginine and tryptophan. In addition, cysteine residues were replaced by alanine (Ib-A peptides) or methionine (Ib-M peptides). The synthesized peptides were purified and characterized using RP-HPLC and MALDI-TOF spectrometry, respectively.

Antimicrobial activity against *Escherichia coli* K-12 was performed through the macrodilution method and viable cell count method, whereas antifungal activity against *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) was determined in a quantitative fashion by measuring micelial growth in plate and in a qualitative way through observing micelial growth in a broth. Our results show that analog peptides have a higher antimicrobial activity than the Ib-AMP4 peptide, with minimum inhibitory concentrations (MIC) that ranged from 1 to 50  $\mu\text{M}$  for *E. coli* and from 1 to 100  $\mu\text{M}$  for *M. roreri*.

The analog peptides Ib-M6 and Ib-A4, which showed a higher antimicrobial activity against the studied microorganisms, were encapsulated in polyvinyl alcohol pellets. These matrices were prepared using the ISISA method. This allowed a better control of the structure that enabled to obtain pellets with radially aligned microchannels, which structure was controlled by the total concentration of PVA. Additionally, the Ib-M6 and Ib-A4 peptides were supported on Al(III)-Mg(II) mesoporous, which were synthesized using P123 as a structure directing agent. These mesoporous oxides have a homogeneous distribution of pore size as well as a superficial area that ranged from 42 to 146  $\text{m}^2/\text{g}$ .

The peptides encapsulated in PVA pellets and supported on mesoporous oxides Al(III)-Mg(II) did not show a decrease in its antimicrobial activity; therefore, both systems could be used for releasing antimicrobial peptides such as Ib-M6 and Ib-A4.

---

\*Tesis de doctorado

<sup>+</sup>Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Dir: Hermínsul de Jesús Cano Calle (UIS) y Matías Jobbágy (Universidad de Buenos Aires)

# INTRODUCCIÓN

*“Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”*

*Marie Curie*

Los seres humanos estamos en contacto constante con una gran variedad de microorganismos, algunos de los cuales son beneficiosos y llevan a cabo procesos de gran valor para la sociedad. No obstante, algunos afectan negativamente aspectos fundamentales como la salud y la economía.

Un problema de salud pública en países en desarrollo son las enfermedades producidas por bacterias como *Escherichia coli*; una bacteria gram-negativa que habita en la flora intestinal normal de los mamíferos, ocasionando graves enfermedades en el tracto digestivo (García & Le Bouguéneq, 1996). En los últimos años el aumento de la resistencia a los agentes antibacterianos, debido al uso indiscriminado de antibióticos, ha dificultado el tratamiento de enfermedades producidas por bacterias gram-negativas. Esto tiene implicaciones importantes en los índices de morbilidad, mortalidad y en los costos de salud de la comunidad (Ghannoum & Rice, 1999). Lo anterior obliga a la búsqueda de nuevos tratamientos para las infecciones ocasionadas por microorganismo resistentes y métodos que prevengan la aparición y propagación de esta resistencia (Marr, Gooderham, & Hancock, 2006).

A nivel económico, un sector muy importante para Colombia y el cual se ve afectado por la presencia de microorganismos fitopatógenos es el cultivo del cacao. Este es un producto agrícola con grandes ventajas debido a las condiciones naturales para su producción por lo que es un cultivo sostenible e importante para la economía de los campesinos colombianos (Espinal G, Martínez C, & Peña M, 2005). El departamento de Santander es el principal productor de cacao en Colombia generando aproximadamente el 50% de la producción nacional (Rodríguez, 2006). No obstante, alrededor del 40% de las pérdidas de las plantaciones cacaoteras en Colombia son ocasionadas por la moniliasis del cacao, una enfermedad producida por el hongo *Moniliophthora roreri* (Cir. & Par.) (Velandía, Santiago, Esteban, & Teresa, 2008). Entre los métodos más utilizados para el tratamiento de la moniliasis se encuentran el control químico, cultural y genético. Sin embargo, cada uno de ellos acarrea inconvenientes como el deterioro medioambiental (Blanco-Labra & Aguirre Mancilla, 2002), riesgo de propagación por el manejo inadecuado de los frutos enfermos y disminución de la calidad del cacao (Oficial & Divulga, 2005). Con base en lo anterior, se requieren nuevos métodos que vayan de la mano con los utilizados en la actualidad y ayuden con un control más eficiente de esta enfermedad.

En los últimos años los péptidos antimicrobianos (PAM) han surgido como una nueva estrategia de control contra diversas enfermedades microbianas, debido a que son compuestos específicos que no muestran efectos secundarios y presentan un tiempo de acción menor en comparación con los antibióticos convencionales. Sin embargo, en algunos casos la actividad de estas biomoléculas presenta una disminución significativa *in vivo* debido a diversos factores como la degradación por proteasas y la dependencia de la concentración de sales en el suero (Marr et al., 2006), lo cual dificulta su formulación. Por esta razón, los sistemas de liberación controlada se han convertido en un campo de investigación de gran importancia ya que permiten mantener la concentración de los compuestos sobre las células blanco y dentro del rango terapéutico, lo cual disminuye los niveles de toxicidad (Y. Zhang, Chan, & Leong, 2013). Además, previenen la degradación de los compuestos bioactivos atrapados en su interior, lo que ha despertado un gran interés en las industrias farmacéutica y agrícola.

Se han desarrollado diferentes sistemas de liberación controlada, algunos están basados en sistemas poliméricos y otros en materiales inorgánicos porosos. Dentro de las matrices poliméricas, el polivinil alcohol (PVA) ha despertado un gran interés, debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Por otro lado, los óxidos mesoporosos han llamado la atención gracias a su estabilidad estructural y la posibilidad de controlar el tamaño de sus poros para permitir el paso de biomoléculas como proteínas y péptidos.

Con base en lo anterior, este trabajo de tesis doctoral se orientó hacia la síntesis de péptidos con actividad antimicrobial contra *Escherichia coli K-12* y *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) que fueran análogos al péptido antifúngico Ib-AMP4. Además se evaluó el efecto sobre la actividad antimicrobial del atrapamiento de los péptidos sobre matrices microestructuradas de polivinil alcohol y sobre óxidos mesoporosos de Al(III)-Mg(II).

El presente trabajo se encuentra dividido en cuatro capítulos. El capítulo 1 se presentan los fundamentos teóricos sobre *Escherichia coli K-12* y *Moniliophthora roreri* (Cif & Par), el

crecimiento bacteriano, la composición química de las membranas celulares en bacterias y hongos y la síntesis en fase sólida de péptidos. Estos conceptos, sirvieron de base para la realización de este trabajo de tesis doctoral.

En el capítulo 2 se describe la síntesis y caracterización de los péptidos análogos al Ib-AMP4, así como su actividad antimicrobial contra *Escherichia coli K-12* y *Moniliophthora roreri* (Cif & Par).

El capítulo 3 se encuentra enfocado en la encapsulación en pellets de polivinil alcohol de los péptidos que presentaron mayor actividad contra los microorganismos estudiados. Adicionalmente, se evalúa el efecto de la encapsulación sobre la actividad antimicrobiana de dichos péptidos.

Por último, en el capítulo 4 se presentan los resultados de preparación de óxidos mesoporosos de Al(III)-Mg(II), los cuales fueron utilizados como soporte para el péptido análogo denominado Ib-A4, el cual presentó la mayor actividad contra *Moniliophthora roreri* (Cif & Par).

## REFERENCIAS

- Aapptec. (n.d.). *Practical synthesis guide to solid phase peptide chemistry*.
- Addoriso, V., Esposito, S., & Sannino, F. (2010). Sorption capacity of mesoporous metal oxides for the removal of MCPA from polluted waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5011–5016.
- Alves, M. H., Jensen, B. E. B., Smith, A. a a, & Zelikin, A. N. (2011). Poly(vinyl alcohol) physical hydrogels: New vista on a long serving biomaterial. *Macromolecular Bioscience*, 11(10), 1293–1313. <http://doi.org/10.1002/mabi.201100145>
- Amatani, T., Nakanishi, K., Hirao, K., & Kodaira, T. (2005). Monolithic Periodic Mesoporous Silica with Well-Defined Macropores Monolithic Periodic Mesoporous Silica with Well-Defined Macropores. *Chemistry of Materials*, 17(March), 2114–2119. <http://doi.org/10.1021/cm048091c>
- Antonio, P. P. (2013). *Silicatos y alúminosilicatos mesoporosos funcionalizados como catalizadores en reacciones de interés en química fina*. Universidad de Córdoba.
- Arbelaez, L. (2010). *Análisis de la diversidad intraespecie de Moniliophthora roreri por medio de marcadores morfológicos y genéticos*. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/1938/1/43276997.20101.pdf>

- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., ... Stockinger, H. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. Retrieved from <http://www.expasy.org/>
- Ayala Benítez, M. F. (2008). *Manejo integrado de moniliasis (Moniliophthora roreri) en el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.) mediante el uso de fungicidas, combinado con labores culturales*. Escuela superior politecnica del litoral.
- Benoiton, N. L. (2006). *Chemistry of peptide synthesis*. Boca Raton.
- Beveridge, T. J. (1999). Structure of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, 181(16), 4725–4733.
- Bisht, G. S., Rawat, D. S., Kumar, A., Kumar, R., & Pasha, S. (2007). Antimicrobial activity of rationally designed amino terminal modified peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(15), 4343–6. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.05.015>
- Blanco-Labra, A., & Aguirre Mancilla, C. (2002). Proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de plantas. *Acta Universitaria*, 12(3), 31–43.
- Bolognini, M., Cavani, F., Scagliarini, D., Flego, C., Perego, C., & Saba, M. (2002). Heterogeneous basic catalysts as alternatives to homogeneous catalysts: reactivity of Mg/Al mixed oxides in the alkylation of m-cresol with methanol. *Catalysis Today*, 75(1-4), 103–111. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(02\)00050-0](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(02)00050-0)
- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28(8), 799–808. <http://doi.org/10.1002/bies.20441>
- Brogden, K. a. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 238–50. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Carlos Andres, R. V. (2011). *Síntesis y determinación estructural de péptidos derivados de Dermaseptina con actividad antileishmanial*. Universidad Nacional de Colombia-sede Medellín.
- Chacón Almeyda, A. V. (2014). *Evaluación In Vitro de la actividad antifúngica contra Moniliophthora roreri (Cif. y Par.) Evans Et al. de extratos obtenidos de Justicia secunda Vahl*. Universidad Industrial de Santander.
- Chan, W., & White, P. (2000). *Fmoc solid phase peptide synthesis*. New York: OXFORD University Press. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300043056>
- Chen, Y., Mant, C. T., Farmer, S. W., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2005). Rational Design of  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity / Therapeutic Index \*, 280(13), 12316–12329. <http://doi.org/10.1074/jbc>.
- Cho, S. H., Oh, S. H., & Lee, J. H. (2005). Fabrication and characterization of porous alginate/polyvinyl alcohol hybrid scaffolds for 3D cell culture. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 16(8), 933–947. <http://doi.org/10.1163/1568562054414658>
- Contreras, L. Y. S., & Riaño, A. L. R. (2013). Aislamiento de microorganismos para control biológico de moniliophthora roreri. *Acta Agronomica*, 62, 370–378.
- Das, S. K., Kapoor, S., Yamada, H., & Bhattacharyya, A. J. (2009). Effects of surface

- acidity and pore size of mesoporous alumina on degree of loading and controlled release of ibuprofen. *Microporous and Mesoporous Materials*, 118(1-3), 267–272. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.08.042>
- Davis, M. E. (2002). Ordered porous materials for Emerging Applications. *Nat*, 417(June), 813–821.
- De Queiroz, Á. a. a., Passos, E. D., De Brito Alves, S., Silva, G. S., Higa, O. Z., & Vítolo, M. (2006). Alginate–poly(vinyl alcohol) core–shell microspheres for lipase immobilization. *Journal of Applied Polymer Science*, 102(2), 1553–1560. <http://doi.org/10.1002/app.23444>
- Degim, I. T., & Celebi, N. (2007). Controlled delivery of peptides and proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 13(1), 99–117. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17266590>
- Dongyuan, Z., Jianglin, F., Qisheng, H., Nicholas, M., Glenn H., F., Bradley F., C., & Galen D., S. (1998). Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science*, 279(5350), 548–552. <http://doi.org/10.1126/science.279.5350.548>
- Espinal G, C. F., Martínez C, H. J., & Peña M, Y. (2005). *La cadena del cacao en Colombia. Una mirada golbal de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de trabajo No. 92.*
- Everett, D. H. (1972). Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units, Appendix II: Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry. (D. H. Everett, Ed.) *Pure and Applied Chemistry*. London. <http://doi.org/10.1351/pac197231040577>
- Fogucri, L. R., & Singh, S. (2009). Smart polymers for controlled delivery of proteins and peptides: a review of patents. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 3(1), 40–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19149728>
- Garcia, M. I., & Le Bouguénec, C. (1996). Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic Escherichia coli. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 94(3), 201–236. [http://doi.org/10.1016/S0020-2452\(97\)86017-4](http://doi.org/10.1016/S0020-2452(97)86017-4)
- Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents : mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 501–517.
- Glukhov, E., Stark, M., Burrows, L. L., & Deber, C. M. (2005). Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33960–33967. <http://doi.org/10.1074/jbc.M507042200>
- Green, R. J., Frazier, R. A., Shakesheff, K. M., Davies, M. C., Roberts, C. J., & Tendler, S. J. . (2000). Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials*, 21(18), 1823–1835. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00077-6](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00077-6)
- Guerrero, R. C. (2010). *Desarrollo de materiales porosos para la sorción de CO2*. Instituto Politécnico Nacional.
- Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., & Monte, F. (2008). Ice-Templated Materials : Sophisticated Structures Exhibiting Enhanced Functionalities Obtained after Unidirectional

- Freezing. *Chemical Materials*, 20(3), 634–648.
- Gutiérrez, M. C., García-Carvajal, Z. Y., Jobbágy, M., Rubio, F., Yuste, L., Rojo, F., ... del Monte, F. (2007). Poly(vinyl alcohol) Scaffolds with Tailored Morphologies for Drug Delivery and Controlled Release. *Advanced Functional Materials*, 17(17), 3505–3513. <http://doi.org/10.1002/adfm.200700093>
- Guzmán, F., Marshall, S., Ojeda, C., Albericio, F., & Carvajal-Rondanelli, P. (2013). Inhibitory effect of short cationic homopeptides against Gram-positive bacteria. *Journal of Peptide Science*, 19(October), 792–800. <http://doi.org/10.1002/psc.2578>
- Han, C., Li, H., Pu, H., Yu, H., Deng, L., Huang, S., & Luo, Y. (2013). Synthesis and characterization of mesoporous alumina and their performances for removing arsenic(V). *Chemical Engineering Journal*, 217, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2012.11.087>
- Hancock, R. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters*, 206(2), 143–149. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00480-3](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00480-3)
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.04.013>
- Haney, E. F., Petersen, A. P., Lau, C. K., Jing, W., Storey, D. G., & Vogel, H. J. (2013). Mechanism of action of puroidoline derived tryptophan-rich antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(8), 1802–1813. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.03.023>
- Helmerhorst, E. J., Reijnders, I. M., van 't Hof, W., Veerman, E. C., & Nieuw Amerongen, a V. (1999). A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Letters*, 449(2-3), 105–110. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10338113>
- Hicks, R. W., Castagnola, N. B., Zhang, Z., Pinnavaia, T. J., & Marshall, C. L. (2003). Lathlike mesostructured  $\gamma$ -alumina as a hydrodesulfurization catalyst support, 254, 311–317. [http://doi.org/10.1016/S0926-860X\(03\)00476-9](http://doi.org/10.1016/S0926-860X(03)00476-9)
- International journal of hydrogen energy, 1980. (1980). *International Journal of Hydrogen Energy*. [http://doi.org/10.1016/0360-3199\(80\)90035-X](http://doi.org/10.1016/0360-3199(80)90035-X)
- Jaimes Suárez, Y., & Aranzazu Hernández, F. (2010). *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L) en Colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora roreri)*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA.
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511. <http://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>
- Jiang, Z., Vasil, A. I., Hale, J. D., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2008). Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic  $\alpha$ -helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 90(3), 369–383. <http://doi.org/10.1002/bip.20911>
- Jofré, C., Guzmán, F., Cárdenas, C., Albericio, F., & Marshall, S. H. (2011). A natural peptide and its variants derived from the processing of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) displaying enhanced antimicrobial activity: A novel alternative for the control of bacterial diseases. *Peptides*, 32, 852–858.

<http://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.026>

- Johansson, E. M., Córdoba, J. M., & Odén, M. (2009). Synthesis and characterization of large mesoporous silica SBA-15 sheets with ordered accessible 18 nm pores. *Materials Letters*, 63(24-25), 2129–2131. <http://doi.org/10.1016/j.matlet.2009.07.013>
- Kapoor, S., Hegde, R., & Bhattacharyya, A. J. (2009). Influence of surface chemistry of mesoporous alumina with wide pore distribution on controlled drug release. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 140(1), 34–9. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.07.015>
- Kent, S. B. (1988). Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 57(1), 957–89. <http://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.004521>
- Kosmulski, M. (2009). Compilation of PZC and IEP of sparingly soluble metal oxides and hydroxides from literature. *Advances in Colloid and Interface Science*, 152(1-2), 14–25. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2009.08.003>
- Kresge, C. T., & Roth, W. J. (2013). The discovery of mesoporous molecular sieves from the twenty year perspective. *Chemical Society Reviews*, 42(9), 3663–70. <http://doi.org/10.1039/c3cs60016e>
- Krstic, V. (2005, October 26). Catalizadores de Rh-soportado y su aplicación en la hidrogenación de crotonaldehído. Universidad de Cantabria. Retrieved from <http://www.tdx.cat/handle/10803/10685>
- Lee, D., Shin, S., Kim, D., Seo, M., & Kang, J. (1999). Antifungal mechanism of a cysteine-rich antimicrobial peptide, Ib-AMP1, from *Impatiens balsamina* against *Candida albicans*. *Biotechnology ...*, 1047–1050. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1005636610512>
- Leofanti, G., Padovan, M., Tozzola, G., & Venturelli, B. (1998). Surface area and pore texture of catalysts. *Catalysis Today*, 41(1-3), 207–219. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(98\)00050-9](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(98)00050-9)
- Li, W., & Zhao, D. (2013). An overview of the synthesis of ordered mesoporous materials. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 49(10), 943–6. <http://doi.org/10.1039/c2cc36964h>
- Llop Hernández, A., Valdés-Dapena Vivanco, M. M., & Zuazo Silva, J. L. (2001). *Microbiología y parasitología médicas*. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
- Lloyd-Williams, P. (1997). *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. New directions in organic and biological chemistry CN - QP551 .L56 1997*. Boca Raton: CRC Press.
- Lozada, B. S., Herrera, L. V., Perea, J. A., Stashenko, E., & Escobar, P. (2012). Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 61(2), 102–110.
- Lu, J. R., Su, T. J., Thirtle, P. N., Thomas, R. K., Rennie, A. R., & Cubitt, R. (1998). The Denaturation of Lysozyme Layers Adsorbed at the Hydrophobic Solid/Liquid Surface Studied by Neutron Reflection. *Journal of Colloid and Interface Science*, 206(1), 212–223. <http://doi.org/10.1006/jcis.1998.5680>

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., & Gacto Fernández, M. (2004). *Brock biología de los microorganismos*. México: Prentice Hall Hispanoamericana.
- Márquez- Alvarez, C., Žilková, N., Pérez- Pariente, J., & Čejka, J. (2008). Synthesis, Characterization and Catalytic Applications of Organized Mesoporous Aluminas. *Catalysis Reviews*, 50(2), 222–286. <http://doi.org/10.1080/01614940701804042>
- Marr, A. K., Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(5), 468–72. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.006>
- Matsuura, S., Ishii, R., Itoh, T., Hanaoka, T., Hamakawa, S., Tsunoda, T., & Mizukami, F. (2010). Direct visualization of hetero-enzyme co-encapsulated in mesoporous silicas. *Microporous and Mesoporous Materials*, 127(1-2), 61–66. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.06.029>
- Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1462(1-2), 1–10. [http://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00197-2](http://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00197-2)
- McGinity, J. W., & Felton, L. A. (2008). *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms*. (J. W. McGinity & L. A. Felton, Eds.) (Third edit). New York.
- Meincken, M., Holroyd, D. L., & Rautenbach, M. (2005). Atomic Force Microscopy Study of the Effect of Antimicrobial Peptides on the Cell Envelope of Escherichia coli. *Society*, 49(10), 4085–4092. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4085>
- Miyahara, M., Vinu, A., & Ariga, K. (2007). Adsorption myoglobin over mesoporous silica molecular sieves: Pore size effect and pore-filling model. *Materials Science and Engineering: C*, 27(2), 232–236. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.012>
- Muschert, S., Siepmann, F., Leclercq, B., Carlin, B., & Siepmann, J. (2009). Drug release mechanisms from ethylcellulose: PVA-PEG graft copolymer-coated pellets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.12.007>
- Navarre, W. W., & Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 63(1), 174–229. [http://doi.org/10.1092-2172/99/\\$04.00+0](http://doi.org/10.1092-2172/99/$04.00+0)Barnett, Timothy C.
- Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 464–472. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>
- Niesz, K., Yang, P., & Somorjai, G. a. (2005). Sol-gel synthesis of ordered mesoporous alumina. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, (15), 1986–1987. <http://doi.org/10.1039/b419249d>
- Oficial, G., & Divulga, I. (2005). El control de la moniliasis en el cacao, 23–26.
- Orth, D., Grif, K., Zimmerhackl, L. B., & Würzner, R. (2008). Prevention and treatment of enterohemorrhagic Escherichia coli infections in humans. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 6(1), 101–108. <http://doi.org/10.1586/14787210.6.1.101>
- Pennington, M. W., & Dunn, B. M. (1994). Peptide Synthesis Protocols (In: Methods Mol. Biol. 1994, 35). <http://doi.org/10.1385/0896032736>

- Perullini, A. (2009). *Síntesis de materiales inorgánicos con porosidad controlada para la inmovilización de células: aplicaciones en biorreactores*. Retrieved from [http://bldigital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_4413\\_Perullini.pdf](http://bldigital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4413_Perullini.pdf)
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78–82. [http://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70024-X](http://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70024-X)
- Postgate, J. R., Crumpton, J. E., & Hunter, J. R. (1961). The measurement of bacterial viabilities by slide culture. *Journal of General Microbiology*, 24(1954), 15–24. <http://doi.org/10.1099/00221287-24-1-15>
- Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J. A., & Piedrola-Angulo, G. (1987). *Microbiología y parasitología médica*. Barcelona: Salvat.
- Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(6), 536–47. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>
- Reyes, R. E., Ramírez Saad, H., Solís Galicia, C., Ortiz Herrera, M., & Coria Jiménez, R. (2009). Mecanismos involucrados en la variabilidad del antígeno O de bacterias Gram negativas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 52, 32–43.
- Rink, H. (1987). Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Letters*, 28(33), 3787–3790. [http://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)96384-6](http://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)96384-6)
- Robens, E., Dabrowski, A., & Kutarov, V. V. (2004). Comments on surface structure analysis by water and nitrogen adsorption. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 76(2), 647–657. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000221460800030
- Robinson, J. R. (1978). *Sustained and controlled release drug delivery systems* (Vol. 6). M. Dekker.
- Rodríguez, E. (2006). Técnica de reducción de inóculo para controlar la Moniliasis del cacao en Santander. *Revista Corpoica*, 4(4), 68–78. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Técnica+de+reducción+de+inoculo+para+controlar+la+Moniliasis+del+cacao+en+Santander#0>
- Saldarriaga, Y., & Pineda, F. (2001). *Aislamiento de hongos fitopatógenos. Manual de micología aplicada*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Schlossbauer, A., Schaffert, D., Kecht, J., Wagner, E., & Bein, T. (2008). Click Chemistry for High-Density Biofunctionalization of Mesoporous Silica. *Journal of the American Chemical Society*, 130(38), 12558–12559. <http://doi.org/10.1021/ja803018w>
- Slowing, I. I., Trewyn, B. G., & Lin, V. S.-Y. (2007). Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Delivery of Membrane-Impermeable Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 129(28), 8845–8849. <http://doi.org/10.1021/ja0719780>
- Soler-Illia, G. J. D. a a, Sanchez, C., Lebeau, B., & Patarin, J. (2002). Chemical strategies to design textured materials: From microporous and mesoporous oxides to nanonetworks and hierarchical structures. *Chemical Reviews*, 102(11), 4093–4138. <http://doi.org/10.1021/cr0200062>
- Suhrenbrock, L., Radtke, G., Knop, K., & Kleinebudde, P. (2011). Suspension pellet layering using PVA-PEG graft copolymer as a new binder. *International Journal of*

- Pharmaceutics*. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.061>
- Taylor, R. H., Acland, D. P., Attenborough, S., Cammue, B. P., Evans, I. J., Osborn, R. W., ... Broekaert, W. F. (1997). A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(39), 24480–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9305910>
- Tang, E. S. K., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2005). Coating of multiparticulates for sustained release. *American Journal of Drug Delivery*.
- Tantirungrotechai, J., Chotmongkolsap, P., & Pohmakotr, M. (2010). Synthesis, characterization, and activity in transesterification of mesoporous Mg–Al mixed-metal oxides. *Microporous and Mesoporous Materials*, 128(1-3), 41–47. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.08.001>
- Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, 51(2), 149–77. <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>
- Thevissen, K., François, I. E. J. a, Sijsma, L., van Amerongen, A., Schaaper, W. M. M., Meloen, R., ... Cammue, B. P. a. (2005). Antifungal activity of synthetic peptides derived from *Impatiens balsamina* antimicrobial peptides Ib-AMP1 and Ib-AMP4. *Peptides*, 26(7), 1113–9. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.01.008>
- Thevissen, K., Ghazi, A., Samblanx, W. De, Brownlee, C., Rupert, W., & Broekaert, W. F. (1996). Fungal Membrane Responses Induced by Plant Defensins and Thionins. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 15018–15025. <http://doi.org/10.1074/jbc.271.25.15018>
- Vaara, M., & Nurminen, M. (1999). Outer Membrane Permeability Barrier in *Escherichia coli* Mutants That Are Defective in the Late Acyltransferases of Lipid A Biosynthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), 1459–1462. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89296/>
- Vallet-Regi, M., Rámila, A., del Real, R. P., & Pérez-Pariente, J. (2001). A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. *Chemistry of Materials*, 13(2), 308–311. <http://doi.org/10.1021/cm0011559>
- van der Kraan, M. I. a, van der Made, C., Nazmi, K., van't Hof, W., Groenink, J., Veerman, E. C. I., ... Nieuw Amerongen, A. V. (2005). Effect of amino acid substitutions on the candidacidal activity of LFampin 265-284. *Peptides*, 26(11), 2093–7. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.03.056>
- van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., & Anderson, M. a. (2013). Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 70(19), 3545–70. <http://doi.org/10.1007/s00018-013-1260-1>
- Vásquez, L. E., Guzmán, F., Patarroyo, M. E., & Arango, R. (2009). IN VITRO EVALUATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES AGAINST *Mycosphaerella fijiensis* MORELET AND THEIR INTERACTION WITH SOME CHEMICAL FUNGICIDES. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*.
- Velandía, A., Santiago, J., Esteban, C., & Teresa, M. (2008). *Moniliophthora roreri* EN CACAO *Theobroma cacao* L ., 1–3.

- Wan, Y., & Zhao, D. (2007). On the controllable soft-templating approach to mesoporous silicates. *Chemical Reviews*, 107(7), 2821–60. <http://doi.org/10.1021/cr068020s>
- Wang, P., Bang, J.-K., Kim, H. J., Kim, J.-K., Kim, Y., & Shin, S. Y. (2009). Antimicrobial specificity and mechanism of action of disulfide-removed linear analogs of the plant-derived Cys-rich antimicrobial peptide Ib-AMP1. *Peptides*, 30(12), 2144–9. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.09.020>
- Wang, S. (2009). Ordered mesoporous materials for drug delivery. *Microporous and Mesoporous Materials*, 117(1-2), 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.07.002>
- Wang, Y., Noguchi, M., Takahashi, Y., & Ohtsuka, Y. (2001). Synthesis of SBA-15 with different pore sizes and the utilization as supports of high loading of cobalt catalysts. *Catalysis Today*, 68(1-3), 3–9. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(01\)00317-0](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(01)00317-0)
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Xu, L., Song, H., & Chou, L. (2012). One-Pot Synthesis of Ordered Mesoporous NiO – CaO – Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Composite Oxides for Catalyzing CO<sub>2</sub> Reforming of CH<sub>4</sub>.
- Yau, W. M., Wimley, W. C., Gawrisch, K., & White, S. H. (1998). The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry*, 37(42), 14713–14718.
- Yiu, H. H. P., & Wright, P. a. (2005). Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic–organic hybrid. *Journal of Materials Chemistry*, 15(35-36), 3690. <http://doi.org/10.1039/b506090g>
- Yuan, Q., Yin, A.-X., Luo, C., Sun, L.-D., Zhang, Y.-W., Duan, W.-T., ... Yan, C.-H. (2008). Facile synthesis for ordered mesoporous gamma-aluminas with high thermal stability. *Journal of the American Chemical Society*, 130(11), 3465–3472. <http://doi.org/10.1021/ja0764308>
- Zhang, H., & Cooper, A. I. (2007). Aligned porous structures by directional freezing. *Advanced Materials*, 19(11), 1529–1533. <http://doi.org/10.1002/adma.200700154>
- 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. <http://doi.org/10.1074/jbc.M104925200>
- Zhang, Y., Chan, H. F., & Leong, K. W. (2013). Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 104–20. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.003>
- Zinieris, N., Leondiadis, L., & Ferderigos, N. (2005). Nalpha-Fmoc removal from resin-bound amino acids by 5% piperidine solution. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 7(1), 4–6. <http://doi.org/10.1021/cc049872d>

# CAPITULO 1

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

*“Sería posible describir todo científicamente, pero no tendría ningún sentido; carecería de significado el que usted describiera la sinfonía de Beethoven como una variación de la presión de la onda auditiva.”*

*Albert Einstein*

### 1.1. MONILIASIS DEL CACAO

La moniliasis del cacao es una enfermedad fitosanitaria responsable de aproximadamente el 40% de las pérdidas en las plantaciones cacaoteras en Colombia. Es producida por un hongo de clase Basidiomicetes del orden de Agaricales denominado *Moniliophthora roreri* (Cir. & Par.) (Jaimes Suárez & Aranzazu Hernández, 2010). Este microorganismo ataca los frutos de cacao de cualquier edad precisando alrededor de 10 semanas para que los síntomas sean visibles. Presenta dos etapas de infección: la primera es una etapa intercelular en la cual el hongo se propaga en el interior del tejido por medio de conidióforos ramificados. En la segunda etapa, la cual es intracelular, se alcanza su etapa adulta y se manifiestan los síntomas de la enfermedad por medio de unas manchas café características (Ayala Benítez, 2008). Algunos días después de la aparición de estas manchas se presenta la producción de esporas las cuales pueden diseminarse fácilmente con el viento, la lluvia y en menor proporción por insectos. Esto facilita la infección de otras plantas de cacao dando inicio al ciclo nuevamente (Jaimes Suárez & Aranzazu Hernández, 2010).

**Figura 1.** Mazorcas de cacao con manchas café características de la etapa intracelular del hongo *Moniliophthora roreri*.



### 1.2. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es un bacilo Gram-negativo que fermenta la lactosa y la glucosa bajo un proceso de fermentación ácida-mixta. Representa uno de los patógenos bacterianos más importantes en la bacteriología médica, identificándose como el agente causal de infecciones intestinales y extraintestinales (García & Le Bouguénec, 1996). Existen diferentes cepas patogénicas de esta bacteria siendo *Escherichia coli* Enterohemorragica

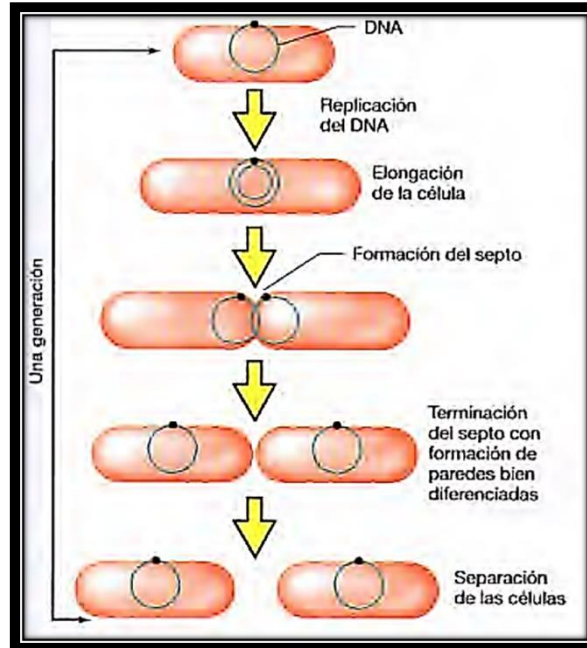
(ECEH) la responsable de un amplio espectro de enfermedades en humanos incluyendo diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico-hemolítico (Orth, Grif, Zimmerhackl, & Würzner, 2008). Los animales, especialmente los rumiantes como el ganado son un reservorio de ECEH; la transmisión de esta bacteria ocurre por ingestión de comida y agua contaminada, contacto de persona a persona, contacto directo con el animal o por exposición al medio ambiente.

### **1.3. CRECIMIENTO BACTERIANO**

El crecimiento es definido en microbiología como el aumento tanto en el número de células como en la cantidad de componentes químicos de un organismo (Llop Hernández, Valdés-Dapena Vivanco, & Zuazo Silva, 2001; Madigan, Martinko, Parker, & Gacto Fernández, 2004). En la mayoría de células procariotas el crecimiento celular se da por un proceso denominado fisión binaria, durante el cual una célula crece hasta que se divide en dos células nuevas.

En *Escherichia coli* se observa un alargamiento de las células (aproximadamente el doble de la célula de partida) producido por el crecimiento de la membrana citoplasmática y la pared celular desde direcciones opuestas. De esta manera se produce la formación de un *septo* que separa la célula dando lugar a las células hijas (Figura 2) (Madigan et al., 2004).

**Figura 2.** Proceso general de la fisión binaria en bacilos como *Escherichia coli*. (Imagen tomada de Madigan, M. et al. (Madigan et al., 2004))

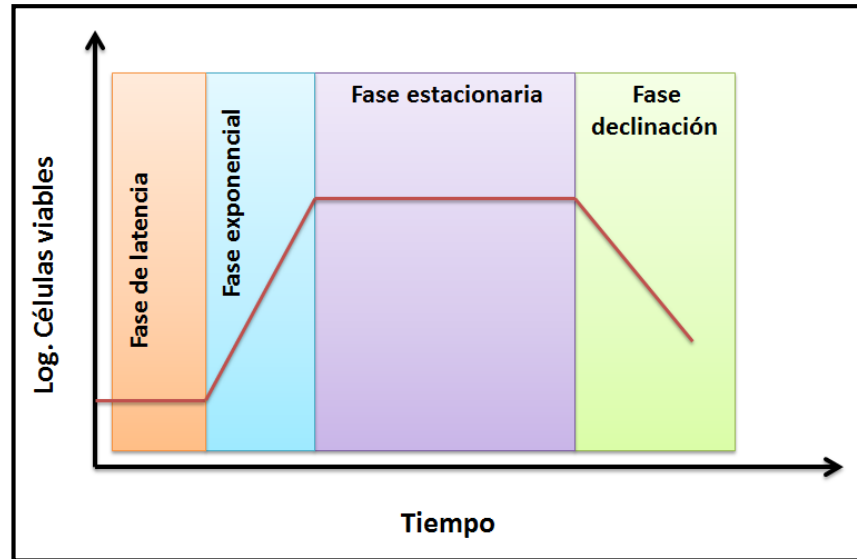


La velocidad de crecimiento se expresa como generaciones por hora, siendo una generación el intervalo para la duplicación del número de células (Pumarola, Rodríguez-Torres, García-Rodríguez, & Piedrola-Angulo, 1987) y el tiempo necesario para que esto ocurra se define como tiempo de generación. Este tiempo depende de cada especie bacteriana y de las condiciones fisicoquímicas del ambiente como el pH, temperatura de incubación, composición del medio, edad del cultivo, entre otras. Bajo condiciones óptimas el tiempo de generación de *Escherichia coli* es de aproximadamente 20 minutos.

El crecimiento bacteriano sigue una cinética exponencial que al ser representada en una curva presenta cuatro fases: latencia, exponencial, estacionaria y de declinación o muerte celular (Figura 3). Durante la fase de latencia ocurre la adaptación de las bacterias al nuevo medio de cultivo; el tiempo que dura esta fase es conocido como tiempo lag. En esta etapa se observa un aumento en la actividad metabólica, en la tasa de RNA ribosómico (importante en la síntesis de nuevas proteínas) y la síntesis de enzimas inducibles que facilitan la utilización de los nuevos nutrientes. Adicionalmente, se presenta un aumento en

el volumen de las células; sin embargo, al no presentarse replicación del DNA no existe un aumento en la población (Madigan et al., 2004).

**Figura 3.** Fases de crecimiento bacteriano.

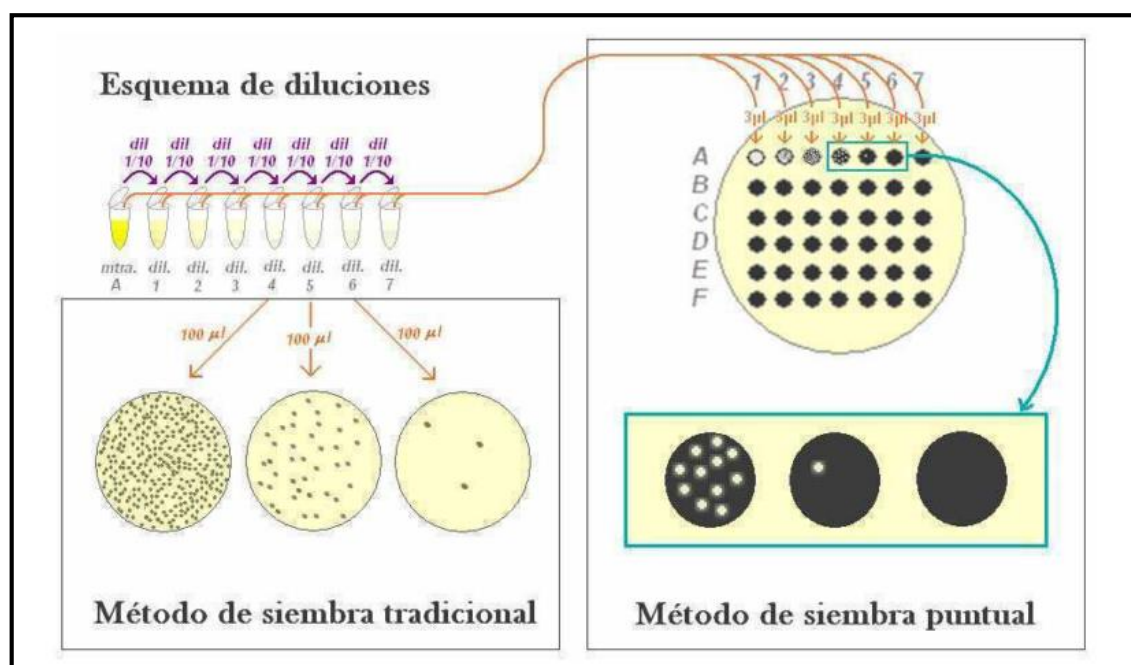


En la fase exponencial o fase de crecimiento acelerado, se observa una disminución gradual del tiempo de generación hasta alcanzar un máximo de velocidad de división, lo cual depende de cada especie de bacteria (Pumarola et al., 1987). Cuando esto ocurre se alcanza la fase de desarrollo o fase estacionaria, durante la cual la actividad metabólica es alta y se consigue el máximo valor en el número de generaciones por hora. Esta fase se prolonga mientras la cantidad de nutrientes en el medio sea suficiente y no exista sobrepoblación. De lo contrario, se observa una disminución de nutrientes, un aumento en las materias residuales tóxicas y una variación del pH. Todo esto conlleva a una disminución en la velocidad de división celular y al inicio de la fase de declinación durante la cual comienza la muerte de la población (Llop Hernández et al., 2001).

La determinación del crecimiento bacteriano se puede realizar de manera directa por conteo de número de células, determinación de algún metabolito o por determinación del peso total neto. Uno de los métodos más utilizados es el recuento de número de células viables en placa. En este método, se necesita un inóculo bacteriano que cuente con una estimación de la carga inicial de microorganismos y se realiza la siembra de este inóculo en una caja de Petri con un medio de cultivo semisólido. Posteriormente, se incuba a la temperatura apropiada y durante el tiempo necesario para permitir la formación de colonias que puedan

ser contadas a simple vista (Postgate, Crumpton, & Hunter, 1961). Se encuentra establecido que el conteo de colonias por este método es válido entre 30 y 300 UFC (unidades formadoras de colonia), pero para la obtención de datos estadísticamente significativos se requiere la realización de varias replicaciones, lo que implica un gasto exagerado de material y tiempo. Por esta razón, se han realizado modificaciones a este método y se ha diseñado el método de siembra puntual, en el cual se realizan diluciones exponenciales del inoculo y se siembran gotas de 3 $\mu$ L en una única caja Petri para realizar, posterior a la incubación, el conteo de colonias en la zona de siembra. Perullini en el 2009, realizó la comparación entre los métodos de siembra en caja y siembra puntual encontrando que este último presenta un exactitud y precisión aceptables (Perullini, 2009).

**Figura 4.** Esquema para el recuento de células viables en placa (izquierda) y siembra puntual (derecha). En la imagen se muestra la realización de diluciones exponenciales seriadas del inoculo inicial para posteriormente realizar la siembra respectiva. (Imagen tomada de Perrullini, 2009 (Perullini, 2009)).



La determinación del crecimiento bacteriano también puede determinarse de manera indirecta por medio de las medidas de turbidez utilizando un espectrofotómetro. Por medio de este método pueden obtenerse las curvas de crecimiento bacteriano en las cuales puede

determinarse el efecto de agentes externos como los péptidos antimicrobianos. Estas dos técnicas fueron las empleadas en esta investigación para la obtención de la actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli* K-12 del péptido Ib-AMP4 y sus análogos.

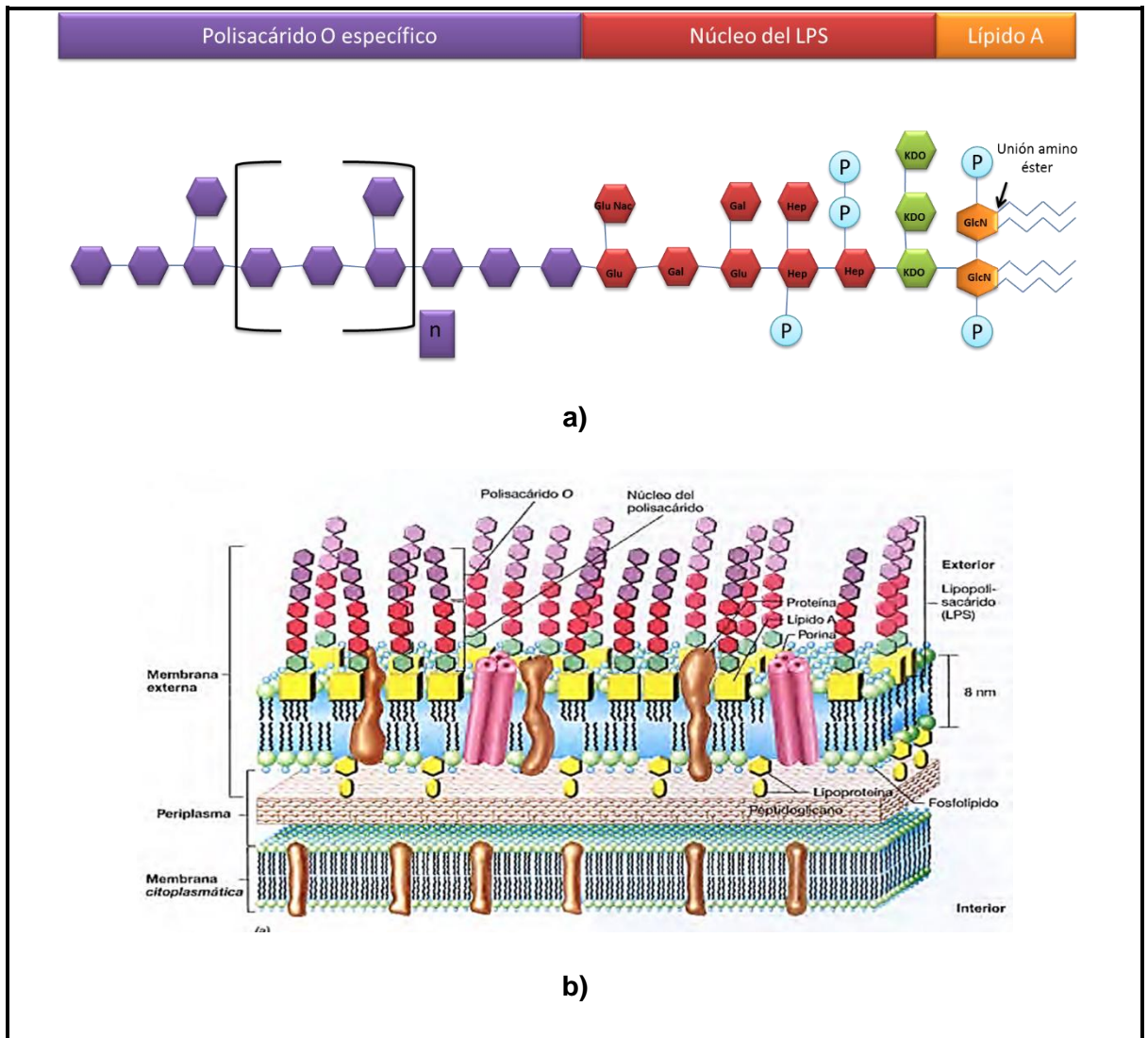
#### **1.4. MEMBRANA EXTERNA DE *Escherichia coli*.**

La pared celular bacteriana se encuentra constituida de peptidoglicano y su estructura varía entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. En las bacterias Gram-positivas la membrana plasmática se encuentra rodeada de una gruesa capa de peptidoglicano que contiene adicionalmente otras moléculas como los ácidos teicóicos y teicurónicos, fosfatos o carbohidratos (Navarre & Schneewind, 1999). Por otro lado, la pared celular de las bacterias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, se encuentra constituida por una membrana externa situada sobre una delgada capa de peptidoglicano. Intercalado entre la membrana externa y la membrana plasmática se encuentra el espacio periplasmático que constituye un compartimiento integral de la pared celular y tiene una gran importancia en el metabolismo energético de la célula (Beveridge, 1999). Por esta razón, este tipo de bacterias presentan una mayor resistencia intrínseca contra muchos antibióticos (Hancock, 2002).

La permeabilidad de la membrana celular está determinada por los lipopolisacáridos (LPS) presentes en la cara externa, los cuales poseen una estructura muy ordenada con muy poca fluidez lo que impide la difusión rápida de solutos hidrofóbicos (Vaara & Nurminen, 1999). Estas moléculas están constituidas por el núcleo del LPS en cuya estructura química se pueden encontrar monosacáridos poco usuales como el ácido 2-ceto-3-desoxioctanoico (KDO) y el L-glicerol-D-manoheptosa (Reyes, Ramírez Saad, Solís Galicia, Ortiz Herrera, & Coria Jiménez, 2009). Adicionalmente, es posible encontrar monosacáridos como glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina. Este núcleo se encuentra unido al polisacárido O específico que generalmente está formado de galactosa, glucosa, ramnosa y manosa, así como de uno o más dideoxiazúcares como colitosa, paratosa o tivelosa; los cuales son encontrados rara vez en la naturaleza y son característicos de cada cepa [2,6]. Estas dos secciones de los LPS se encuentran dirigidas hacia el espacio extracelular como se observa en la Figura 5 b. Por último la parte lipídica de los LPS y la cual se encuentra unida a la membrana externa es conocida como el lípido A que posee uniones amino-éster entre un

ácido graso y un disacárido de N-acetilglucosamina fosfato. Este disacárido se une al núcleo del LPS a través del KDO (Figura 5).

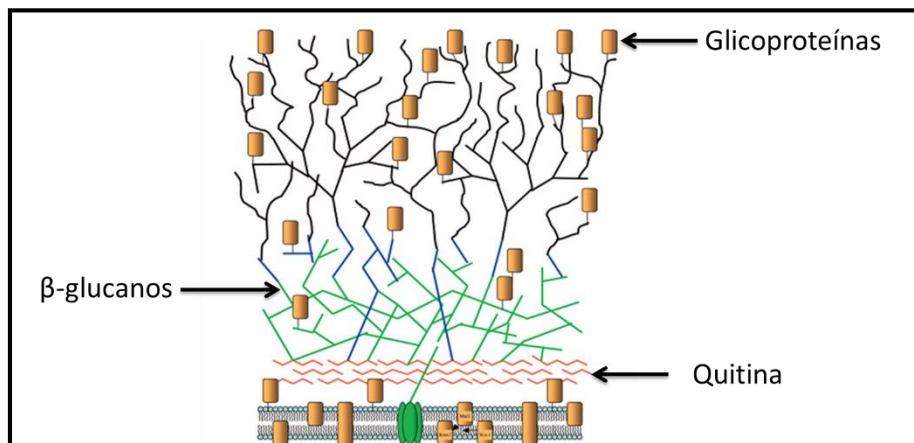
**Figura 5 a)** Estructura del lipopolisacárido en bacterias Gram-negativas y **b)** su disposición en la membrana externa. (Imagen tomada de Madigan y colaboradores (Madigan et al., 2004))



### 1.5. PARED Y MEMBRANA CELULAR EN HONGOS Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PÉPTIDOS ANTIFÚNGICOS.

Los hongos poseen una pared celular que funciona como barrera protectora, limitando el acceso de solutos a la membrana plasmática. Además, se encuentra involucrada en los procesos de reconocimiento, adhesión y patogénesis (Bowman & Free, 2006). Esta pared se encuentra constituida por una capa de quitina, cuya composición varía entre especies de hongos y además encuentra adherida a la membrana celular. Después de esta capa sigue una red de  $\beta$ -glucanos, los cuales se encuentran enlazados entre sí por enlaces  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) y que constituyen entre el 50% y el 60% de la pared celular. Finalmente, en la parte extracelular de la pared se encuentra las glicoproteínas que constituyen entre el 20% y el 60% de la pared celular (van der Weerden, Bleackley, & Anderson, 2013).

**Figura 6.** Representación esquemática de la pared celular de los hongos. (Imagen tomada de Pontón, J. 2008 (Pontón, 2008).)



Después de la pared celular se encuentra la membrana plasmática, la cual delimita la forma de la célula y ayuda a mantener el equilibrio entre el medio extracelular y el intracelular. Se encuentra constituida por fosfolípidos, esfingolípidos y esteroides. A diferencia de los organismos procariontes, las membranas de hongos y bacterias están constituidas de fosfolípidos aniónicos que interactúan electrostáticamente con los péptidos antimicrobiales (PAMs); los cuales, por lo general, presentan una carga neta positiva. El fosfatidilglicerol y la cardiolipina son los lípidos presentes en la mayoría de las membranas

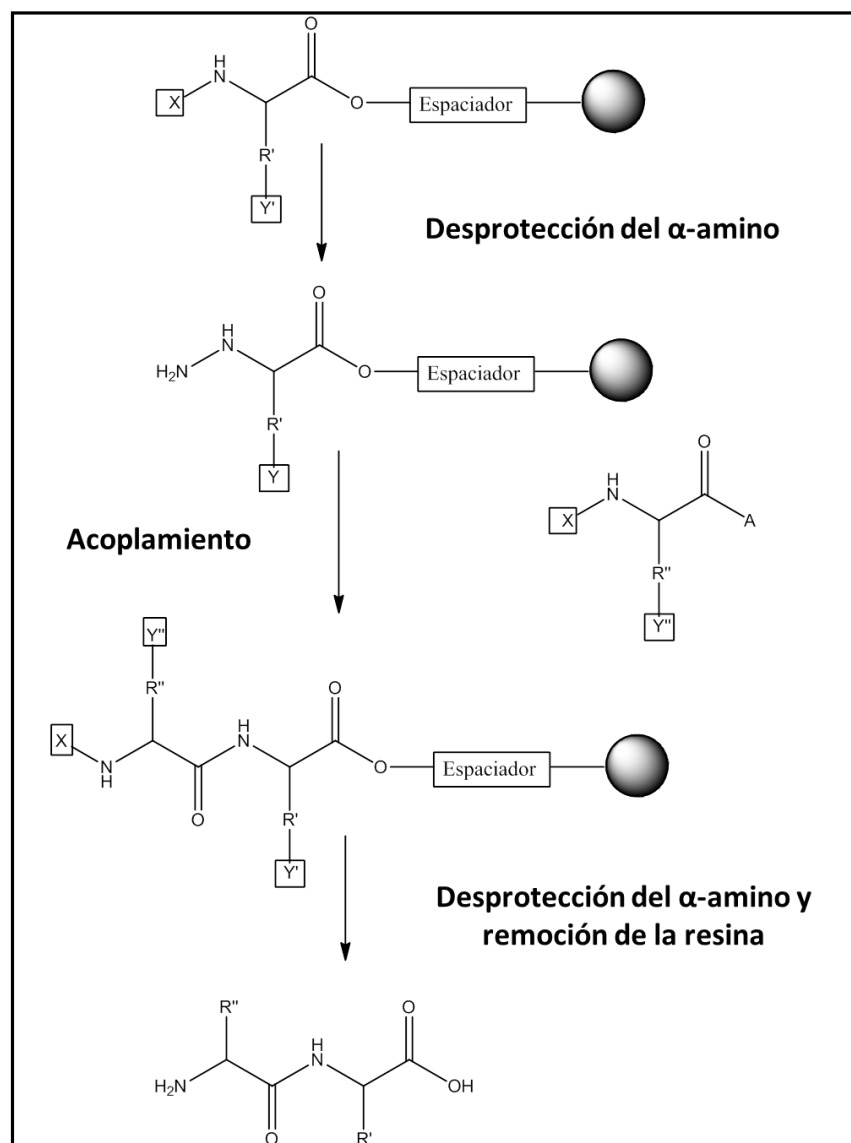
celulares de las bacterias; mientras que la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol, constituyen las membranas celulares de los hongos (Matsuzaki, 1999).

El conocimiento sobre el mecanismo de acción de los péptidos antifúngicos es relativamente pequeño; pero se sabe que la estructura de la membrana y la pared celular de los hongos condiciona el mecanismo de los PAMs. Se ha encontrado que algunos péptidos como la defensina RsAFP2 puede unirse a la membrana plasmática del hongo *Nuerospora crassa* provocando un flujo de iones  $Ca^{+2}$  y  $K^{+}$  disminuyendo el potencial en el citoplasma (Thevissen et al., 1996). Otros péptidos como DmAMP1 pueden unirse a blancos celulares específicos, como los esfingolípidos, permeabilizando las membranas; y algunos péptidos como la defensina aislada de *Heuchera sanguínea* puede inducir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y desencadenar la muerte celular programada por interacción con un blanco celular aún desconocido (van der Weerden et al., 2013).

#### **1.6. SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA DE PÉPTIDOS**

La síntesis en fase sólida (SPPS siglas de solid-phase peptide synthesis) fue desarrollada por Bruce Merrifield en 1963, siendo hoy en día la manera más sencilla y por lo tanto la más utilizada para la obtención de péptidos. El primer paso de la SPPS consiste en la unión a una resina insoluble, que actúa como soporte, del primer aminoácido que corresponde al extremo C-terminal del péptido a sintetizar. Posteriormente se realiza la elongación de la cadena a través de una serie repetitiva de reacciones que dan lugar a la formación del enlace peptídico. En el segundo paso se realiza la separación del péptido de la resina y la remoción de los grupos protectores de las cadenas laterales. Finalmente, se lleva a cabo la purificación y caracterización en solución del péptido sintetizado (Kent, 1988). (Figura 7).

**Figura 7.** Esquema de la síntesis en fase sólida. X representa los grupos protectores del  $\alpha$ -amino, Y representa los grupos protectores de las cadenas laterales o permanentes y A el grupo carboxilo activado. (Imagen tomada de Chan, W. and White, P. (Chan & White, 2000))



En SPPS es importante la utilización de grupos protectores, de esta manera se elimina la reactividad de los grupos funcionales que no están incorporados en la formación del enlace peptídico. Los grupos protectores tienen como características principales ser químicamente estables a las condiciones utilizadas durante la síntesis y ser fácilmente removibles para

evitar el rompimiento del enlace peptídico formado. En general, son de tres tipos:(Lloyd-Williams, 1997):

1. Grupos protectores del N<sup>α</sup>-amino o grupos temporales, los cuales se van removiendo en cada paso de la síntesis. Los más utilizados son los grupos alcoxicarbonil como el tert-butoxicarbonil (Boc) y el 9-fluorometoxicarbonil (Fmoc). Una de las razones es que disminuyen la racemización del centro  $\alpha$ -estereogénico y además pueden ser removidos fácilmente rompiendo el enlace alquil-oxígeno; dando lugar a ácidos carbámicos los cuales son descarboxilados espontáneamente dando lugar al grupo amino (Lloyd-Williams, 1997).
2. Grupos protectores de las cadenas laterales o grupos permanentes, los cuales deben ser estables a los tratamientos utilizados durante el crecimiento del péptido ya que solo pueden ser removidos al final de la síntesis.
3. Grupos protectores del C-terminal. En SPPS este grupo corresponde al soporte sólido sobre el cual se realiza el crecimiento de la cadena peptídica.

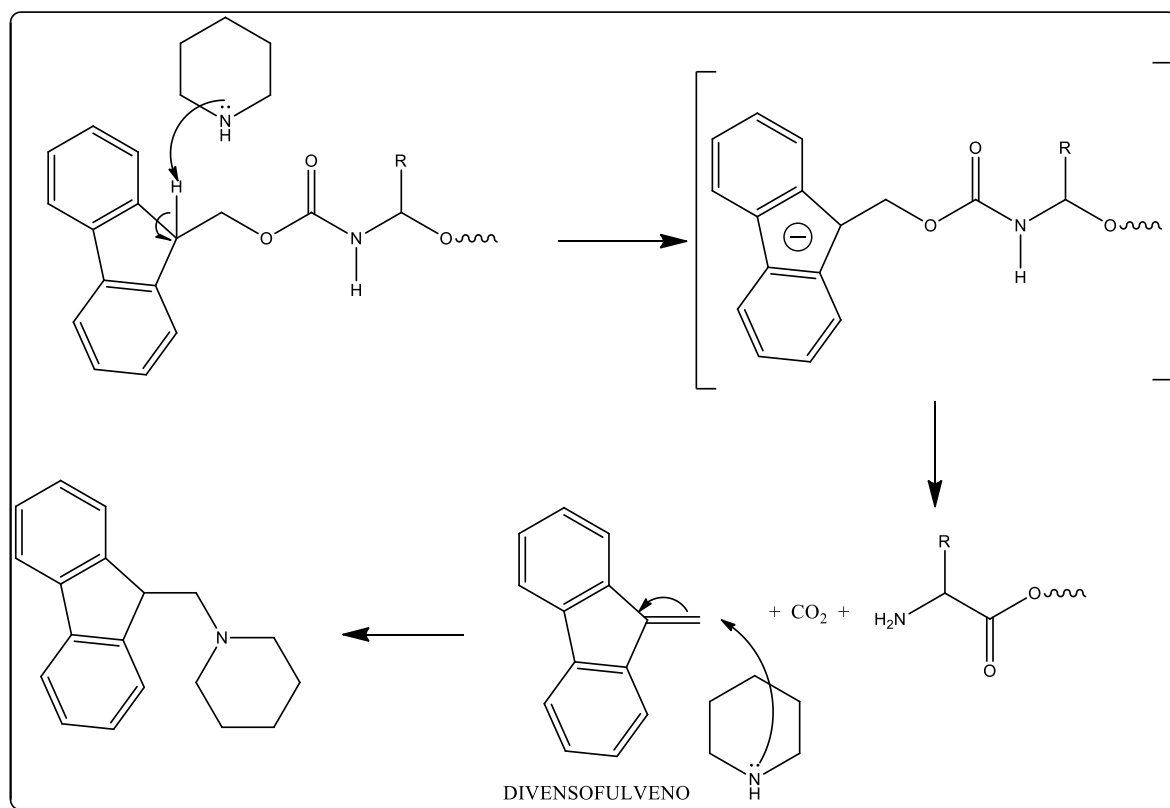
#### **1.6.1. Mecanismo de protección Fmoc/tBu.**

En esta metodología se utiliza un esquema de protección ortogonal en el cual se emplea como grupo protector de los N<sup>α</sup>-amino el 9-fluoroenilmetoxicarbonil (Fmoc). Este puede ser removido sin afectar los grupos tert-butil o trifenilmetil (tritol), los cuales se utilizan para la protección de las cadenas laterales de los aminoácidos. Esta metodología representa una ventaja cuando el péptido a sintetizar debe ciclarse selectivamente, como en la formación de dos o más enlaces disulfuro (Aapptec, n.d.).

La remoción del grupo Fmoc se realiza a través de un mecanismo de  $\beta$ -eliminación como se muestra en la Figura 8, en el cual una base como la piperidina remueve el protón ácido del carbono 9 del sistema de anillos fluoroenil formando dibenzofulveno y dióxido de carbono (Benoiton, 2006). El dibenzofulveno es un electrófilo que ataca de manera irreversible la amina desprotegida formando el aducto Fmoc-piperidina el cual puede ser detectado por espectroscopia UV ya que absorbe en un rango de longitudes de onda entre 270 y 312nm. El seguimiento de este aducto para la determinación del grado de unión del primer aminoácido al soporte sólido es un procedimiento muy utilizado en los sintetizadores automáticos; sin

embargo no es muy utilizado en la síntesis manual (Carlos Andres, 2011).

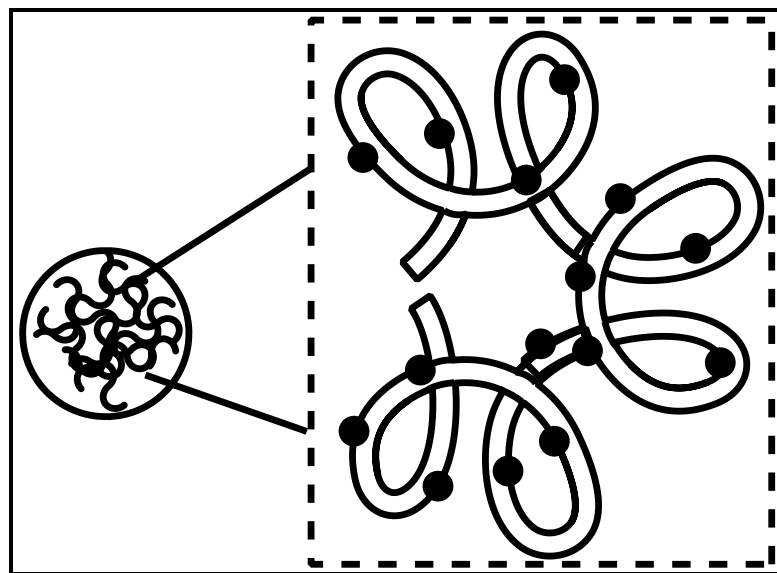
**Figura 8.** Mecanismo de  $\beta$ -eliminación para la eliminación del grupo Fmoc en presencia de piperidina como base. (Chan & White, 2000)



### 1.6.2. Resinas para SPPS: resina Rink Amida.

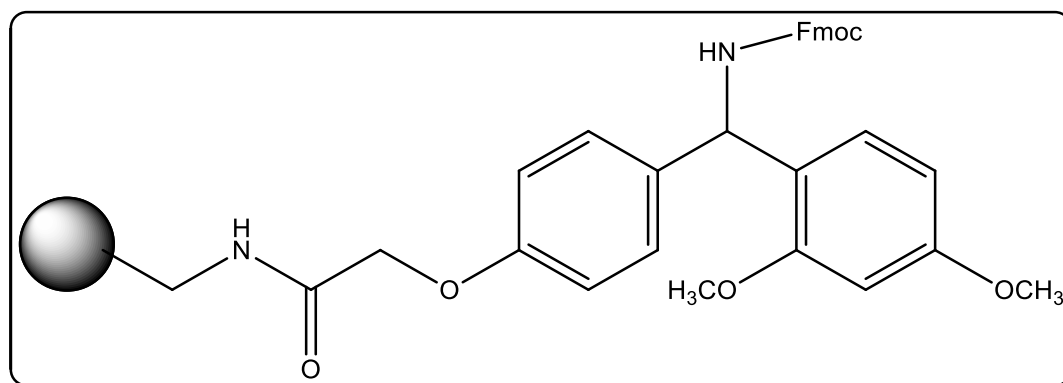
Las resinas empleadas en SPPS son pequeñas esferas que en su mayoría están preparadas con poliestireno y contienen entre 1 y 2% de divinilbenceno, el cual actúa como agente entrecruzante. Esto hace que las resinas sean insolubles en los solventes utilizados durante la síntesis; sin embargo, pueden ser solvatadas e hinchadas en solventes apróticos como dimetilformamida (DMF) y diclorometano (DCM). Este proceso de hinchamiento es importante en SPPS ya que la cinética de la reacción es controlada por difusión; por esta razón, aquellas resinas que poseen un factor de hinchamiento alto poseen una mayor velocidad de difusión de los reactivos hacia el interior de la matriz lo que resulta en tiempos de reacción más cortos y conversiones químicas más completas (Kent, 1988).

**Figura 9** Representación esquemática de la resina-péptido. La síntesis de los péptidos ocurre en el interior de la red del polímero, la cual ha sido hinchada en presencia de solventes apróticos. (Kent, 1988)



La síntesis de los péptidos seleccionados en esta investigación se realizó sobre resina Rink Amida, la cual es uno de los soportes más utilizados en la estrategia Fmoc/tBu debido a que es lábil en presencia de ácidos como el ácido trifluoroacético (TFA) (Rink, 1987). Se utiliza en la síntesis de péptidos amidados ya que posee un enlazador unido al poliestireno por medio de un enlace éter (Figura 10). Esta resina posee un grupo amino Fmoc protegido, por lo que es necesario un tratamiento con piperidina antes de realizar la unión del primer aminoácido.

**Figura 1.10.** Estructura química de la resina Rink Amida

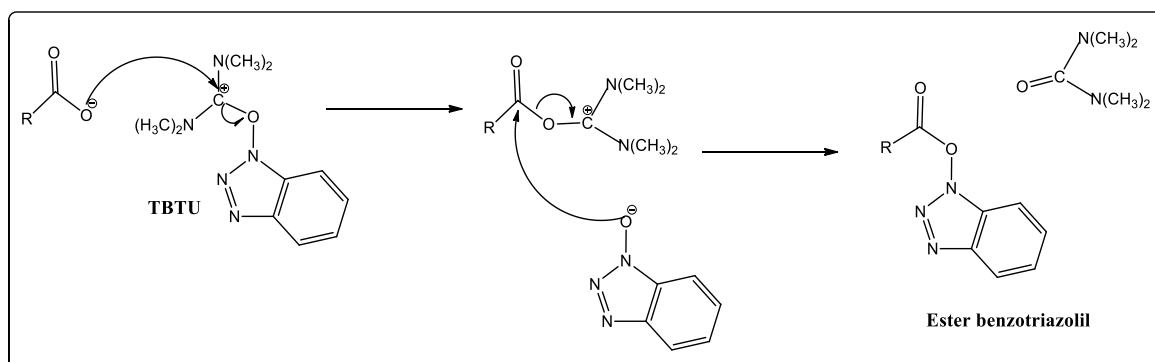


### 1.6.3. Unión del primer aminoácido al soporte sólido.

Para la formación del enlace peptídico, procedimiento denominado acoplamiento, es necesario realizar la activación del carbono carbonílico de uno de los aminoácidos. Para esto se introduce un grupo aceptor de electrones el cual facilite el ataque nucleofílico por parte del grupo amino del otro aminoácido (Benoiton, 2006).

Las sales de uronio como el tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU) son utilizadas como agentes de acoplamiento dando lugar, *in situ*, a un éster benzotriazolil activo que sufre el ataque nucleofílico del grupo amino de la resina o de otro aminoácido (Lloyd-Williams, 1997). Junto con el TBTU se utiliza la N,N-diisopropiletilenamina (DIPEA), una amina terciaria con un pKa de 10.4 que promueve la eliminación del protón, formando el anión carboxilato, el cual reacciona con el TBTU (figura II.9).

**Figura 11.** Mecanismo de acoplamiento mediado por TBTU (Lloyd-Williams, 1997).



## 1.7. REFERENCIAS

Aapptec. (n.d.). *Practical synthesis guide to solid phase peptide chemistry*.

Addoriso, V., Esposito, S., & Sannino, F. (2010). Sorption capacity of mesoporous metal oxides for the removal of MCPA from polluted waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5011–5016.

Alves, M. H., Jensen, B. E. B., Smith, A. a a, & Zelikin, A. N. (2011). Poly(vinyl alcohol) physical hydrogels: New vista on a long serving biomaterial. *Macromolecular Bioscience*, 11(10), 1293–1313. <http://doi.org/10.1002/mabi.201100145>

Amatani, T., Nakanishi, K., Hirao, K., & Kodaira, T. (2005). Monolithic Periodic Mesoporous Silica with Well-Defined Macropores Monolithic Periodic Mesoporous Silica with Well-Defined Macropores. *Chemistry of Materials*, 17(March), 2114–2119. <http://doi.org/10.1021/cm048091c>

- Antonio, P. P. (2013). *Silicatos y alúminosilicatos mesoporosos funcionalizados como catalizadores en reacciones de interés en química fina*. Universidad de Córdoba.
- Arbelaez, L. (2010). *Análisis de la diversidad intraespecie de *Moniliophthora roreri* por medio de marcadores morfológicos y genéticos*. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/1938/1/43276997.20101.pdf>
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., ... Stockinger, H. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. Retrieved from <http://www.expasy.org/>
- Ayala Benítez, M. F. (2008). *Manejo integrado de moniliasis (*Moniliophthora roreri*) en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante el uso de fungicidas, combinado con labores culturales*. Escuela superior politecnica del litoral.
- Benoiton, N. L. (2006). *Chemistry of peptide synthesis*. Boca Raton.
- Beveridge, T. J. (1999). Structure of fram-negative cell walls and their derived mebrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, 181(16), 4725–4733.
- Bisht, G. S., Rawat, D. S., Kumar, A., Kumar, R., & Pasha, S. (2007). Antimicrobial activity of rationally designed amino terminal modified peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(15), 4343–6. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.05.015>
- Blanco-Labra, A., & Aguirre Mancilla, C. (2002). Proteínas Involucradas en los mecanismos de defensa de plantas. *Acta Universitaria*, 12(3), 31–43.
- Bolognini, M., Cavani, F., Scagliarini, D., Flego, C., Perego, C., & Saba, M. (2002). Heterogeneous basic catalysts as alternatives to homogeneous catalysts: reactivity of Mg/Al mixed oxides in the alkylation of m-cresol with methanol. *Catalysis Today*, 75(1-4), 103–111. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(02\)00050-0](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(02)00050-0)
- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28(8), 799–808. <http://doi.org/10.1002/bies.20441>
- Brogden, K. a. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 238–50. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Carlos Andres, R. V. (2011). *Síntesis y determinación estructural de péptidos derivados de Dermaseptina con actividad antileishmanial*. Universidad Nacional de Colombia-sede Medellín.
- Chacón Almeyda, A. V. (2014). *Evaluación In Vitro de la actividad antifúngica contra *Moniliophthora roreri*(Cif. y Par.) Evans Et al. de extratos obtenidos de *Justicia secunda* Vahl*. Universidad Industrial de Santander.
- Chan, W., & White, P. (2000). *Fmoc solid phase peptide synthesis*. New York: OXFORD University Press. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300043056>
- Chen, Y., Mant, C. T., Farmer, S. W., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2005). Rational Design of  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity / Therapeutic Index \*, 280(13), 12316–12329. <http://doi.org/10.1074/jbc>.

- Cho, S. H., Oh, S. H., & Lee, J. H. (2005). Fabrication and characterization of porous alginate/polyvinyl alcohol hybrid scaffolds for 3D cell culture. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 16(8), 933–947. <http://doi.org/10.1163/1568562054414658>
- Contreras, L. Y. S., & Riaño, A. L. R. (2013). Aislamiento de microorganismos para control biológico de moniliophthora royeri. *Acta Agronomica*, 62, 370–378.
- Das, S. K., Kapoor, S., Yamada, H., & Bhattacharyya, A. J. (2009). Effects of surface acidity and pore size of mesoporous alumina on degree of loading and controlled release of ibuprofen. *Microporous and Mesoporous Materials*, 118(1-3), 267–272. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.08.042>
- Davis, M. E. (2002). Ordered porous materials for Emerging Applications. *Nat*, 417(June), 813–821.
- De Queiroz, Á. a. a., Passos, E. D., De Brito Alves, S., Silva, G. S., Higa, O. Z., & Vítolo, M. (2006). Alginate–poly(vinyl alcohol) core–shell microspheres for lipase immobilization. *Journal of Applied Polymer Science*, 102(2), 1553–1560. <http://doi.org/10.1002/app.23444>
- Degim, I. T., & Celebi, N. (2007). Controlled delivery of peptides and proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 13(1), 99–117. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17266590>
- Dongyuan, Z., Jianglin, F., Qisheng, H., Nicholas, M., Glenn H., F., Bradley F., C., & Galen D., S. (1998). Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science*, 279(5350), 548–552. <http://doi.org/10.1126/science.279.5350.548>
- Espinal G, C. F., Martínez C, H. J., & Peña M, Y. (2005). *La cadena del cacao en Colombia. Una mirada golbal de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de trabajo No. 92.*
- Everett, D. H. (1972). Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units, Appendix II: Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry. (D. H. Everett, Ed.) *Pure and Applied Chemistry*. London. <http://doi.org/10.1351/pac197231040577>
- Fogueri, L. R., & Singh, S. (2009). Smart polymers for controlled delivery of proteins and peptides: a review of patents. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 3(1), 40–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19149728>
- Garcia, M. I., & Le Bouguénec, C. (1996). Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic Escherichia coli. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 94(3), 201–236. [http://doi.org/10.1016/S0020-2452\(97\)86017-4](http://doi.org/10.1016/S0020-2452(97)86017-4)
- Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents : mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 501–517.
- Glukhov, E., Stark, M., Burrows, L. L., & Deber, C. M. (2005). Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33960–33967. <http://doi.org/10.1074/jbc.M507042200>
- Green, R. J., Frazier, R. A., Shakesheff, K. M., Davies, M. C., Roberts, C. J., & Tendler, S. J. . (2000). Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions

- with biomaterials. *Biomaterials*, 21(18), 1823–1835. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00077-6](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00077-6)
- Guerrero, R. C. (2010). *Desarrollo de materiales porosos para la sorción de CO2*. Instituto Politécnico Nacional.
- Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., & Monte, F. (2008). Ice-Templated Materials : Sophisticated Structures Exhibiting Enhanced Functionalities Obtained after Unidirectional Freezing. *Chemical Materials*, 20(3), 634–648.
- Gutiérrez, M. C., García-Carvajal, Z. Y., Jobbágy, M., Rubio, F., Yuste, L., Rojo, F., ... del Monte, F. (2007). Poly(vinyl alcohol) Scaffolds with Tailored Morphologies for Drug Delivery and Controlled Release. *Advanced Functional Materials*, 17(17), 3505–3513. <http://doi.org/10.1002/adfm.200700093>
- Guzmán, F., Marshall, S., Ojeda, C., Albericio, F., & Carvajal-Rondanelli, P. (2013). Inhibitory effect of short cationic homopeptides against Gram-positive bacteria. *Journal of Peptide Science*, 19(October), 792–800. <http://doi.org/10.1002/psc.2578>
- Han, C., Li, H., Pu, H., Yu, H., Deng, L., Huang, S., & Luo, Y. (2013). Synthesis and characterization of mesoporous alumina and their performances for removing arsenic(V). *Chemical Engineering Journal*, 217, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2012.11.087>
- Hancock, R. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters*, 206(2), 143–149. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00480-3](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00480-3)
- Haney, E. F., Nazmi, K., Lau, F., Bolscher, J. G. M., & Vogel, H. J. (2009). Novel lactoferrin antimicrobial peptides derived from human lactoferrin. *Biochimie*, 91(1), 141–54. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.04.013>
- Haney, E. F., Petersen, A. P., Lau, C. K., Jing, W., Storey, D. G., & Vogel, H. J. (2013). Mechanism of action of puroindoline derived tryptophan-rich antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(8), 1802–1813. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.03.023>
- Helmerhorst, E. J., Reijnders, I. M., van 't Hof, W., Veerman, E. C., & Nieuw Amerongen, A. V. (1999). A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Letters*, 449(2-3), 105–110. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10338113>
- Hicks, R. W., Castagnola, N. B., Zhang, Z., Pinnavaia, T. J., & Marshall, C. L. (2003). Lathlike mesostructured  $\gamma$ -alumina as a hydrodesulfurization catalyst support, 254, 311–317. [http://doi.org/10.1016/S0926-860X\(03\)00476-9](http://doi.org/10.1016/S0926-860X(03)00476-9)
- International journal of hydrogen energy, 1980. (1980). *International Journal of Hydrogen Energy*. [http://doi.org/10.1016/0360-3199\(80\)90035-X](http://doi.org/10.1016/0360-3199(80)90035-X)
- Jaimes Suárez, Y., & Aranzazu Hernández, F. (2010). *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L) en Colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora rozeri)*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA.
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511. <http://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>
- Jiang, Z., Vasil, A. I., Hale, J. D., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2008).

- Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic  $\alpha$ -helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 90(3), 369–383. <http://doi.org/10.1002/bip.20911>
- Jofré, C., Guzmán, F., Cárdenas, C., Albericio, F., & Marshall, S. H. (2011). A natural peptide and its variants derived from the processing of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) displaying enhanced antimicrobial activity: A novel alternative for the control of bacterial diseases. *Peptides*, 32, 852–858. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.026>
- Johansson, E. M., Córdoba, J. M., & Odén, M. (2009). Synthesis and characterization of large mesoporous silica SBA-15 sheets with ordered accessible 18 nm pores. *Materials Letters*, 63(24-25), 2129–2131. <http://doi.org/10.1016/j.matlet.2009.07.013>
- Kapoor, S., Hegde, R., & Bhattacharyya, A. J. (2009). Influence of surface chemistry of mesoporous alumina with wide pore distribution on controlled drug release. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 140(1), 34–9. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.07.015>
- Kent, S. B. (1988). Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 57(1), 957–89. <http://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.004521>
- Kosmulski, M. (2009). Compilation of PZC and IEP of sparingly soluble metal oxides and hydroxides from literature. *Advances in Colloid and Interface Science*, 152(1-2), 14–25. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2009.08.003>
- Kresge, C. T., & Roth, W. J. (2013). The discovery of mesoporous molecular sieves from the twenty year perspective. *Chemical Society Reviews*, 42(9), 3663–70. <http://doi.org/10.1039/c3cs60016e>
- Krstic, V. (2005, October 26). Catalizadores de Rh-soportado y su aplicación en la hidrogenación de crotonaldehído. Universidad de Cantabria. Retrieved from <http://www.tdx.cat/handle/10803/10685>
- Lee, D., Shin, S., Kim, D., Seo, M., & Kang, J. (1999). Antifungal mechanism of a cysteine-rich antimicrobial peptide, Ib-AMP1, from *Impatiens balsamina* against *Candida albicans*. *Biotechnology ...*, 1047–1050. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1005636610512>
- Leofanti, G., Padovan, M., Tozzola, G., & Venturelli, B. (1998). Surface area and pore texture of catalysts. *Catalysis Today*, 41(1-3), 207–219. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(98\)00050-9](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(98)00050-9)
- Li, W., & Zhao, D. (2013). An overview of the synthesis of ordered mesoporous materials. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 49(10), 943–6. <http://doi.org/10.1039/c2cc36964h>
- Llop Hernández, A., Valdés-Dapena Vivanco, M. M., & Zuazo Silva, J. L. (2001). *Microbiología y parasitología médicas*. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
- Lloyd-Williams, P. (1997). *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. New directions in organic and biological chemistry CN - QP551 .L56 1997*. Boca Raton: CRC Press.
- Lozada, B. S., Herrera, L. V., Perea, J. A., Stashenko, E., & Escobar, P. (2012). Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif.

- y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 61(2), 102–110.
- Lu, J. R., Su, T. J., Thirtle, P. N., Thomas, R. K., Rennie, A. R., & Cubitt, R. (1998). The Denaturation of Lysozyme Layers Adsorbed at the Hydrophobic Solid/Liquid Surface Studied by Neutron Reflection. *Journal of Colloid and Interface Science*, 206(1), 212–223. <http://doi.org/10.1006/jcis.1998.5680>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., & Gacto Fernández, M. (2004). *Brock biología de los microorganismos*. México: Prentice Hall Hispanoamericana.
- Márquez-Alvarez, C., Žilková, N., Pérez-Pariente, J., & Čejka, J. (2008). Synthesis, Characterization and Catalytic Applications of Organized Mesoporous Aluminas. *Catalysis Reviews*, 50(2), 222–286. <http://doi.org/10.1080/01614940701804042>
- Marr, A. K., Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(5), 468–72. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.006>
- Matsuura, S., Ishii, R., Itoh, T., Hanaoka, T., Hamakawa, S., Tsunoda, T., & Mizukami, F. (2010). Direct visualization of hetero-enzyme co-encapsulated in mesoporous silicas. *Microporous and Mesoporous Materials*, 127(1-2), 61–66. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.06.029>
- Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1462(1-2), 1–10. [http://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00197-2](http://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00197-2)
- McGinity, J. W., & Felton, L. A. (2008). *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms*. (J. W. McGinity & L. A. Felton, Eds.) (Third edit). New York.
- Meincken, M., Holroyd, D. L., & Rautenbach, M. (2005). Atomic Force Microscopy Study of the Effect of Antimicrobial Peptides on the Cell Envelope of *Escherichia coli*. *Society*, 49(10), 4085–4092. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4085>
- Miyahara, M., Vinu, A., & Ariga, K. (2007). Adsorption myoglobin over mesoporous silica molecular sieves: Pore size effect and pore-filling model. *Materials Science and Engineering: C*, 27(2), 232–236. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.012>
- Muschert, S., Siepmann, F., Leclercq, B., Carlin, B., & Siepmann, J. (2009). Drug release mechanisms from ethylcellulose: PVA-PEG graft copolymer-coated pellets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.12.007>
- Navarre, W. W., & Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 63(1), 174–229. [http://doi.org/10.1092-2172/99/\\$04.00+0](http://doi.org/10.1092-2172/99/$04.00+0)Barnett, Timothy C.
- Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 464–472. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>
- Niesz, K., Yang, P., & Somorjai, G. a. (2005). Sol-gel synthesis of ordered mesoporous alumina. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, (15), 1986–1987. <http://doi.org/10.1039/b419249d>

- Oficial, G., & Divulga, I. (2005). El control de la moniliasis en el cacao, 23–26.
- Orth, D., Grif, K., Zimmerhackl, L. B., & Würzner, R. (2008). Prevention and treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections in humans. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 6(1), 101–108. <http://doi.org/10.1586/14787210.6.1.101>
- Pennington, M. W., & Dunn, B. M. (1994). Peptide Synthesis Protocols (In: *Methods Mol. Biol.* 1994, 35). <http://doi.org/10.1385/0896032736>
- Perullini, A. (2009). *Síntesis de materiales inorgánicos con porosidad controlada para la inmovilización de células: aplicaciones en biorreactores*. Retrieved from [http://bldigital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_4413\\_Perullini.pdf](http://bldigital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4413_Perullini.pdf)
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78–82. [http://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70024-X](http://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70024-X)
- Postgate, J. R., Crumpton, J. E., & Hunter, J. R. (1961). The measurement of bacterial viabilities by slide culture. *Journal of General Microbiology*, 24(1954), 15–24. <http://doi.org/10.1099/00221287-24-1-15>
- Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J. A., & Piedrola-Angulo, G. (1987). *Microbiología y parasitología médica*. Barcelona: Salvat.
- Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(6), 536–47. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>
- Reyes, R. E., Ramírez Saad, H., Solís Galicia, C., Ortiz Herrera, M., & Coria Jiménez, R. (2009). Mecanismos involucrados en la variabilidad del antígeno O de bacterias Gram negativas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 52, 32–43.
- Rink, H. (1987). Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Letters*, 28(33), 3787–3790. [http://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)96384-6](http://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)96384-6)
- Robens, E., Dabrowski, A., & Kutarov, V. V. (2004). Comments on surface structure analysis by water and nitrogen adsorption. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 76(2), 647–657. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000221460800030
- Robinson, J. R. (1978). *Sustained and controlled release drug delivery systems* (Vol. 6). M. Dekker.
- Rodríguez, E. (2006). Técnica de reducción de inóculo para controlar la Moniliasis del cacao en Santander. *Revista Corpoica*, 4(4), 68–78. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Técnica+de+reducción+de+inoculo+para+controlar+la+Moniliasis+del+cacao+en+Santander#0>
- Saldarriaga, Y., & Pineda, F. (2001). *Aislamiento de hongos fitopatógenos. Manual de micología aplicada*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Schlossbauer, A., Schaffert, D., Kecht, J., Wagner, E., & Bein, T. (2008). Click Chemistry for High-Density Biofunctionalization of Mesoporous Silica. *Journal of the American Chemical Society*, 130(38), 12558–12559. <http://doi.org/10.1021/ja803018w>
- Slowing, I. I., Trewyn, B. G., & Lin, V. S.-Y. (2007). Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Delivery of Membrane-Impermeable Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 129(28), 8845–8849. <http://doi.org/10.1021/ja0719780>

- Soler-Illia, G. J. D. a a, Sanchez, C., Lebeau, B., & Patarin, J. (2002). Chemical strategies to design textured materials: From microporous and mesoporous oxides to nanonetworks and hierarchical structures. *Chemical Reviews*, 102(11), 4093–4138. <http://doi.org/10.1021/cr0200062>
- Suhrenbrock, L., Radtke, G., Knop, K., & Kleinebudde, P. (2011). Suspension pellet layering using PVA-PEG graft copolymer as a new binder. *International Journal of Pharmaceutics*. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.061>
- Taylor, R. H., Acland, D. P., Attenborough, S., Cammue, B. P., Evans, I. J., Osborn, R. W., ... Broekaert, W. F. (1997). A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(39), 24480–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9305910>
- Tang, E. S. K., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2005). Coating of multiparticulates for sustained release. *American Journal of Drug Delivery*.
- Tantirungrotechai, J., Chotmongkolsap, P., & Pohmakotr, M. (2010). Synthesis, characterization, and activity in transesterification of mesoporous Mg–Al mixed-metal oxides. *Microporous and Mesoporous Materials*, 128(1-3), 41–47. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.08.001>
- Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, 51(2), 149–77. <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>
- Thevissen, K., François, I. E. J. a, Sijsma, L., van Amerongen, A., Schaaper, W. M. M., Meloen, R., ... Cammue, B. P. a. (2005). Antifungal activity of synthetic peptides derived from *Impatiens balsamina* antimicrobial peptides Ib-AMP1 and Ib-AMP4. *Peptides*, 26(7), 1113–9. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.01.008>
- Thevissen, K., Ghazi, A., Samblanx, W. De, Brownlee, C., Rupert, W., & Broekaert, W. F. (1996). Fungal Membrane Responses Induced by Plant Defensins and Thionins. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 15018–15025. <http://doi.org/10.1074/jbc.271.25.15018>
- Vaara, M., & Nurminen, M. (1999). Outer Membrane Permeability Barrier in *Escherichia coli* Mutants That Are Defective in the Late Acyltransferases of Lipid A Biosynthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), 1459–1462. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89296/>
- Vallet-Regi, M., Rámila, A., del Real, R. P., & Pérez-Pariante, J. (2001). A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. *Chemistry of Materials*, 13(2), 308–311. <http://doi.org/10.1021/cm0011559>
- van der Kraan, M. I. a, van der Made, C., Nazmi, K., van't Hof, W., Groenink, J., Veerman, E. C. I., ... Nieuw Amerongen, A. V. (2005). Effect of amino acid substitutions on the candidacidal activity of LFampin 265-284. *Peptides*, 26(11), 2093–7. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.03.056>
- van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., & Anderson, M. a. (2013). Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 70(19), 3545–70. <http://doi.org/10.1007/s00018-013-1260-1>

- Vásquez, L. E., Guzmán, F., Patarroyo, M. E., & Arango, R. (2009). IN VITRO EVALUATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES AGAINST *Mycosphaerella fijiensis* MORELET AND THEIR INTERACTION WITH SOME CHEMICAL FUNGICIDES. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*.
- Velandía, A., Santiago, J., Esteban, C., & Teresa, M. (2008). *Moniliophthora roreri* EN CACAO *Theobroma cacao* L., 1–3.
- Wan, Y., & Zhao, D. (2007). On the controllable soft-templating approach to mesoporous silicates. *Chemical Reviews*, 107(7), 2821–60. <http://doi.org/10.1021/cr068020s>
- Wang, P., Bang, J.-K., Kim, H. J., Kim, J.-K., Kim, Y., & Shin, S. Y. (2009). Antimicrobial specificity and mechanism of action of disulfide-removed linear analogs of the plant-derived Cys-rich antimicrobial peptide Ib-AMP1. *Peptides*, 30(12), 2144–9. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.09.020>
- Wang, S. (2009). Ordered mesoporous materials for drug delivery. *Microporous and Mesoporous Materials*, 117(1-2), 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.07.002>
- Wang, Y., Noguchi, M., Takahashi, Y., & Ohtsuka, Y. (2001). Synthesis of SBA-15 with different pore sizes and the utilization as supports of high loading of cobalt catalysts. *Catalysis Today*, 68(1-3), 3–9. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(01\)00317-0](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(01)00317-0)
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Xu, L., Song, H., & Chou, L. (2012). One-Pot Synthesis of Ordered Mesoporous NiO – CaO – Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Composite Oxides for Catalyzing CO<sub>2</sub> Reforming of CH<sub>4</sub>.
- Yau, W. M., Wimley, W. C., Gawrisch, K., & White, S. H. (1998). The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry*, 37(42), 14713–14718.
- Yiu, H. H. P., & Wright, P. a. (2005). Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic–organic hybrid. *Journal of Materials Chemistry*, 15(35-36), 3690. <http://doi.org/10.1039/b506090g>
- Yuan, Q., Yin, A.-X., Luo, C., Sun, L.-D., Zhang, Y.-W., Duan, W.-T., ... Yan, C.-H. (2008). Facile synthesis for ordered mesoporous gamma-aluminas with high thermal stability. *Journal of the American Chemical Society*, 130(11), 3465–3472. <http://doi.org/10.1021/ja0764308>
- Zhang, H., & Cooper, A. I. (2007). Aligned porous structures by directional freezing. *Advanced Materials*, 19(11), 1529–1533. <http://doi.org/10.1002/adma.200700154>
- 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. <http://doi.org/10.1074/jbc.M104925200>
- Zhang, Y., Chan, H. F., & Leong, K. W. (2013). Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 104–20. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.003>
- Zinieris, N., Leondiadis, L., & Ferderigos, N. (2005). Nalpha-Fmoc removal from resin-bound amino acids by 5% piperidine solution. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 7(1), 4–6. <http://doi.org/10.1021/cc049872d>



## **CAPITULO 2**

# **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIAL CONTRA Escherichia coli K-12 Y Moniliophthora roreri (Cif & Par) DEL PÉPTIDO Ib-AMP4 Y SUS ANÁLOGOS.**

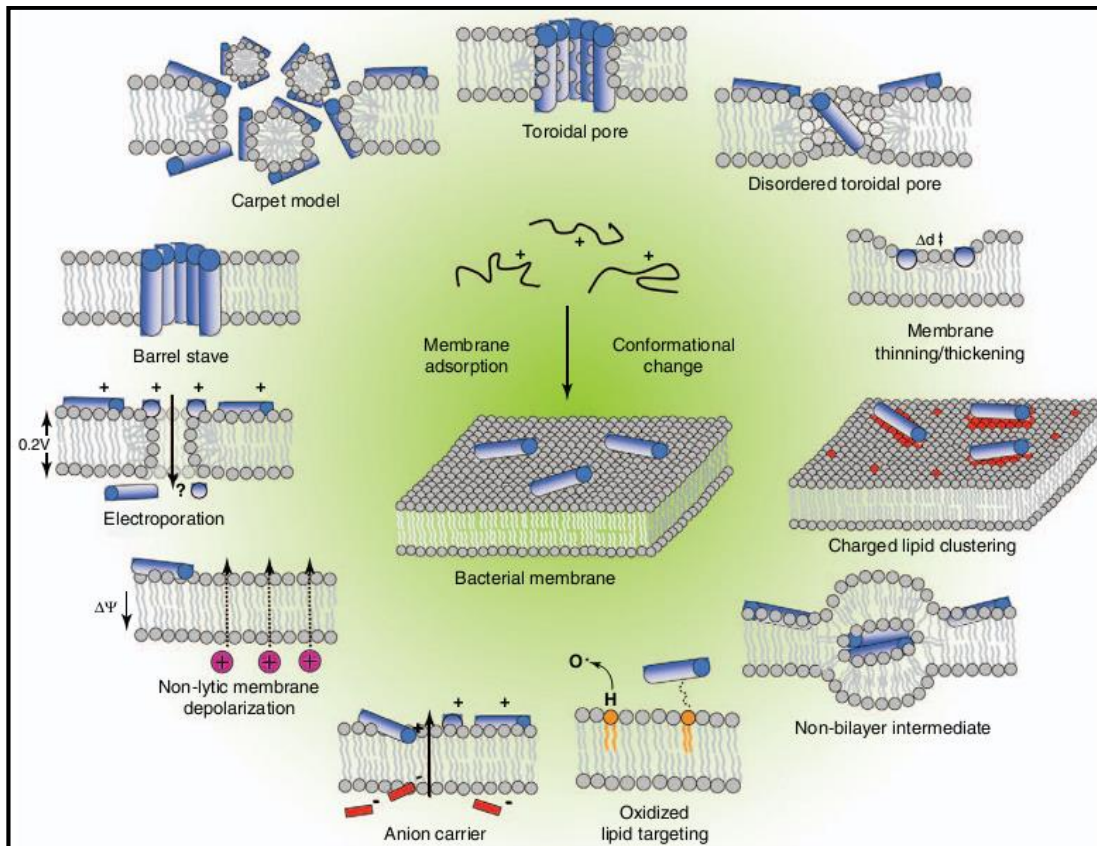
*“La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de todo progreso”*

*Louis Pasteur*

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son una parte importante de del sistema inmune innato de una gran variedad de seres vivos como los anfibios, plantas, insectos, humanos e incluso se han logrado aislar de algunas bacterias y hongos. Los PAMs son biomoléculas cortas constituidas por entre 12 y 100 residuos de aminoácidos (Jensen, Hamill, & Hancock, 2006; Jofré, Guzmán, Cárdenas, Albericio, & Marshall, 2011) que presentan la ventaja de ser específicas hacia determinados microorganismos, lo que ha aumentado su interés como posibles agentes antimicrobianos. Por otro lado, presentan una gran variedad estructuras entre las cuales se pueden mencionar las  $\alpha$ -hélice, las hoja  $\beta$  y las estructuras ricas en cisteínas (Jofré et al., 2011; Reddy, Yedery, & Aranha, 2004). Sin embargo, poseen como características estructurales en común su carga policationica (Bisht, Rawat, Kumar, Kumar, & Pasha, 2007; Chen et al., 2005) y su anfipaticidad, las cuales garantizan su actividad antimicrobiana (Jofré et al., 2011; L. Zhang, Rozek, & Hancock, 2001).

Aunque se han reportado diferentes mecanismos de acción para este tipo de biomoléculas, está claro que el primer paso es la interacción electrostática entre las cargas positivas de los PAMs y los componentes aniónicos de las membranas celulares de los microorganismos (Glukhov, Stark, Burrows, & Deber, 2005; Jiang et al., 2008; Meincken, Holroyd, & Rautenbach, 2005); entre los que se pueden mencionar: los fosfolípidos, el lípido A presente en los lipopolisacaridos (LPS) de las bacterias Gram-negativas y los ácidos teicoicos y teicurónicos presentes en las bacterias Gram-positivas (Brogden, 2005; Meincken et al., 2005). Posterior a esta interacción y dependiendo de la relación péptido/lípidos pueden ocurrir diferentes procesos de permeabilización de las membranas celulares tal como se muestra en la Figura 12. Cuando esta relación es baja los péptidos se alinean paralelamente a la bicapa lipídica; sin embargo, cuando aumenta esta relación comienzan a alinearse perpendicularmente llegando hasta la inserción en la membrana plasmática de los microorganismos (Brogden, 2005). Posterior a la permeabilización puede ocurrir la internalización de los PAMs y la interacción con blancos intracelulares importantes dentro de la célula como el DNA o el RNA (Haney et al., 2013; Teixeira, Feio, & Bastos, 2012).

**Figura 12.** Esquema general de los diferentes procesos de permeabilización de la membrana citoplasmática de las bacterias luego de la interacción inicial con los PAMs (imagen tomada de Nguyen, et al. 2011 (Nguyen, Haney, & Vogel, 2011))



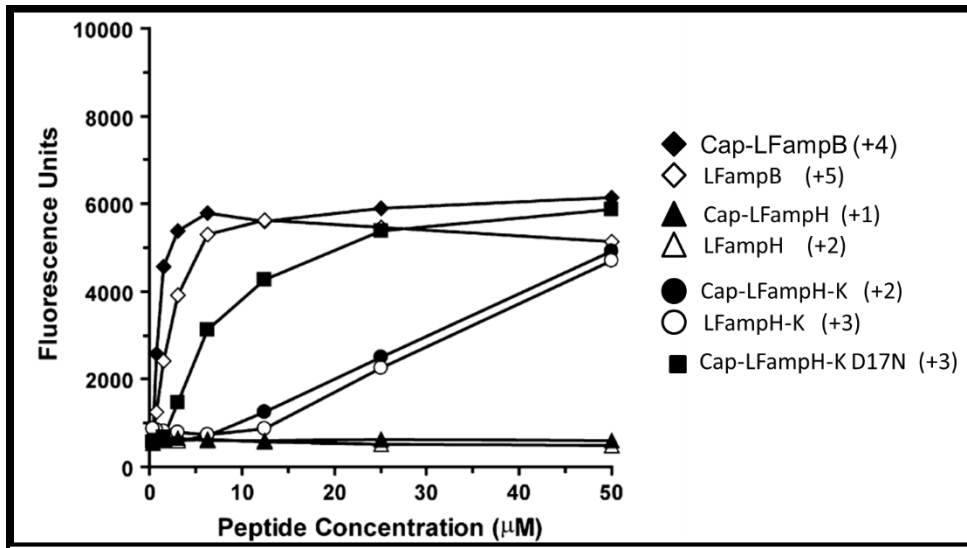
La relación que existe entre la actividad biológica, la estructura secundaria y la carga neta de los péptidos fue observada en un estudio realizado por Haney y col en el 2009. Se utilizaron dos péptidos derivados de la proteína lactoferrina: el LFampB (residuos 268-284 de la proteína bovina) y el LFampH (residuos 269-285 de la proteína humana) (Haney, Nazmi, Lau, Bolscher, & Vogel, 2009). Se evaluó el efecto de la actividad antimicrobial al variar la carga neta adicionando un residuo de lisina (K) en el carbonilo terminal y al aumentar la longitud del alfa-hélice adicionando tres residuos aminoacídicos en el amino terminal (Tabla 2.1).

**Tabla 1.** Secuencia de péptidos y variaciones en la carga neta y en la estructura secundaria de los péptidos LFampH y LFampB (tomada de Haney y col (Haney et al., 2009))

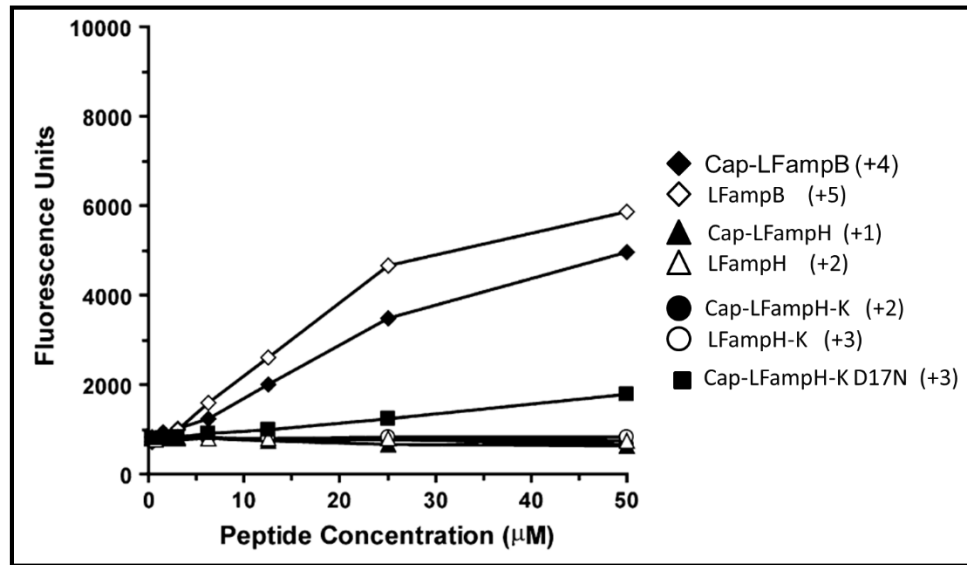
<b>Péptido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Número de aminoácidos</b>	<b>Carga neta</b>
LFampB	WKLLSKAQEKFGKNKSR	17	+5
Cap-LFampB	DLIWKLLSKAQEKFGKNKSR	20	+4
LFampH	WNLLRQAQEKFGKDKSP	17	+2
LFampH-K	WNLLRQAQEKFGKDKSPK	18	+3
Cap-LFampH	DAIWNLLRQAQEKFGKDKSP	20	+1
Cap-LFampH-K	DAIWNLLRQAQEKFGKDKSPK	21	+2
Cap-LFampH-K D17N	DAIWNLLRQAQEKFGKNKSPK	21	+3

Haney y col. observaron un aumento en la actividad antimicrobial del péptido LFampB contra *Candida albicans* cuando se modificó su estructura secundaria adicionando los aminoácidos Asp (D)-Leu (L)-Ile (I), en el N-terminal (cap-LFampB), esto sin importar la disminución de la carga neta positiva del péptido (Figura 13). Estos aminoácidos adicionados cumplen con la función de estabilizar la estructura alfa-hélice de los péptidos lo que provoca un aumento de la actividad contra este microorganismo (van der Kraan et al., 2005). Adicionalmente, encontraron que la actividad antibacteriana contra *Escherichia coli K-12* estaba determinada por la carga neta positiva de los péptidos (Figura 14).

**Figura 13.** Actividad antifúngica de los péptidos LFampB, LFampH y sus análogos frente a *Candida albicans* (tomada de Haney y col. (Haney et al., 2009))



**Figura 14.** Actividad antibacteriana de los péptidos LFampB, LFampH y sus análogos frente a *Escherichia coli* K-12 (tomada de Haney y col. (Haney et al., 2009))



Por otro lado, los péptidos pertenecientes a la familia Ib-AMP poseen dos características estructurales importantes: conservan cuatro residuos de Cys las cuales forman dos puentes disulfuro y poseen varios residuos de Arg en su secuencia aminoacídica por lo que son

péptidos policatiónicos. El péptido Ib-AMP4, perteneciente a la familia Ib-AMP (Thevissen et al., 2005), posee actividad antifúngica contra fitopatógenos como *Fusarium culmorum* y *Botrytis cinerea*. No obstante, este péptido presenta una actividad antibacteriana superior a 500 µg/mL contra bacterias gram-negativas como *Escherichia coli* (Tailor et al., 1997) por lo que los estudios sobre este tipo de microorganismos son muy pocos.

La producción sintética de péptidos como el Ib-AMP4 es compleja debido a la necesidad de realizar una ciclación correcta y a los procesos adicionales de purificación posteriores a la síntesis (Lee, Shin, Kim, Seo, & Kang, 1999). Por esta razón, Thevissen y col. en 2009 analizaron el efecto de la eliminación de los enlaces disulfuro sobre la actividad antifúngica del péptido Ib-AMP4 sobre *Fusarium culmorum*. Para esto, reemplazaron los residuos de Cys por residuos de ácido alfa-aminobutírico y adicionaron residuos de Arg, de uno en uno, en las posiciones 10, 11 y 12. Los péptidos obtenidos con estas modificaciones mantuvieron la actividad antifúngica contra el microorganismo estudiado. Por otro lado al eliminar los enlaces disulfuro y adicionarle un residuo de Trp en la posición 18 y uno de Arg en la posición 20 se presentó un leve aumento de la actividad antifúngica (Tabla 2.2).

**Tabla 2.** Actividad antifúngica contra *F. culmorum* del péptido Ib-AMP4 y sus modificaciones estructurales. <E corresponde al ácido piroglutámico y B al ácido alfa-aminobutírico. Las letras en minúscula corresponden a D-aminoácidos. (Tomada de Thevissen y col. (Thevissen et al., 2005)).

Péptido	Secuencia	IC <sub>2</sub> (µM)
Ib-AMP4	EWGRRCCGWGPGRRYCRRWC	2.5
MCD30	<ewgrrbbgwgpgrrybrwb	0.5
MCC08	<EWGRRBBGRGPGRRYBRRWB	2.5
MCC09	<EWGRRBBGWRPGRRYBRRWB	2.5
MCC10	<EWGRRBBGWGRGRRYBRRWB	2.5
MCD24	<EWGRRBBGWGPGRRYBRWWR	2.0
MCD25	<EWGRRBBGWGPGRRYBRRWW	2.0

En este capítulo se describe la síntesis del péptido Ib-AMP4 y de análogos a este péptido los cuales fueron diseñados con base en los resultados obtenidos por Thevissen y colaboradores en el 2005 (Thevissen et al., 2005). Adicionalmente, se presentan los resultados de la actividad antimicrobial contra *Escherichia coli* K-12 y *Moniliophthora roreri* (Cif & par) de los péptidos sintetizados.

## 2.1. METODOLOGÍA

### 2.1.1 Síntesis en fase sólida de los péptidos análogos al Ib-AMP4.

La síntesis en fase sólida se llevó a cabo en forma manual utilizando el esquema de protección Fmoc/tBu. Se utilizó la resina rink amida AM (0.56 mmol/g); por lo tanto, los péptidos obtenidos se encontraban amidados en el carboxilo terminal. La remoción del grupo Fmoc se realizó utilizando una solución de piperidina al 5% en dimetilformamida (DMF) durante 25 minutos bajo agitación constante (Zinieris, Leondiadis, & Ferderigos, 2005). El diclorometano (DCM), isopropanol (IPA) y DMF fueron utilizados como solventes de lavado. Para la activación del grupo carboxílico de cada aminoácido se utilizó 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU) en presencia de N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) (Lee et al., 1999; P. Wang et al., 2009). Se utilizaron cinco equivalentes de cada aminoácido, 10 equivalentes de DIPEA y cinco equivalentes de TBTU en 20 mL de DMF durante 20 minutos; posteriormente se permitió la reacción de acoplamiento por dos horas bajo agitación constante.

La remoción de los péptidos del soporte polimérico se llevó a cabo durante dos horas utilizando ácido trifluoroacético (TFA), agua y triisopropilsilano (TIPS) en relación 95%:2.5%:2.5%, respectivamente. La remoción de los análogos sintéticos se llevó a cabo de manera similar utilizando ácido TFA, agua y TIPS en relación 95%:2.5%:2.5% respectivamente. Posteriormente se realizó la precipitación de los péptidos con dietil éter frío y se separaron por centrifugación.

### 2.1.2. Síntesis en fase sólida del péptido Ib-AMP4.

Se utilizó el siguiente esquema de protección para cada par de residuos de cisteína: en las posiciones 6 y 16 se utilizaron residuos de cisteína protegida con el grupo acetamidometil (Acm) y en las posiciones 7 y 20 se utilizaron residuos protegidos con el grupo tritilio (-trt).

La remoción del péptido Ib-AMP4 del soporte polimérico se llevó a cabo durante dos horas utilizando ácido TFA, agua, 1,2-etanoditiol (EDT) y TIPS en relación 92.5%:2.5%:2.5%:2.5%, respectivamente (Lee et al., 1999; Zinieris et al., 2005). Posteriormente, se realizó una oxidación selectiva de las cisteínas utilizando una solución 0.013M de yodo en diclorometano (DCM) bajo agitación constante por cinco minutos; posteriormente, se adicionó una solución de ácido ascórbico en buffer citrato (pH 5) bajo agitación constante por dos horas (Pennington & Dunn, 1994). La fase acuosa, en la cual se encontraba el péptido oxidado fue liofilizada para su posterior purificación y caracterización.

### **2.1.3. Purificación y caracterización del péptido Ib-AMP4 y sus análogos.**

La remoción de las sales del péptido crudo obtenido después de la remoción de la resina y la desprotección de las cadenas laterales, se realizó en una columna de sephadex G-10 previamente hidratada con agua MQ. El péptido eludido fue purificado por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (HPLC-RP) utilizando una columna C<sub>18</sub> (Agilent 1100). Como fase móvil se utilizaron la solución A (agua con 0.05% de TFA) y la solución B (acetonitrilo con 0,05% de TFA) en un gradiente de 0-80% de la solución A a la B durante 110 min con un volumen de inyección de 20 µL y un flujo de 1 mL/min. El péptido fue detectado a 254nm con un detector de arreglo de diodos modelo G1315B. Se recogieron los picos detectados y se determinó la masa molecular utilizando espectrometría de masas con desorción iónica por láser y asistida por matriz con detección de tiempo de vuelo MALDI-TOF por sus siglas en inglés (Matrix-Assisted Laser Desorption of Ions Time of Flight) utilizando el ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (ACC) como matriz.

### **2.1.4. Condiciones de crecimiento de *Escherichia coli* K-12.**

*Escherichia coli* K-12 fue cultivada aeróbicamente en medio Müller Hilton (MHB) a 37°C por 18 horas hasta lograr una concentración aproximada de  $2.1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia (UFC)/mL. Para la realización de los ensayos de inhibición la bacteria fue diluida utilizando MHB hasta una concentración de  $1.6 \times 10^6$  UFC/MI

### **2.1.5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB).**

La CMI del péptido Ib-AMP4 y sus análogos se determinó por el método de macrodilución (Wiegand, Hilpert, & Hancock, 2008). Se utilizó MHB para realizar diluciones seriadas de los péptidos a evaluar, posteriormente se adicionó una solución de *Escherichia coli* K-12 hasta obtener una concentración de  $1.6 \times 10^6$  UFC/mL. Las muestras fueron incubadas a 37°C bajo una agitación constante (185rpm) monitoreando la absorbancia a 620nm cada 30 minutos. La CMI fue definida como la mínima concentración a la cual los péptidos producen la inhibición del crecimiento de la bacteria. Para la determinación de CMB se utilizaron aquellos cultivos de *E. coli* que fueron inhibidos por los péptidos; para esto, se realizó el conteo de células viables por el método de siembra puntual en caja Petri siguiendo las modificaciones realizadas por Perullini en 2009 (Perullini, 2009).

### **2.1.6. Aislamiento de *Moniliophthora roreri*.**

El hongo *Moniliophthora roreri* fue aislado de frutos de cacao con síntomas de la enfermedad recolectados en el municipio de Rionegro en Santander. Para el aislamiento del hongo se siguieron los protocolos descritos por Arbelaez en el 2010 (Arbelaez, 2010) y Suárez Contreras en el 2013 (Contreras & Riaño, 2013). Se cortaron fragmentos triangulares de las zonas infectadas del fruto y se realizó desinfección de la muestra realizando un lavado con una solución del hipoclorito al 1% por un minuto, seguido de un lavado con etanol al 70% por un minuto y finalmente con agua esterilizada por un minuto (Figura 2.10). Posteriormente estos fragmentos esterilizados se sembraron en cajas Petri con contención medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA). Finalmente, se permitió el crecimiento del hongo por 10 días a una temperatura de 28°C en oscuridad.

Los aislados obtenidos presentaron diferentes diámetros y coloraciones por lo que solo se utilizó el aislamiento con mayor diámetro. Se realizó la siembra directa de este aislado en cajas Petri como se describe en el trabajo realizado por de Chacón Almeida en el 2014 en nuestro grupo de Investigación (Chacón Almeyda, 2014)

### **2.1.7. Determinación de la inhibición del crecimiento micelial del péptido Ib-AMP4 y sus análogos**

Se utilizó el aislado de *Moniliophthora roreri* que presentó mayor diámetro de crecimiento después de 10 días de incubación. La inhibición del crecimiento micelial se realizó de forma macroscópica utilizando el método descrito por Lozada y colaboradores en el 2012 (Lozada, Herrera, Perea, Stashenko, & Escobar, 2012). Para esto se utilizó un cultivo de 10 días de incubación de *Moniliophthora roreri* en PDA y se tomaron fragmentos de 5mm de diámetro de la colonia y se colocaron en el centro de cajas Petri de 10cm de diámetro que contenían PDA con diluciones de cada uno de los péptidos. Se midió la longitud de la colonia en cada una de las cajas durante 21 días y se utilizó la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de inhibición:

$$\%inhibición = 100 - \frac{(T \times 100)}{C}$$

Donde T son los valores del diámetro de la colonia con el péptido y C son los valores del control negativo, los cuales se obtuvieron al permitir el crecimiento de la colonia en ausencia de péptido (Saldarriaga & Pineda, 2001). Cada ensayo se realizó por duplicado.

### **2.1.8. Determinación de la actividad hemolítica de los péptidos Ib-M6 e Ib-A4.**

La actividad hemolítica de los péptidos Ib-M6 e Ib-A4 fue monitoreada de acuerdo a los métodos empleados por Helmerhorst y colaboradores en 1999 (Helmerhorst, Reijnders, van 't Hof, Veerman, & Nieuw Amerongen, 1999) y Thevissen y colaboradores en 2005 (Thevissen et al., 2005). Se recolectó una muestra de sangre en tubos de vacío de un individuo sano, quien dio su consentimiento firmado. Los eritrocitos fueron recolectados por centrifugación (10 minutos, 210xg a 20°C) y tres lavados sucesivos con TBS (10mM Tris/HCl, 150mM NaCl, pH 7.4) hasta la aparición de un sobrenadante. Los eritrocitos se dispersaron en TBS hasta una concentración final de 1% v/v y se incubaron con alícuota de péptido por separado, en concentraciones de 1, 2, 4, 5 y 100µM, durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos a 473xg y se midió la absorbancia a 450nm. Como blanco negativo se utilizó una solución de eritrocitos sin péptido y como blanco positivo se utilizó agua. El porcentaje de hemolisis fue calculado de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{Hemolisis} = \frac{A_{450} \text{ muestra tratada con peptido} - A_{450} \text{ muestra tratada con buffer}}{A_{450} \text{ muestra tratada con agua} - A_{450} \text{ muestra tratada con buffer}} \times 100$$

## 2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.2.1 Síntesis en fase sólida del péptido Ib-AMP4 y sus análogos.

La secuencia de los péptidos sintetizados se muestra en la Tabla 2.3. Se sintetizaron 12 análogos del péptido Ib-AMP4 los cuales carecían de los puentes disulfuro característicos del péptido nativo. Con el objetivo de mantener el número de átomos de azufre en la secuencia y analizar su efecto sobre la actividad antimicrobial, en seis de las variantes sintéticas, denominadas análogos Ib-M, se reemplazó el residuo Tyr-15 y los residuos Cys-6, 7 y 16 por residuos de Met.

En el estudio realizado por Thevissen y colaboradores en el 2005 (Thevissen et al., 2005) los residuos de Cys del péptido nativo fueron reemplazadas por el ácido alfa-aminobutírico, un aminoácido no esencial que no se encuentra codificado en el código genético. Con esta modificación y otras adicionales lograron aumentar la actividad antifúngica contra *Fusarium culmorum* de los análogos al Ib-AMP4 sintetizados. En el presente trabajo se decidió utilizar aminoácidos esenciales, por esta razón en seis de las variantes sintéticas, denominadas análogos Ib-A, se utilizó el aminoácido Ala, el aminoácido más sencillo, para reemplazar los residuos Cys-6, 7 y 16.

Se realizaron de manera paralela las modificaciones realizadas por Thevissen y colaboradores (Thevissen et al., 2005) en el carboxilo terminal del péptido Ib-AMP4; por esta razón, en los análogos Ib-M1 al Ib-M3 y los análogos Ib-A1 al Ib-A3 se reemplazaron los residuos Cys-20 y Arg-18 por residuos de Arg y Trp respectivamente. Por otro lado, en los análogos Ib-M4 al Ib-M6 y los análogos Ib-A4 al Ib-A6 se reemplazó el residuo Cys-20 por un residuo de Trp. Adicionalmente, en todos los análogos sintetizados los residuos Gly-8, Trp-9 y Pro-10 fueron reemplazados de uno en uno en cada péptido por un residuo de Arg.

**Tabla 3.** Secuencias de aminoácidos, carga y masa molecular del péptido Ib-AMP4 y sus análogos sintéticos.

Péptidos	Secuencia de aminoácidos	Carga	Tiempo de retención (min)	Masa molecular	
				Calculada (Da)	Obtenida (m/z)
Ib-AMP4	EWGRRCCGWGPGRRYCRRWC-NH <sub>2</sub>	+5	36,008	2538.94	2538.87
Ib-M1	EWGRRMMGRGPGRMMRWW-NH <sub>2</sub>	+7	32,407	2649.24	2649.12
Ib-M2	EWGRRMMGWRPGRMMRWW-NH <sub>2</sub>	+7	34,865	2778.40	2778.22
Ib-M3	EWGRRMMGWGRGRRMMRWW-NH <sub>2</sub>	+7	33,931	2738.33	2738.21
Ib-M4	EWGRRMMGRGPGRMMRRWW-NH <sub>2</sub>	+7	37,066	2649.24	2649.33
Ib-M5	EWGRRMMGWRPGRMMRRWW-NH <sub>2</sub>	+7	39,878	2778.40	2778.45
Ib-M6	EWGRRMMGWGRGRRMMRRWW-NH <sub>2</sub>	+7	39,386	2738.33	2738.39
Ib-A1	EWGRRAAGRGPGRRYARWW-NH <sub>2</sub>	+7	36,209	2500.86	2500.97
Ib-A2	EWGRRAAGWRPGRRYARWW-NH <sub>2</sub>	+7	38,192	2630.02	2630.37
Ib-A3	EWGRRAAGWGRGRRYARWW-NH <sub>2</sub>	+7	35,222	2589.95	2589.47
Ib-A4	EWGRRAAGRGPGRRYARRW-NH <sub>2</sub>	+7	36,347	2500.86	2500.46
Ib-A5	EWGRRAAGWRPGRRYARRW-NH <sub>2</sub>	+7	38,199	2630.02	2630.15
Ib-A6	EWGRRAAGWGRGRRYARRW-NH <sub>2</sub>	+7	36,087	2589.95	2589.43

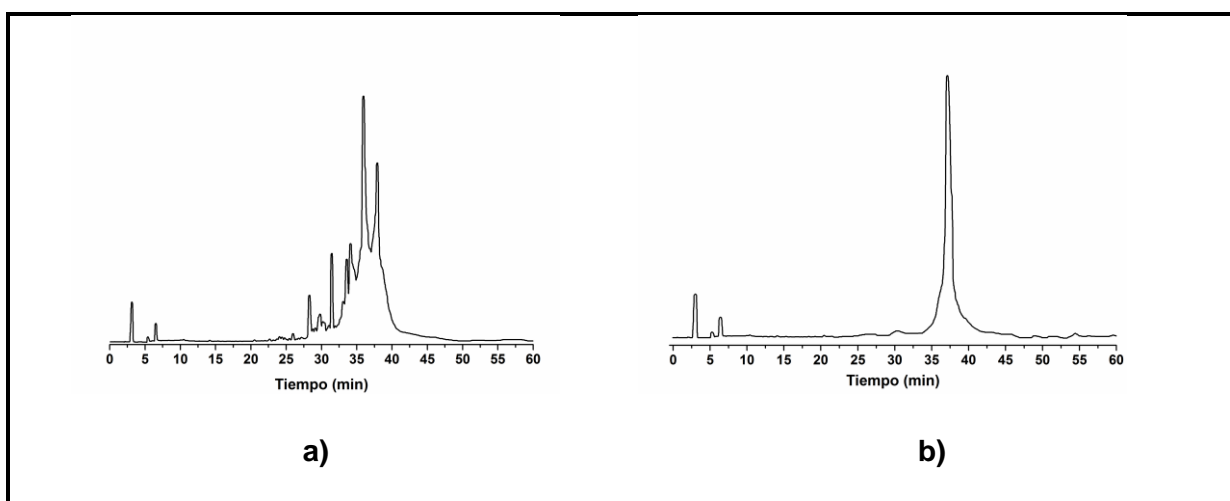
Se utilizó la síntesis en fase sólida utilizando aminoácidos N<sup>α</sup>-Fmoc protegidos. La resina utilizada como soporte fue rink amida AM con un grado de sustitución de 0.56mmol/g. Posterior al desanclaje y a la precipitación con dietil éter los péptidos obtenidos se disolvieron en agua desionizada y fueron congelados en nitrógeno líquido. Inmediatamente después fueron liofilizados, desalinizados en columnas de G-10 y posteriormente purificados por RP-HPLC.

### 2.2.2. Purificación y caracterización del péptido Ib-AMP4 y sus análogos.

En la Figura 15a se presenta el cromatograma obtenido para el péptido Ib-AMP4 sin oxidar. Se observa entre los minutos 28 al 35 la presencia de algunos picos de menor intensidad que pueden pertenecer a péptidos más pequeños producidos por deleciones ocurridas durante el proceso de síntesis. Los picos que aparecen a tiempos entre 0 y 10 minutos

corresponden a la fase móvil de acetonitrilo-agua con 0.05% de TFA. Se recogieron los dos picos de mayor intensidad y se determinó por espectrometría de MALDI-TOF que el pico que aparece a 37,9 minutos corresponde al péptido oxidado; mientras que, el pico a 35,9 minutos corresponde al Ib-AMP4 reducido. Este péptido recogido fue tratado con una solución de yodo en acetonitrilo para permitir la formación de los enlaces disulfuro. Posteriormente, se liofilizó y se desalinizó en una columna de G-10 y se realizó nuevamente la corrida cromatográfica, observándose la presencia de un único pico a 37,5 minutos que corresponde al péptido Ib-AMP4 oxidado (Figura 15b).

**Figura 15.** Perfil cromatográfico del péptido Ib-AMP4 a) reducido y b) oxidado.

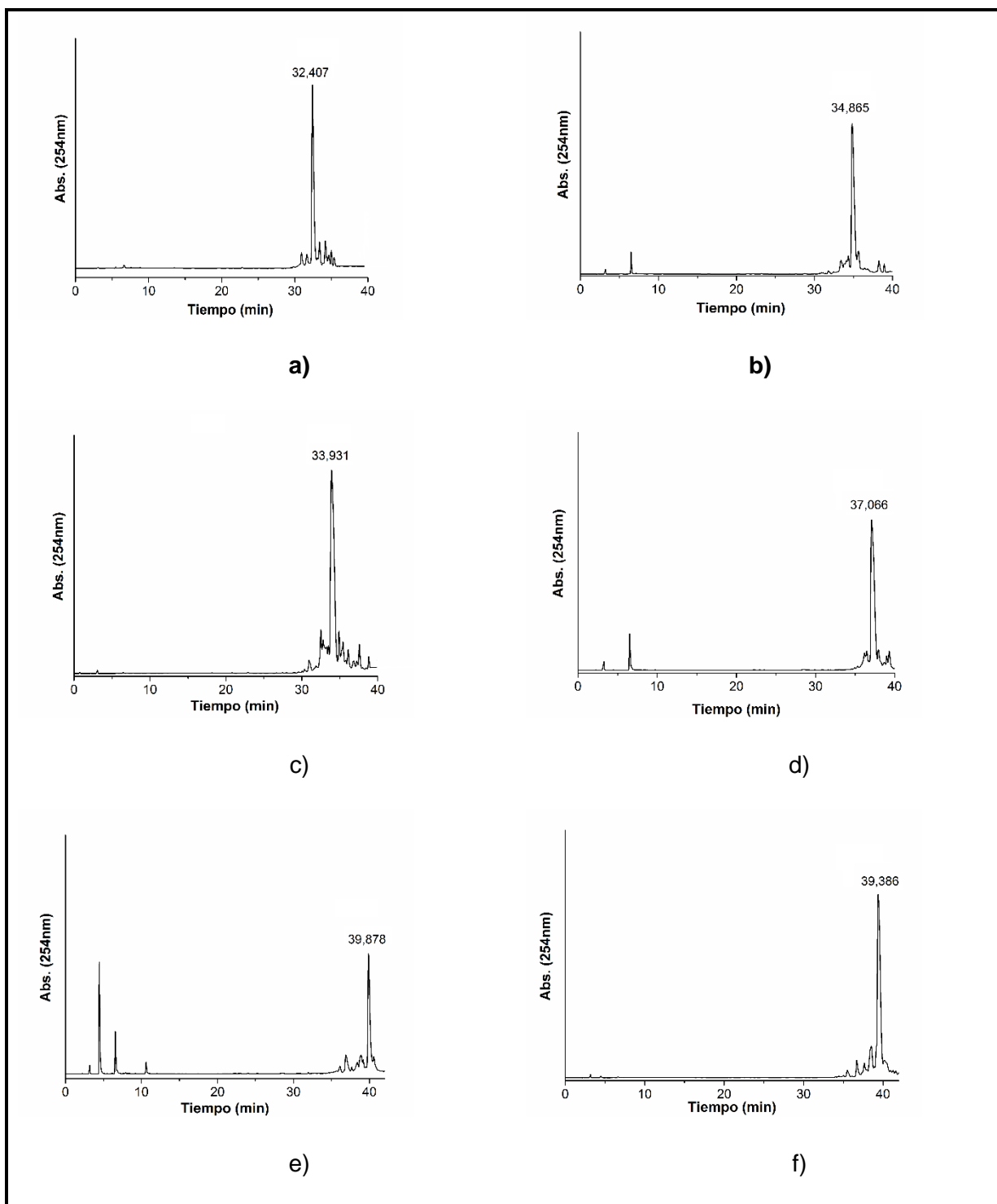


La eliminación de los residuos de cisteína en los análogos sintéticos favoreció la disminución de subproductos obtenidos durante la síntesis, tal como se puede observar en la Figura 16, donde se presentan los perfiles cromatográficos de los análogos Ib-M (Anexo A: perfiles cromatográficos de los análogos Ib-A). En ellos se observa la presencia de una señal principal que corresponde a cada uno de los análogos sintetizados. Los picos que aparecen a tiempos entre 0 y 10 minutos corresponden a la fase móvil de acetonitrilo-agua con 0.05% de TFA.

Los tiempos de retención obtenidos para cada pico representativo de cada uno de los péptidos se muestran en la Tabla 2.3. Se observa que los péptidos Ib-M4, Ib-M5 e Ib-M6

presentan los mayores tiempos de retención debido a los dos residuos de Trp en el carboxilo terminal, los cuales aumentan la hidrofobicidad y la interacción de los péptidos con la fase estacionaria. Un efecto similar se observa en los tiempos de retención obtenidos para los péptidos de la serie Ib-A. Los picos de mayor intensidad fueron recolectados, liofilizados y conservados para los estudios posteriores. Adicionalmente, se determinó la masa molecular de los péptidos sintetizados por espectrometría de masas MALDI-TOF y se corroboró que los valores obtenidos eran los esperados (Anexo B).

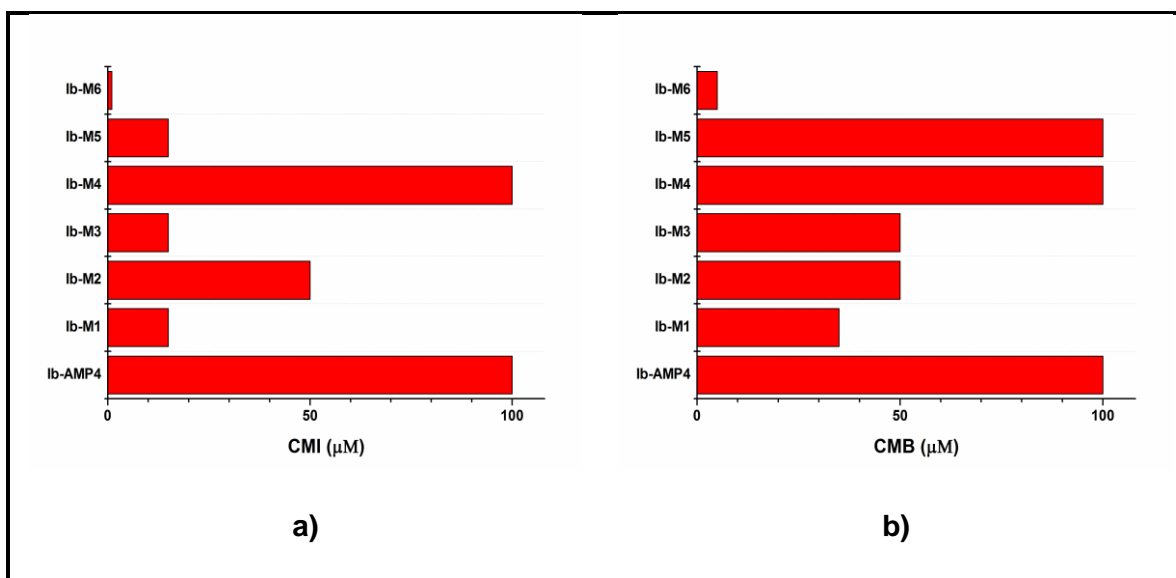
**Figura 16.** Perfiles cromatográficos de los péptidos a) Ib-M1, b) Ib-M2, c) Ib-M3, d) Ib-M4, e) Ib-M5 y f) Ib-M6.



### 2.2.3. Determinación de la actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* K-12.

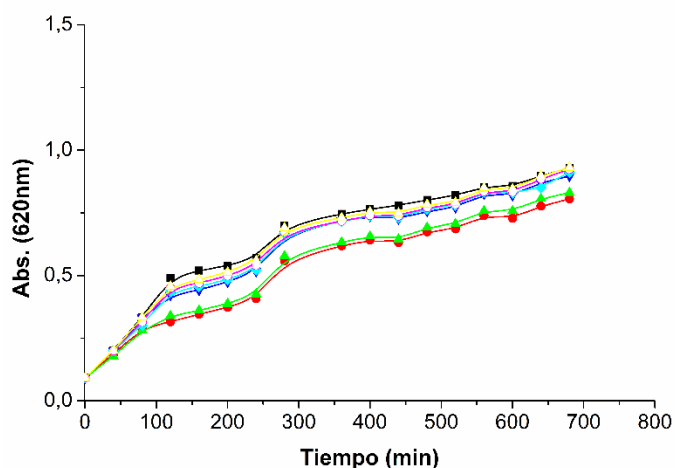
La actividad antibacteriana del péptido nativo Ib-AMP4 y sus análogos contra *Escherichia coli* K-12 fue determinada utilizando medio de cultivo Müller-Hilton y el método de macrodilución. En la Figura 17 se muestran los resultados de CMI y CMB obtenidos para el péptido Ib-AMP4 y los análogos Ib-M.

**Figura 17. a)** Concentración mínima inhibitoria y **b)** concentración mínima bactericida obtenidas para el péptido Ib-AMP4 y los análogos Ib-M.



En primer lugar, se evaluó la cinética de crecimiento de la bacteria en presencia de diferentes concentraciones del péptido Ib-AMP4 obteniéndose valores de CMI y CMB superiores a 100µM. Aun así, se observó que a las concentraciones de 80 y 100µM hubo una disminución del crecimiento bacteriano en un 11% y 13%, respectivamente (Figura 17). Indicando que si bien existe una interacción entre el péptido y la bacteria, esta no es suficiente para inhibir significativamente el crecimiento bacteriano.

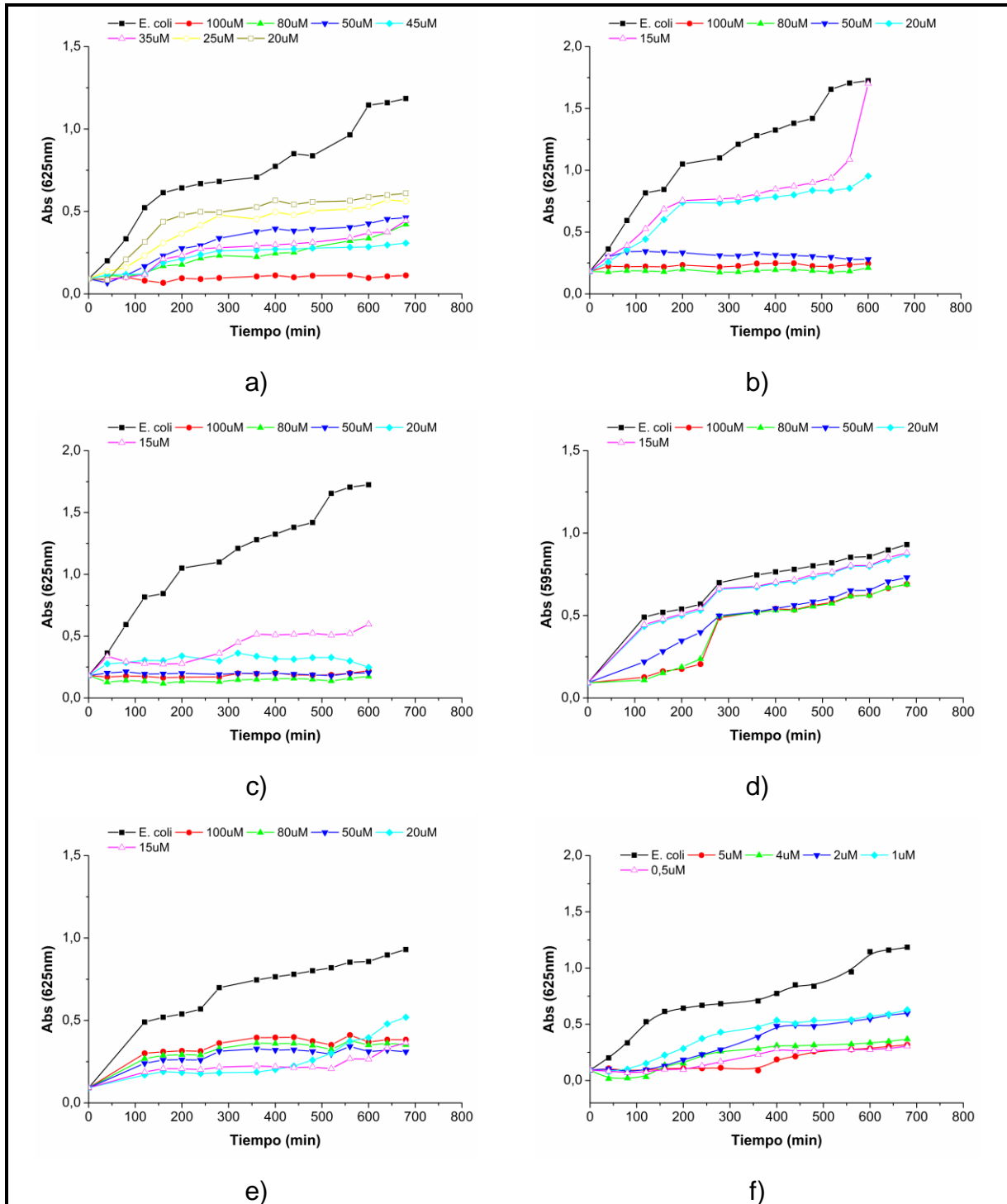
**Figura 18.** Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* K-12 en ausencia (cuadrados negros) y en presencia del péptido Ib-AMP4 a concentraciones de 100 $\mu$ M (círculos rojos), 80 $\mu$ M (triángulos verdes), 50 $\mu$ M (triángulos inversos azules), 30 $\mu$ M (rombos celestes), 20 $\mu$ M (círculos sin relleno) y 10 $\mu$ M (triángulos sin relleno)



De igual manera se evaluó la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* K-12 en presencia de los análogos Ib-M obteniéndose para todos, con excepción de Ib-M4, valores de CMI<sub>50</sub> menores al obtenido para Ib-AMP4 (Figura 18). Esto indica que las modificaciones realizadas en la secuencia del péptido nativo mejoraron la actividad antibacteriana de estos análogos.

El péptido Ib-M4 presentó un valor de CMI<sub>50</sub> superior a 100 $\mu$ M siendo el único de la serie Ib-M en no presentar actividad contra *E. coli*. Sin embargo, a concentraciones superiores a 80 $\mu$ M se presenta un aumento en el tiempo lag, observándose un retraso en el inicio de la fase exponencial (Figura 19d.). Esto puede explicarse por una posible interacción temporal entre el péptido y la bacteria, seguramente con la membrana celular, lo que retrasó la adaptación de la bacteria al medio de cultivo. Los péptidos Ib-M1 e Ib-M4 conservan los residuos de Gly-10 y Pro-11 pero Ib-M1 presenta una actividad antibacteriana superior, con un valor de CMI<sub>50</sub> de 15 $\mu$ M. Por lo tanto, se puede afirmar que estos residuos no se encuentran involucrados en el mecanismo de acción de estos péptidos y por ende no son significativos en la actividad contra *E. coli*.

**Figura 19.** Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* K-12 en presencia de los péptidos a) Ib-M1, b) Ib-M2, c) Ib-M3, d) Ib-M4, e) Ib-M5 y f) Ib-M6.

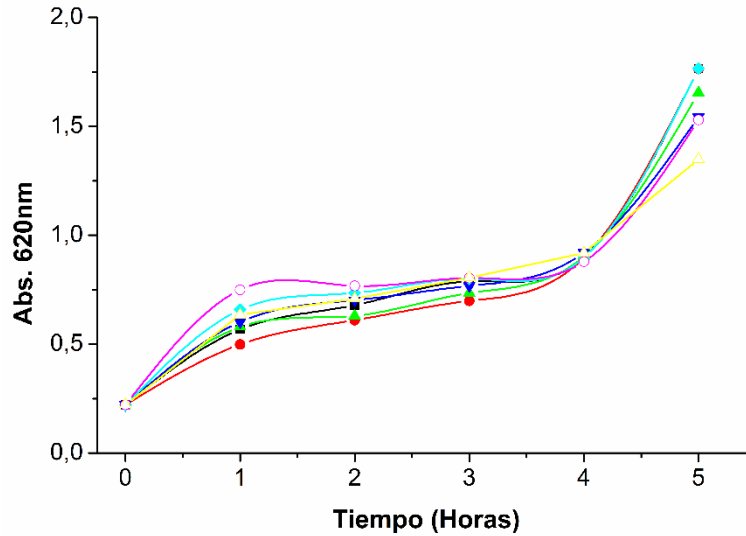


Los análogos Ib-M5 e Ib-M6, en los cuales el residuo de Cys-20 fue reemplazado por un residuo de Trp, presentan una mayor actividad que los análogos Ib-M2 e Ib-M3 que poseen un residuo de Arg en esta posición. Debido a que los residuos de Trp pueden ubicarse en la región interfacial de la membrana lipídica (Guzmán, Marshall, Ojeda, Albericio, & Carvajal-Rondanelli, 2013; Yau, Wimley, Gawrisch, & White, 1998), es posible que al encontrarse en el C-terminal favorezca la inserción de los péptidos en la membrana beneficiando de esta manera su actividad antibacteriana contra *E. coli* K-12. Sin embargo, este efecto es más notorio en el análogo Ib-M6, el cual presentó la mejor actividad antibacteriana con valores de CMI<sub>50</sub> y CMB de 1µM y 5µM, respectivamente.

Con base en los resultados obtenidos para los péptidos Ib-M se evidencia que no solo la carga total neta, la cual corresponde a +6 para todos los análogos sintéticos, determina la actividad antibacteriana de estos péptidos. La distribución de la carga en la secuencia juega un rol fundamental ya que de esta manera se favorece la interacción con las cargas negativas de las membranas celulares de las bacterias.

Finalmente, se evaluó la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* K-12 en presencia de diferentes concentraciones (10 a 100µM) de los análogos sintetizados pertenecientes a la serie Ib-A. Se encontró que ninguno de estos péptidos logró inhibir el crecimiento bacteriano en las concentraciones evaluadas. Estos análogos poseen seis residuos hidrofóbicos en su secuencia a diferencia de los análogos Ib-M que tiene siete; es posible que esta disminución en la hidrofobicidad de las secuencias redujera la interacción de los péptidos con la membrana celular de la bacteria y por esta razón no se observó una inhibición en el crecimiento bacteriano. En la Figura 20 se muestra la cinética de crecimiento de la bacteria en presencia de cada uno de los péptidos Ib-A a una concentración de 100µM.

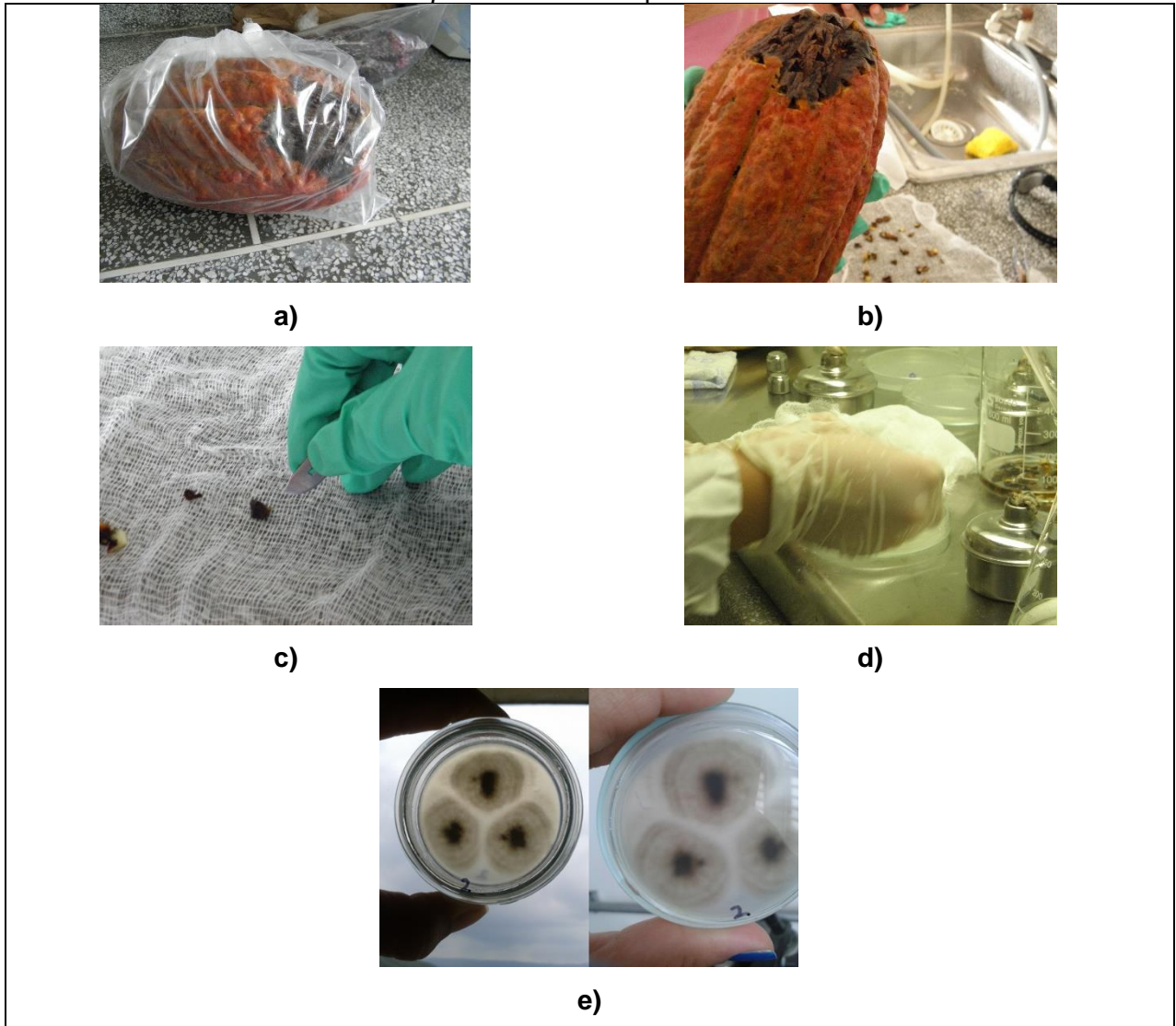
**Figura 20.** Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* K-12 en ausencia (cuadrados negros) y en presencia de los péptidos Ib-A1(círculos rojos), Ib-A2(triángulos verdes), Ib-A3 (triángulos inversos azules), Ib-A4 (rombos celestes), Ib-A5 (círculos sin relleno) e Ib-A6 (triángulos sin relleno) a una concentración de 100µM.



#### 2.2.4. Aislamiento de *Moniliophthora roreri*.

El aislamiento de *Moniliophthora roreri* se realizó siguiendo los pasos que se presentan en la Figura 21. Posterior al aislamiento se obtuvieron colonias de *Moniliophthora roreri* que presentaron un color crema-marrón tal a los encontrados por Chacón Almeida en el 2014 (Chacón Almeida, 2014). Se tomó el aislado con mayor diámetro de crecimiento para la realización de las pruebas de inhibición

**Figura 21.** Procedimiento para el aislamiento de *Moniliophthora roreri* a partir de frutos enfermos de cacao: a) recolección de frutos enfermos, b) obtención de fragmentos triangulares de la sección enferma del fruto, c) esterilización de los fragmentos obtenidos, d) siembra de los fragmentos esterilizados en placas Petri con medio de cultivo PDA y e) obtención de la colonia de *Moniliophthora roreri* después de 10 días de incubación.



### 2.2.5. Determinación de la actividad antifúngica del péptido Ib-AMP4 y sus análogos.

Se sabe que el péptido Ib-AMP4 posee actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos importantes como como *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum* (Thevissen et al., 2005) y *Mycosphaerella fijiensis* (Vásquez, Guzmán, Patarroyo, & Arango, 2009). Por esta razón, se evaluó en primer lugar la actividad antifúngica del péptido contra *Moniliophthora roreri* en un rango de concentraciones de 1µM a 100µM. Sin embargo, después de 10 días de incubación no se observó ningún efecto sobre el crecimiento micelial del hongo, lo que indica que este péptido no presenta actividad antifúngica contra este fitopatógeno en ninguna de las concentraciones evaluadas. En investigaciones realizadas sobre los péptidos pertenecientes a la familia Ib-AMP se ha encontrado que un paso importante en el mecanismo de acción de estos péptidos es la interacción con las membranas celulares (Thevissen et al., 2005; van der Weerden et al., 2013; P. Wang et al., 2009), cuya composición química varía entre especies. Los hongos contra los cuales ha sido evaluada la actividad antifúngica del péptido Ib-AMP4 pertenecen a la división Ascomycota, mientras que *Moniliophthora roreri* pertenece a la división Basidiomycota. Debido a esto, es posible que existan diferencias significativas en las membranas celulares de estos hongos que dificulten la interacción péptido-patógeno, lo cual explica la inactividad del péptido Ib-AMP4 contra *M. roreri*.

Se determinó la actividad antifúngica contra *Moniliophthora roreri* de los análogos Ib-A. En la Tabla 2.4 se muestran los porcentajes de inhibición obtenidos para todos los péptidos de esta serie con excepción del Ib-A4 y se encontró que a una concentración de 100 µM logran inhibir el crecimiento micelial de este fitopatógeno hasta un 57,5 % como es el caso del péptido Ib-A2. El péptido Ib-A es el más activo de esta serie con un valor de CMI de 1µM y un porcentaje de inhibición del 75 %. Es posible la Arg-9 permita una mayor interacción del péptido con la membrana celular del hongo; además, el aumento en la hidrofobicidad del C-terminal, debido a la presencia de dos residuos de Trp permite una mayor inclusión de los residuos de Arg en la membrana celular aumentando de esta manera la inhibición del crecimiento micelial.

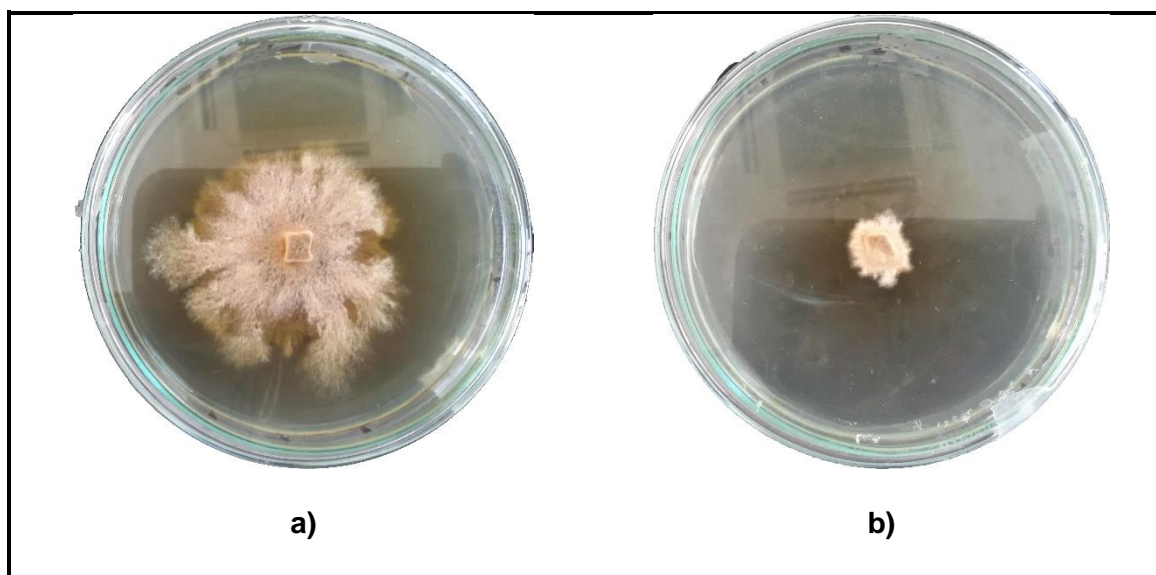
**Tabla 4.** Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en presencia de de 100µM de los péptidos Ib-A1, Ib-A2, Ib-A3, Ib-A5 e Ib-A6.

Péptido	Inhibición del crecimiento micelial <sup>1</sup> (%±DE <sup>2</sup> )
Ib-A1	34,8 ± 1,50
Ib-A2	57,5 ± 1,41
Ib-A3	52,5 ± 1,07
Ib-A5	29,6 ± 1,01
Ib-A6	11,7 ± 1,41

<sup>1</sup>Porcentaje de inhibición obtenido a los 10 días de incubación.

<sup>2</sup>DE: desviación estándar.

**Figura 22** Crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en **a)** ausencia de péptido y **b)** en presencia del péptido Ib-M4 a una concentración de 1µM.



Finalmente se determinó la actividad antifúngica de los análogos Ib-M y se encontró que estos péptidos no presentan actividad contra *Moniliophthora roreri*. Se ha reportado que los péptidos antifúngicos aislados de las plantas presentan en su estructura primaria un número significativo de aminoácidos neutros polares entre los cuales se encuentra la tirosina (van der Weerden et al., 2013), este aminoácido fue eliminado de la estructura primaria de los análogos Ib-M pero

se conservó en la de los análogos Ib-A, demostrando que la presencia o ausencia de la tirosina en estos péptidos afecta de manera directa la actividad antifúngica contra *M.roreri*.

### 2.2.6. Determinación de la actividad hemolítica de los péptidos Ib-M6 e Ib-A4.

Una vez se definieron los análogos sintéticos que presentaron mejor actividad antimicrobiana contra *E. coli* K-12 y *M. roreri*, se procedió a determinar la actividad hemolítica de estos péptidos sobre eritrocitos humanos. Para el péptido Ib-M6 se encontró un porcentaje de hemolisis del 29% a una concentración de 100µM; sin embargo, a la CMI de este péptido, es decir a 1µM, no se observó degradación de los eritrocitos (Tabla 2.5)

**Tabla 5.** Actividad hemolítica del péptido Ib-M6 sobre eritrocitos humanos.

Concentración (µM)	Hemolisis (% ± DE <sup>1</sup> )
1	No detectable
2	0,946 ± 0,299
4	2,49 ± 0,018
5	3,02 ± 0,434
100	29,1 ± 1,05

<sup>1</sup>DE: desviación estándar

Para el péptido Ib-A4 se encontró un porcentaje de hemolisis superior al 100% para concentraciones superiores a 20µM; sin embargo a concentraciones de 1 y 5µM, no se observó degradación de los eritrocitos (Tabla 2.6).

**Tabla 6.** Actividad hemolítica del péptido Ib-A4 sobre eritrocitos humanos.

Concentración (µM)	Hemolisis (% ± DE <sup>1</sup> )
1	No detectable
5	No detectable
20	27.0 ± 2,12x10 <sup>-3</sup>
50	155 ± 2,83x10 <sup>-3</sup>
100	246 ± 4,24x10 <sup>-3</sup>

<sup>1</sup>DE: desviación estándar

### 2.3. CONCLUSIONES.

Se sintetizó el péptido Ib-AMP4 mediante síntesis en fase sólida utilizando aminoácidos protegidos con el grupo Fmoc. Este péptido presentó actividad antimicrobial contra *Escherichia coli* K-12 o *Moniliophthora rori* (Cif & Par).

Se sintetizaron dos series de péptidos análogos al péptido Ib-AMP4 que presentaban modificación en la hidrofobicidad del C-terminal y en la carga neta. La serie de análogos Ib-M presentaron actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* K-12 y la serie de análogos Ib-A presentaron actividad antifúngica contra *Moniliophthora rori* (Cif & Par).

El péptido Ib-M6 fue el análogo sintético de la serie Ib-M que presentó mejor actividad contra *E. coli* K-12 con un valor de CMI de 1  $\mu$ M. Por otro lado, Ib-M4 fue el único análogo de esta serie en presentar un valor de CMI superior a 100  $\mu$ M; sin embargo, en presencia de este péptido la cinética de crecimiento de la bacteria mostró un aumento en el tiempo lag lo que indica una demora en la fase de adaptación de la bacteria.

Todos los análogos de la serie Ib-A presentaron actividad antifúngica contra *Moniliophthora rori* (Cif & Par). El péptido Ib-A2 presentó la CMI más baja con un valor de 1  $\mu$ M y un porcentaje de inhibición del 75%.

Los péptidos Ib-M6 e Ib-A4 no presentaron actividad hemolítica contra eritrocitos humanos en el valor de CMI el cual fue de 1  $\mu$ M para ambos análogos.

### 2.4. REFERENCIAS

- Aapptec. (n.d.). *Practical synthesis guide to solid phase peptide chemistry*.
- Addorisio, V., Esposito, S., & Sannino, F. (2010). Sorption capacity of mesoporous metal oxides for the removal of MCPA from polluted waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5011–5016.
- Alves, M. H., Jensen, B. E. B., Smith, A. a a, & Zelikin, A. N. (2011). Poly(vinyl alcohol) physical hydrogels: New vista on a long serving biomaterial. *Macromolecular Bioscience*, 11(10), 1293–1313. <http://doi.org/10.1002/mabi.201100145>
- Amatani, T., Nakanishi, K., Hirao, K., & Kodaira, T. (2005). Monolithic Periodic Mesoporous Silica with Well-Defined Macropores Monolithic Periodic Mesoporous Silica with Well-Defined Macropores. *Chemistry of Materials*, 17(March), 2114–2119. <http://doi.org/10.1021/cm048091c>
- Antonio, P. P. (2013). *Silicatos y alúminosilicatos mesoporosos funcionalizados como*

- catalizadores en reacciones de interés en química fina*. Universidad de Córdoba.
- Arbelaez, L. (2010). *Análisis de la diversidad intraespecie de Moniliophthora roreri por medio de marcadores morfológicos y genéticos*. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/1938/1/43276997.20101.pdf>
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., ... Stockinger, H. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. Retrieved from <http://www.expasy.org/>
- Ayala Benítez, M. F. (2008). *Manejo integrado de moniliasis (Moniliophthora roreri) en el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.) mediante el uso de fungicidas, combinado con labores culturales*. Escuela superior politecnica del litoral.
- Benoiton, N. L. (2006). *Chemistry of peptide synthesis*. Boca Raton.
- Beveridge, T. J. (1999). Structure of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, 181(16), 4725–4733.
- Bisht, G. S., Rawat, D. S., Kumar, A., Kumar, R., & Pasha, S. (2007). Antimicrobial activity of rationally designed amino terminal modified peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(15), 4343–6. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.05.015>
- Blanco-Labra, A., & Aguirre Mancilla, C. (2002). Proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de plantas. *Acta Universitaria*, 12(3), 31–43.
- Bolognini, M., Cavani, F., Scagliarini, D., Flego, C., Perego, C., & Saba, M. (2002). Heterogeneous basic catalysts as alternatives to homogeneous catalysts: reactivity of Mg/Al mixed oxides in the alkylation of m-cresol with methanol. *Catalysis Today*, 75(1-4), 103–111. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(02\)00050-0](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(02)00050-0)
- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28(8), 799–808. <http://doi.org/10.1002/bies.20441>
- Brogden, K. a. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 238–50. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Carlos Andres, R. V. (2011). *Síntesis y determinación estructural de péptidos derivados de Dermaseptina con actividad antileishmanial*. Universidad Nacional de Colombia-sede Medellín.
- Chacón Almeyda, A. V. (2014). *Evaluación In Vitro de la actividad antifúngica contra Moniliophthora roreri (Cif. y Par.) Evans Et al. de extratos obtenidos de Justicia secunda Vahl*. Universidad Industrial de Santander.
- Chan, W., & White, P. (2000). *Fmoc solid phase peptide synthesis*. New York: OXFORD University Press. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300043056>
- Chen, Y., Mant, C. T., Farmer, S. W., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2005). Rational Design of  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity / *Therapeutic Index* \*, 280(13), 12316–12329. <http://doi.org/10.1074/jbc>.
- Cho, S. H., Oh, S. H., & Lee, J. H. (2005). Fabrication and characterization of porous

- alginate/polyvinyl alcohol hybrid scaffolds for 3D cell culture. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 16(8), 933–947. <http://doi.org/10.1163/1568562054414658>
- Contreras, L. Y. S., & Riaño, A. L. R. (2013). Aislamiento de microorganismos para control biológico de *moniliophthora roreri*. *Acta Agronomica*, 62, 370–378.
- Das, S. K., Kapoor, S., Yamada, H., & Bhattacharyya, A. J. (2009). Effects of surface acidity and pore size of mesoporous alumina on degree of loading and controlled release of ibuprofen. *Microporous and Mesoporous Materials*, 118(1-3), 267–272. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.08.042>
- Davis, M. E. (2002). Ordered porous materials for Emerging Applications. *Nat*, 417(June), 813–821.
- De Queiroz, Á. a. a., Passos, E. D., De Brito Alves, S., Silva, G. S., Higa, O. Z., & Vítolo, M. (2006). Alginate–poly(vinyl alcohol) core–shell microspheres for lipase immobilization. *Journal of Applied Polymer Science*, 102(2), 1553–1560. <http://doi.org/10.1002/app.23444>
- Degim, I. T., & Celebi, N. (2007). Controlled delivery of peptides and proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 13(1), 99–117. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17266590>
- Dongyuan, Z., Jianglin, F., Qisheng, H., Nicholas, M., Glenn H., F., Bradley F., C., & Galen D., S. (1998). Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science*, 279(5350), 548–552. <http://doi.org/10.1126/science.279.5350.548>
- Espinal G, C. F., Martínez C, H. J., & Peña M, Y. (2005). *La cadena del cacao en Colombia. Una mirada golbal de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de trabajo No. 92.*
- Everett, D. H. (1972). Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units, Appendix II: Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry. (D. H. Everett, Ed.) *Pure and Applied Chemistry*. London. <http://doi.org/10.1351/pac197231040577>
- Fogueri, L. R., & Singh, S. (2009). Smart polymers for controlled delivery of proteins and peptides: a review of patents. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 3(1), 40–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19149728>
- Garcia, M. I., & Le Bouguéneq, C. (1996). Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic *Escherichia coli*. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 94(3), 201–236. [http://doi.org/10.1016/S0020-2452\(97\)86017-4](http://doi.org/10.1016/S0020-2452(97)86017-4)
- Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents : mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 501–517.
- Glukhov, E., Stark, M., Burrows, L. L., & Deber, C. M. (2005). Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33960–33967. <http://doi.org/10.1074/jbc.M507042200>
- Green, R. J., Frazier, R. A., Shakesheff, K. M., Davies, M. C., Roberts, C. J., & Tendler, S. J. . (2000). Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials*, 21(18), 1823–1835. [83](http://doi.org/10.1016/S0142-</a></p></div><div data-bbox=)

9612(00)00077-6

- Guerrero, R. C. (2010). *Desarrollo de materiales porosos para la sorción de CO<sub>2</sub>*. Instituto Politécnico Nacional.
- Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., & Monte, F. (2008). Ice-Templated Materials : Sophisticated Structures Exhibiting Enhanced Functionalities Obtained after Unidirectional Freezing. *Chemical Materials*, 20(3), 634–648.
- Gutiérrez, M. C., García-Carvajal, Z. Y., Jobbágy, M., Rubio, F., Yuste, L., Rojo, F., ... del Monte, F. (2007). Poly(vinyl alcohol) Scaffolds with Tailored Morphologies for Drug Delivery and Controlled Release. *Advanced Functional Materials*, 17(17), 3505–3513. <http://doi.org/10.1002/adfm.200700093>
- Guzmán, F., Marshall, S., Ojeda, C., Albericio, F., & Carvajal-Rondanelli, P. (2013). Inhibitory effect of short cationic homopeptides against Gram-positive bacteria. *Journal of Peptide Science*, 19(October), 792–800. <http://doi.org/10.1002/psc.2578>
- Han, C., Li, H., Pu, H., Yu, H., Deng, L., Huang, S., & Luo, Y. (2013). Synthesis and characterization of mesoporous alumina and their performances for removing arsenic(V). *Chemical Engineering Journal*, 217, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2012.11.087>
- Hancock, R. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters*, 206(2), 143–149. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00480-3](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00480-3)
- Haney, E. F., Nazmi, K., Lau, F., Bolscher, J. G. M., & Vogel, H. J. (2009). Novel lactoferrin antimicrobial peptides derived from human lactoferrin. *Biochimie*, 91(1), 141–54. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.04.013>
- Haney, E. F., Petersen, A. P., Lau, C. K., Jing, W., Storey, D. G., & Vogel, H. J. (2013). Mechanism of action of puromycin derived tryptophan-rich antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(8), 1802–1813. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.03.023>
- Helmerhorst, E. J., Reijnders, I. M., van 't Hof, W., Veerman, E. C., & Nieuw Amerongen, A. V. (1999). A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Letters*, 449(2-3), 105–110. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10338113>
- Hicks, R. W., Castagnola, N. B., Zhang, Z., Pinnavaia, T. J., & Marshall, C. L. (2003). Lathlike mesostructured  $\gamma$ -alumina as a hydrodesulfurization catalyst support, 254, 311–317. [http://doi.org/10.1016/S0926-860X\(03\)00476-9](http://doi.org/10.1016/S0926-860X(03)00476-9)
- International journal of hydrogen energy, 1980. (1980). *International Journal of Hydrogen Energy*. [http://doi.org/10.1016/0360-3199\(80\)90035-X](http://doi.org/10.1016/0360-3199(80)90035-X)
- Jaimes Suárez, Y., & Aranzazu Hernández, F. (2010). *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L) en Colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora roreri)*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA.
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511. <http://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>
- Jiang, Z., Vasil, A. I., Hale, J. D., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2008). Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological

- activity of amphipathic  $\alpha$ -helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 90(3), 369–383. <http://doi.org/10.1002/bip.20911>
- Jofré, C., Guzmán, F., Cárdenas, C., Albericio, F., & Marshall, S. H. (2011). A natural peptide and its variants derived from the processing of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) displaying enhanced antimicrobial activity: A novel alternative for the control of bacterial diseases. *Peptides*, 32, 852–858. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.026>
- Johansson, E. M., Córdoba, J. M., & Odén, M. (2009). Synthesis and characterization of large mesoporous silica SBA-15 sheets with ordered accessible 18 nm pores. *Materials Letters*, 63(24-25), 2129–2131. <http://doi.org/10.1016/j.matlet.2009.07.013>
- Kapoor, S., Hegde, R., & Bhattacharyya, A. J. (2009). Influence of surface chemistry of mesoporous alumina with wide pore distribution on controlled drug release. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 140(1), 34–9. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.07.015>
- Kent, S. B. (1988). Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 57(1), 957–89. <http://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.004521>
- Kosmulski, M. (2009). Compilation of PZC and IEP of sparingly soluble metal oxides and hydroxides from literature. *Advances in Colloid and Interface Science*, 152(1-2), 14–25. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2009.08.003>
- Kresge, C. T., & Roth, W. J. (2013). The discovery of mesoporous molecular sieves from the twenty year perspective. *Chemical Society Reviews*, 42(9), 3663–70. <http://doi.org/10.1039/c3cs60016e>
- Krstic, V. (2005, October 26). Catalizadores de Rh-soportado y su aplicación en la hidrogenación de crotonaldehído. Universidad de Cantabria. Retrieved from <http://www.tdx.cat/handle/10803/10685>
- Lee, D., Shin, S., Kim, D., Seo, M., & Kang, J. (1999). Antifungal mechanism of a cysteine-rich antimicrobial peptide, Ib-AMP1, from *Impatiens balsamina* against *Candida albicans*. *Biotechnology ...*, 1047–1050. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1005636610512>
- Leofanti, G., Padovan, M., Tozzola, G., & Venturelli, B. (1998). Surface area and pore texture of catalysts. *Catalysis Today*, 41(1-3), 207–219. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(98\)00050-9](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(98)00050-9)
- Li, W., & Zhao, D. (2013). An overview of the synthesis of ordered mesoporous materials. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 49(10), 943–6. <http://doi.org/10.1039/c2cc36964h>
- Llop Hernández, A., Valdés-Dapena Vivanco, M. M., & Zuazo Silva, J. L. (2001). *Microbiología y parasitología médicas*. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
- Lloyd-Williams, P. (1997). *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. New directions in organic and biological chemistry CN - QP551 .L56 1997*. Boca Raton: CRC Press.
- Lozada, B. S., Herrera, L. V., Perea, J. A., Stashenko, E., & Escobar, P. (2012). Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*

- L.). *Acta Agronómica*, 61(2), 102–110.
- Lu, J. R., Su, T. J., Thirtle, P. N., Thomas, R. K., Rennie, A. R., & Cubitt, R. (1998). The Denaturation of Lysozyme Layers Adsorbed at the Hydrophobic Solid/Liquid Surface Studied by Neutron Reflection. *Journal of Colloid and Interface Science*, 206(1), 212–223. <http://doi.org/10.1006/jcis.1998.5680>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., & Gacto Fernández, M. (2004). *Brock biología de los microorganismos*. México: Prentice Hall Hispanoamericana.
- Márquez-Alvarez, C., Žilková, N., Pérez-Pariente, J., & Čejka, J. (2008). Synthesis, Characterization and Catalytic Applications of Organized Mesoporous Aluminas. *Catalysis Reviews*, 50(2), 222–286. <http://doi.org/10.1080/01614940701804042>
- Marr, A. K., Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(5), 468–72. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.006>
- Matsuura, S., Ishii, R., Itoh, T., Hanaoka, T., Hamakawa, S., Tsunoda, T., & Mizukami, F. (2010). Direct visualization of hetero-enzyme co-encapsulated in mesoporous silicas. *Microporous and Mesoporous Materials*, 127(1-2), 61–66. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.06.029>
- Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1462(1-2), 1–10. [http://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00197-2](http://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00197-2)
- McGinity, J. W., & Felton, L. A. (2008). *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms*. (J. W. McGinity & L. A. Felton, Eds.) (Third edit). New York.
- Meincken, M., Holroyd, D. L., & Rautenbach, M. (2005). Atomic Force Microscopy Study of the Effect of Antimicrobial Peptides on the Cell Envelope of *Escherichia coli*. *Society*, 49(10), 4085–4092. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4085>
- Miyahara, M., Vinu, A., & Ariga, K. (2007). Adsorption myoglobin over mesoporous silica molecular sieves: Pore size effect and pore-filling model. *Materials Science and Engineering: C*, 27(2), 232–236. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.012>
- Muschert, S., Siepman, F., Leclercq, B., Carlin, B., & Siepman, J. (2009). Drug release mechanisms from ethylcellulose: PVA-PEG graft copolymer-coated pellets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.12.007>
- Navarre, W. W., & Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 63(1), 174–229. [http://doi.org/10.1092-2172/99/\\$04.00+0](http://doi.org/10.1092-2172/99/$04.00+0)Barnett, Timothy C.
- Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 464–472. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>
- Niesz, K., Yang, P., & Somorjai, G. a. (2005). Sol-gel synthesis of ordered mesoporous alumina. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, (15), 1986–1987. <http://doi.org/10.1039/b419249d>
- Oficial, G., & Divulga, I. (2005). El control de la moniliasis en el cacao, 23–26.

- Orth, D., Grif, K., Zimmerhackl, L. B., & Würzner, R. (2008). Prevention and treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections in humans. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 6(1), 101–108. <http://doi.org/10.1586/14787210.6.1.101>
- Pennington, M. W., & Dunn, B. M. (1994). Peptide Synthesis Protocols (In: *Methods Mol. Biol.* 1994, 35). <http://doi.org/10.1385/0896032736>
- Perullini, A. (2009). *Síntesis de materiales inorgánicos con porosidad controlada para la inmovilización de células: aplicaciones en biorreactores*. Retrieved from [http://bldigital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_4413\\_Perullini.pdf](http://bldigital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4413_Perullini.pdf)
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78–82. [http://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70024-X](http://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70024-X)
- Postgate, J. R., Crumpton, J. E., & Hunter, J. R. (1961). The measurement of bacterial viabilities by slide culture. *Journal of General Microbiology*, 24(1954), 15–24. <http://doi.org/10.1099/00221287-24-1-15>
- Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J. A., & Piedrola-Angulo, G. (1987). *Microbiología y parasitología médica*. Barcelona: Salvat.
- Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(6), 536–47. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>
- Reyes, R. E., Ramírez Saad, H., Solís Galicia, C., Ortiz Herrera, M., & Coria Jiménez, R. (2009). Mecanismos involucrados en la variabilidad del antígeno O de bacterias Gram negativas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 52, 32–43.
- Rink, H. (1987). Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Letters*, 28(33), 3787–3790. [http://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)96384-6](http://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)96384-6)
- Robens, E., Dabrowski, A., & Kutarov, V. V. (2004). Comments on surface structure analysis by water and nitrogen adsorption. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 76(2), 647–657. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000221460800030
- Robinson, J. R. (1978). *Sustained and controlled release drug delivery systems* (Vol. 6). M. Dekker.
- Rodríguez, E. (2006). Técnica de reducción de inóculo para controlar la Moniliasis del cacao en Santander. *Revista Corpoica*, 4(4), 68–78. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Técnica+de+reducción+de+inoculo+para+controlar+la+Moniliasis+del+cacao+en+Santander#0>
- Saldarriaga, Y., & Pineda, F. (2001). *Aislamiento de hongos fitopatógenos. Manual de micología aplicada*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Schlossbauer, A., Schaffert, D., Kecht, J., Wagner, E., & Bein, T. (2008). Click Chemistry for High-Density Biofunctionalization of Mesoporous Silica. *Journal of the American Chemical Society*, 130(38), 12558–12559. <http://doi.org/10.1021/ja803018w>
- Slowing, I. I., Trewyn, B. G., & Lin, V. S.-Y. (2007). Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Delivery of Membrane-Impermeable Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 129(28), 8845–8849. <http://doi.org/10.1021/ja0719780>
- Soler-Illia, G. J. D. a a, Sanchez, C., Lebeau, B., & Patarin, J. (2002). Chemical strategies

- to design textured materials: From microporous and mesoporous oxides to nanonetworks and hierarchical structures. *Chemical Reviews*, 102(11), 4093–4138. <http://doi.org/10.1021/cr0200062>
- Suhrenbrock, L., Radtke, G., Knop, K., & Kleinebudde, P. (2011). Suspension pellet layering using PVA-PEG graft copolymer as a new binder. *International Journal of Pharmaceutics*. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.061>
- Taylor, R. H., Acland, D. P., Attenborough, S., Cammue, B. P., Evans, I. J., Osborn, R. W., ... Broekaert, W. F. (1997). A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(39), 24480–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9305910>
- Tang, E. S. K., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2005). Coating of multiparticulates for sustained release. *American Journal of Drug Delivery*.
- Tantirungrotechai, J., Chotmongkolsap, P., & Pohmakotr, M. (2010). Synthesis, characterization, and activity in transesterification of mesoporous Mg–Al mixed-metal oxides. *Microporous and Mesoporous Materials*, 128(1-3), 41–47. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.08.001>
- Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, 51(2), 149–77. <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>
- Thevissen, K., François, I. E. J. a, Sijtsma, L., van Amerongen, A., Schaaper, W. M. M., Meloen, R., ... Cammue, B. P. a. (2005). Antifungal activity of synthetic peptides derived from *Impatiens balsamina* antimicrobial peptides Ib-AMP1 and Ib-AMP4. *Peptides*, 26(7), 1113–9. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.01.008>
- Thevissen, K., Ghazi, A., Samblanx, W. De, Brownlee, C., Rupert, W., & Broekaert, W. F. (1996). Fungal Membrane Responses Induced by Plant Defensins and Thionins. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 15018–15025. <http://doi.org/10.1074/jbc.271.25.15018>
- Vaara, M., & Nurminen, M. (1999). Outer Membrane Permeability Barrier in *Escherichia coli* Mutants That Are Defective in the Late Acyltransferases of Lipid A Biosynthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), 1459–1462. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89296/>
- Vallet-Regi, M., Rámila, A., del Real, R. P., & Pérez-Pariente, J. (2001). A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. *Chemistry of Materials*, 13(2), 308–311. <http://doi.org/10.1021/cm0011559>
- van der Kraan, M. I. a, van der Made, C., Nazmi, K., van't Hof, W., Groenink, J., Veerman, E. C. I., ... Nieuw Amerongen, A. V. (2005). Effect of amino acid substitutions on the candidicidal activity of LFampin 265-284. *Peptides*, 26(11), 2093–7. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.03.056>
- van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., & Anderson, M. a. (2013). Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 70(19), 3545–70. <http://doi.org/10.1007/s00018-013-1260-1>
- Vásquez, L. E., Guzmán, F., Patarroyo, M. E., & Arango, R. (2009). IN VITRO

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES AGAINST *Mycosphaerella fijiensis* MORELET AND THEIR INTERACTION WITH SOME CHEMICAL FUNGICIDES.  
*Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín.*

- Velandía, A., Santiago, J., Esteban, C., & Teresa, M. (2008). *Moniliophthora roreri* EN CACAO *Theobroma cacao* L., 1–3.
- Wan, Y., & Zhao, D. (2007). On the controllable soft-templating approach to mesoporous silicates. *Chemical Reviews*, 107(7), 2821–60. <http://doi.org/10.1021/cr068020s>
- Wang, P., Bang, J.-K., Kim, H. J., Kim, J.-K., Kim, Y., & Shin, S. Y. (2009). Antimicrobial specificity and mechanism of action of disulfide-removed linear analogs of the plant-derived Cys-rich antimicrobial peptide Ib-AMP1. *Peptides*, 30(12), 2144–9. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.09.020>
- Wang, S. (2009). Ordered mesoporous materials for drug delivery. *Microporous and Mesoporous Materials*, 117(1-2), 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.07.002>
- Wang, Y., Noguchi, M., Takahashi, Y., & Ohtsuka, Y. (2001). Synthesis of SBA-15 with different pore sizes and the utilization as supports of high loading of cobalt catalysts. *Catalysis Today*, 68(1-3), 3–9. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(01\)00317-0](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(01)00317-0)
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Xu, L., Song, H., & Chou, L. (2012). One-Pot Synthesis of Ordered Mesoporous NiO – CaO – Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Composite Oxides for Catalyzing CO<sub>2</sub> Reforming of CH<sub>4</sub>.
- Yau, W. M., Wimley, W. C., Gawrisch, K., & White, S. H. (1998). The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry*, 37(42), 14713–14718.
- Yiu, H. H. P., & Wright, P. a. (2005). Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic–organic hybrid. *Journal of Materials Chemistry*, 15(35-36), 3690. <http://doi.org/10.1039/b506090g>
- Yuan, Q., Yin, A.-X., Luo, C., Sun, L.-D., Zhang, Y.-W., Duan, W.-T., ... Yan, C.-H. (2008). Facile synthesis for ordered mesoporous gamma-aluminas with high thermal stability. *Journal of the American Chemical Society*, 130(11), 3465–3472. <http://doi.org/10.1021/ja0764308>
- Zhang, H., & Cooper, A. I. (2007). Aligned porous structures by directional freezing. *Advanced Materials*, 19(11), 1529–1533. <http://doi.org/10.1002/adma.200700154>
- 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. <http://doi.org/10.1074/jbc.M104925200>
- Zhang, Y., Chan, H. F., & Leong, K. W. (2013). Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 104–20. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.003>
- Zinieris, N., Leondiadis, L., & Ferderigos, N. (2005). Nalpha-Fmoc removal from resin-bound amino acids by 5% piperidine solution. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 7(1), 4–6. <http://doi.org/10.1021/cc049872d>

## **CAPITULO 3**

# **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIAL CONTRA *Escherichia coli* K-12 Y *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) DE LOS PÉPTIDO Ib-M6 E Ib-A4 ENCAPSULADOS EN PELLETS DE ALCOHOL POLIVINÍLICO (PVA).**

*“Porque el Señor da la sabiduría, de su boca proceden la ciencia y la inteligencia”*

*Proverbios 2:6*

Con el auge de la biotecnología en los últimos años ha ido en aumento el interés por la utilización de péptidos terapéuticos (Fogueri & Singh, 2009). Sin embargo, aunque estas biomoléculas presentan una actividad significativa *in vitro*, en algunos casos esta actividad exhibe una disminución significativa *in vivo* debido a diversos factores como la degradación por proteasas y la dependencia de la concentración de sales en el suero (Marr et al., 2006), lo cual dificulta su formulación. Por esta razón, se han diseñado diversos sistemas de liberación controlada (SLC) que disminuyan la degradación de los péptidos y permitan mantener su concentración en el rango terapéutico a través del control de la velocidad de liberación (Y. Zhang et al., 2013).

Los SLC tienen la capacidad de liberar un agente bioactivo en una localización específica a una velocidad controlada. Además pueden mantener la concentración del compuesto en el blanco específico de acción a un rango óptimo y por debajo de los límites de toxicidad, mejorando la eficacia terapéutica (S. Wang, 2009). Muchos de estos sistemas han sido desarrollados en materiales poliméricos, debido a su versatilidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad.

Dentro de los sistemas poliméricos utilizados para encapsulación de biomoléculas se encuentran las microesferas poliméricas, las cuales pueden ser obtenidas de diferentes materiales como el alginato, la quitina, los hidrogeles, entre muchos otros (Degim & Celebi, 2007). De Queiroz y colaboradores en el 2005 (De Queiroz et al., 2006), inmovilizaron la enzima lipasa de *Candida cylindracea* en microesferas de PVA-Alginato de sodio (AlgNa) preparadas por el método de insolubilización interfacial. La actividad enzimática de la lipasa se determinó en la degradación de aceite de oliva y se encontró que la enzima inmovilizada hidrolizó más rápidamente el sustrato que la enzima libre; lo que convierte a las microesferas de PVA-AlgNa en una alternativa interesante para la catálisis heterogénea.

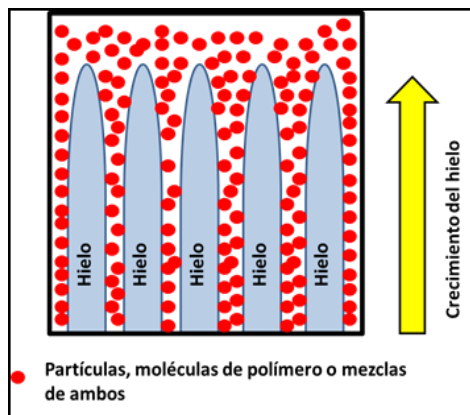
Otro sistema de encapsulación utilizado ampliamente en la industria farmacéutica para la liberación controlada de drogas orales, son los gránulos esféricos o pellets poliméricos (Tang, Chan, & Heng, 2005). Estos sistemas disminuyen el tiempo de exposición de los medicamentos en el tracto gastrointestinal (Muschert, Siepmann, Leclercq, Carlin, & Siepmann, 2009) y pueden ser fabricados a partir de diferentes tipos de polímeros como los derivados de celulosa, polivilacetato y polivinilpirrolidona entre otros (McGinity & Felton, 2008). Se ha demostrado que la adición de pequeñas cantidades de copolímeros de polivinilalcohol-polietilenglicol (PVA-PEG) mejora la cinética de liberación de los pellets de

etilcelulosa. En estos casos el PVA-PEG funciona como una trampa de agua la cual recubre la película de polímero y controla los mecanismos de difusión independientemente del tipo de fármaco atrapado en el interior (Suhrenbrock, Radtke, Knop, & Kleinebudde, 2011).

Los monolitos porosos poliméricos han despertado gran interés como SLC y para ser utilizados en ingeniería de tejidos ya que poseen propiedades mecánicas y adhesivas que permiten sembrar células y tejidos en crecimiento (Cho, Oh, & Lee, 2005). Polímeros sintéticos y biodegradables como el polivinilalcohol (PVA) han sido utilizados para la fabricación de este tipo de materiales. El PVA es un polímero soluble en agua con la propiedad de estabilizar la estructura de proteínas y conservar su actividad biológica; por lo que ha sido ampliamente utilizado para la inmovilización de enzimas y células (Alves, Jensen, Smith, & Zelikin, 2011; De Queiroz et al., 2006).

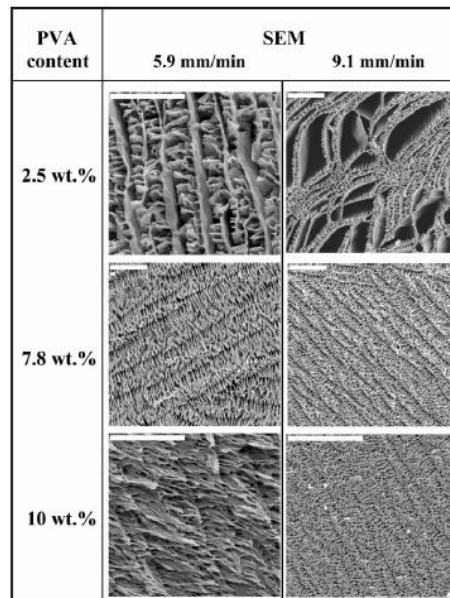
Como en todos los materiales empleados como SLC la morfología de los monolitos poliméricos es una característica importante para el control de la cinética de liberación de los compuestos atrapados en el interior y se encuentra determinada, entre otras cosas, por el método de preparación empleado (María C Gutiérrez, Ferrer, & Monte, 2008). Uno de estos métodos es el ISISA durante el cual se debe realizar un enfriamiento unidireccional de la solución precursora de polímero lo que permite la cristalización del solvente, típicamente agua. Los cristales formados son eliminados posteriormente por sublimación dando lugar a la formación de canales alineados en la dirección del enfriamiento tal como se muestra en la Figura 23.

**Figura 23.** Representación esquemática de los procesos de enfriamiento unidireccional. Los cristales de hielo crecen en la dirección del enfriamiento y el soluto es excluido y solidifica entre los cristales. (esquema tomado de Zhang y colaboradores (H. Zhang & Cooper, 2007))



En el 2007, Gutiérrez y colaboradores demostraron que al preparar monolitos de PVA utilizando el método ISISA debían controlarse variables como la velocidad de congelación de la solución polimérica en nitrógeno líquido, el contenido de PVA y el peso molecular del polímero. Ellos encontraron que cuando la concentración de PVA en la solución es del 2.5%, en el interior del monolito se presenta la formación de láminas no interconectadas, mientras que la formación de canales estrechos y amorfos se ve favorecida por concentraciones superiores al 10% de PVA tal como se muestra en la Figura 24 (M. C. Gutiérrez et al., 2007). Adicionalmente, lograron encapsular en el interior de los monolitos microcristales de ciprofloxacina (CFX) logrando un control en la liberación del medicamento por un periodo de hasta 30 horas.

**Figura 24.** Imágenes de SEM de una sección (perpendicular a la dirección del enfriamiento) de monolitos de PVA. Las barras de escala están a 20  $\mu\text{m}$ . (imagen tomada de Gutiérrez y colaboradores(M. C. Gutiérrez et al., 2007))



En este capítulo se describen la preparación de pellets de PVA utilizando diferentes relaciones de masa de polímero y mezclas de polímeros con diferente peso molecular, con el objetivo de encontrar la matriz que permitiera un control de liberación de los péptidos Ib-M6 e Ib-A4. Además se muestra el efecto de la encapsulación de los péptidos en los

pellets preparados sobre la actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* K-12 y *Moniliophthora roreri* de estos péptidos.

### **3.1. METODOLOGÍA**

#### **3.1.1. Preparación de los pellets de PVA-cristal violeta**

Se utilizaron dos tipos de PVA: PVA-15 y PVA-98 con pesos moleculares de 15000 y 98000 Da, respectivamente. El grado de hidrólisis de cada polímero fue de 0.98 y >0.99, respectivamente. Se prepararon por separado soluciones de PVA-15 y PVA-98 al 10% p/p; para esto, fue necesario utilizar agua caliente (aproximadamente a 80°C) y agitar vigorosamente por tres horas para asegurar disolución total y homogenizar la solución. Posteriormente se realizaron mezclas de estas dos soluciones con el fin de obtener diferentes concentraciones de PVA total (desde 2.5% hasta 7.5% p/v) y diferentes relaciones de masa de PVA-15 y PVA-98. La lista de las mezclas preparadas se presenta en la Tabla 3.1. Cada una de las soluciones se goteó a una distancia constante de 5 cm, sobre nitrógeno líquido. Los pellets formados fueron liofilizados y pesados posteriormente descartándose aquellos que tuvieran un peso por encima o por debajo del promedio de los pellets obtenidos.

#### **3.1.2. Caracterización morfológica de los pellets de PVA.**

La morfología de los pellets de PVA fue analizada por microscopía electrónica de barrido (SEM) con un instrumento Supra 40 (ZEISS) operado a 3.0 kV. Las micrografías fueron obtenidas en el modo de electrones secundarios.

#### **3.1.3. Determinación de la cinética de liberación del cristal violeta desde los pellets de PVA.**

Se prepararon pellets de PVA que contenían 179 mg/mL de cristal violeta. La liberación de cristal violeta desde los pellets de PVA se llevó a cabo en agua desionizada tipo I. Un pellet de PVA fue adicionado en agua y se cuantificó la liberación de cristal violeta durante dos horas mediante espectroscopia UV-Vis. Se midió la intensidad de absorbancia a 590 nm. Cada experimento se realizó por duplicado.

### 3.1.4. Preparación de los pellets 50P25-M6 y 50P25-A4.

Se prepararon soluciones Stock de los péptidos Ib-M6 e Ib-A4 en buffer Tris-HCl (10 mM, pH 7.4), se mezclaron separadamente cada una de estas soluciones con una solución de de PVA 50P25. Al finalizar la disolución de los pellets en los medios de cultivos se estimó que la concentración total de péptido obtenida en solución fue de 5  $\mu$ M. Las soluciones fueron goteadas sobre nitrógeno líquido como se mencionó en la sección 4.1.1.

**Tabla 7.** Descripción de las relaciones totales y relaciones de masas de PVA en los pellets preparados. La concentración de cristal violeta utilizada en cada una de las soluciones fue de 179 mg/L.

ID pellets PVA	Concentración total de PVA (% m/v)	Relación masas PVA-15 (% m/m)
25P0		0
25P25		25
25P50	2.5	50
25P75		75
25P100		100
50P0		0
50P25		25
50P50	5.0	50
50P75		75
50P100		100
75P0		0
75P25		25
75P50	7.5	50
75P75		75
75P100		100

### **3.1.5. Determinación de la actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* K-12 de los pellets 50P25-M6.**

La bacteria *Escherichia coli* K-12 fue cultivada aeróbicamente en caldo Mueller-Hinton (MHB) a 37 °C durante 18 horas hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Se adicionó el inóculo de *Escherichia coli* K-12 en placas de 96 pocillos hasta una concentración final de  $1.8 \times 10^6$  UFC/mL. Posteriormente, se adicionaron separadamente cada uno de los pellets de PVA en el inóculo y se determinó la cinética de crecimiento de *E. coli* durante 6 horas por el método de conteo de colonias en placa. Se utilizaron como control negativo la bacteria en ausencia de péptido y como control positivo el péptido Ib-M6 en buffer tris (10mM, pH 7.4) a una concentración de 5  $\mu$ M.

### **3.1.6. Determinación de la actividad antifúngica contra *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) de los pellets 50P25-A4.**

El hongo *Moniliophthora roreri* fue cultivado en PDA durante 10 días a 30°C. A partir de este cultivo se preparó una solución de esporas en una solución salina isotónica (0.9%p/v) y se diluyó hasta una concentración de  $1.0 \times 10^6$  esporas/mL en caldo papa dextrosa en una placa de 96 pocillos. Se adicionó un pellet de 50P25-A4 y se permitió el crecimiento del hongo durante 10 días a una temperatura de 30°C. Se consideró prueba positiva para la inhibición la no presencia de micelio en los pocillos. Como control negativo se utilizó el hongo en ausencia de pellets de PVA y como control positivo el péptido Ib-A4 en buffer tris (10mM, pH 7.4) Cada experimento se realizó por duplicado.

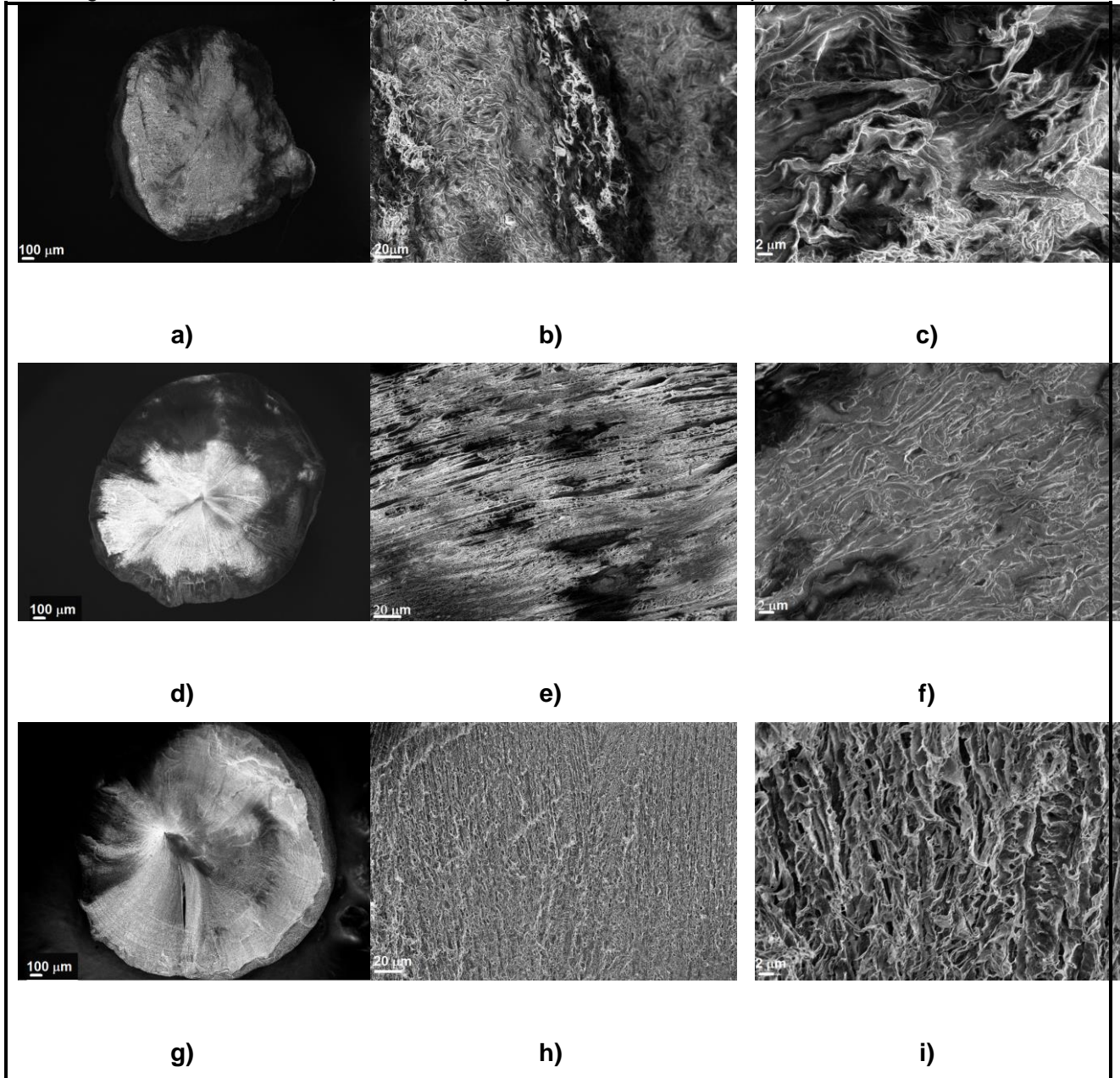
## **3.2. RESULTADOS Y ANÁLISIS**

### **3.2.1. Caracterización morfológica de los pellets.**

Los pellets obtenidos presentaron canales internos alineados radialmente indicando la dirección de enfriamiento de las soluciones. Se observó que la forma global del pellet y el tamaño de los canales obtenidos depende de la concentración del polímero en la solución; los pellets con una concentración de 7.5% m/m de PVA presentan una estructura global compacta, canales definidos y alineados radialmente (Figura 25 g, h, i). Es posible que esto ocurra, debido a que el crecimiento de los cristales de hielo se encuentra limitado por la cantidad de soluto en la solución. Lo contrario ocurre con las pellets con una concentración

2.5% m/m de PVA donde se observa que la estructura global del material y los canales internos son amorfos (Figura 25 a, b y c).

**Figura 25.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de los pellets 25P25 a) con un aumento de 80X, b) 1000X, c) 5000X. Pellets de 50P25 d) con un aumento de 80X, e) 1000X, f) 5000X. Pellets de 75P25 g) con un aumento de 80X, h) 1000X e i) 5000X. Los aumentos de la primera columna corresponden a 100  $\mu\text{m}$ , los de la segunda columna corresponde a 20  $\mu\text{m}$  y los de la tercera a 2  $\mu\text{m}$ .



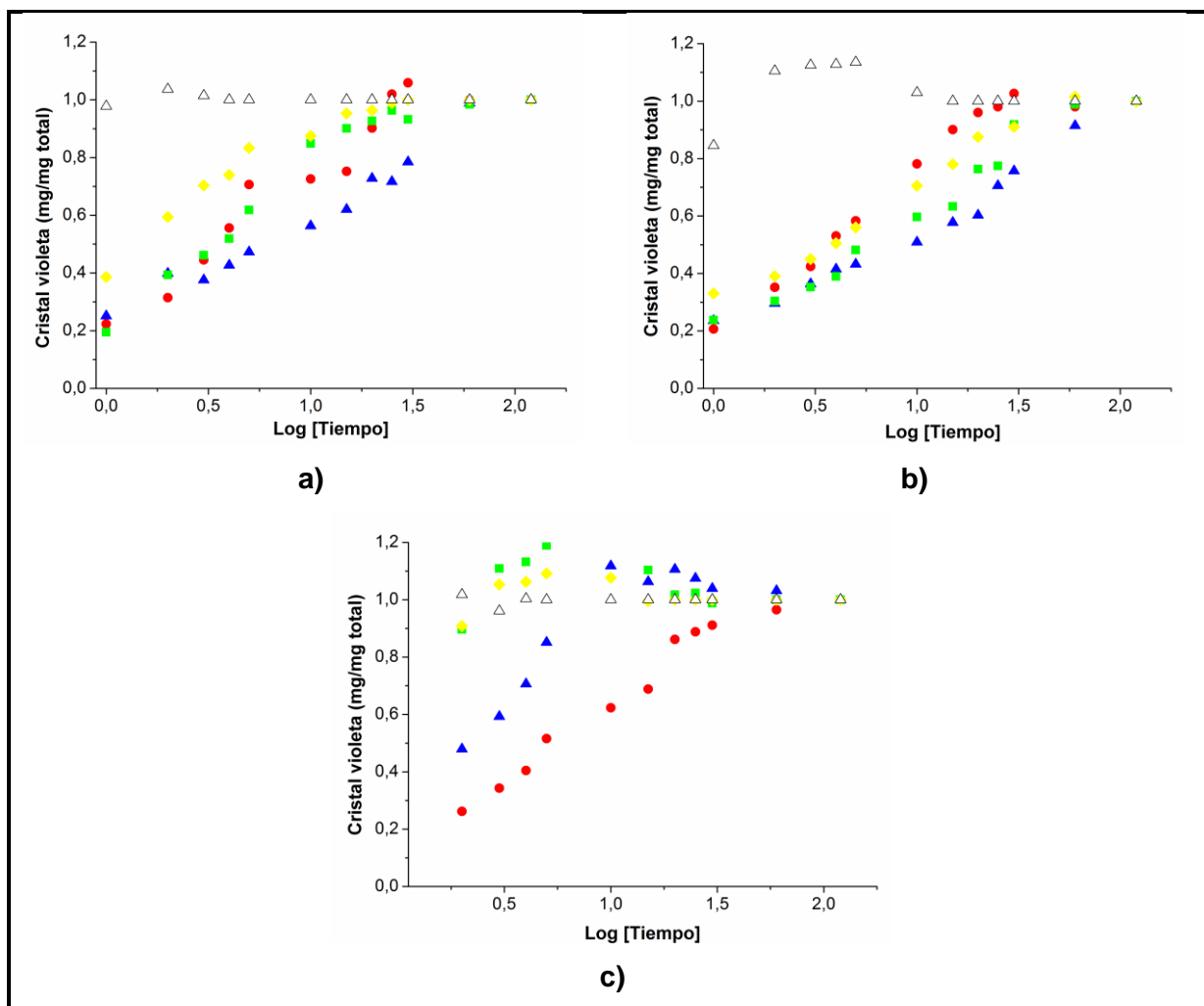
### 3.2.2. Cinética de liberación de cristal violeta desde los pellets de PVA

La determinación de la cantidad de cristal violeta liberado en agua se determinó por espectroscopia UV-Vis. En la Figura 26 se muestran los resultados obtenidos para la liberación del cristal violeta en agua. Los resultados evidencian que los pellets 25P100, 50P100 y 75P100 liberan completamente el colorante durante el primer minuto de contacto con el agua. Esto se debe a que estos pellets se encuentran preparados con una relación del 100% m/m de PVA-15, el cual presenta una mayor solubilidad en agua lo que hace que estos materiales se disuelvan rápidamente en el medio.

Por otro lado, se puede observar que los pellets de 75P0 que contienen la mayor concentración de PVA total (7.5% m/v y 100% m/m de PVA-98), han liberado aproximadamente el 90% del colorante transcurridos 30 minutos del experimento. Estos pellets al estar constituidos por el polímero con mayor peso molecular los canales formados, aunque son más definidos, también son más amplios lo que facilita una mayor difusión del agua presentando más solubilidad que aquellos pellets que poseen una mezcla de los dos polímeros. Debido a todo lo anterior, los pellets de 25P100, 50P100, 75P100 y 75P0 fueron descartados para la encapsulación de los péptidos Ib-M6 e Ib-A4.

Los pellets escogidos para las pruebas de liberación de los péptidos Ib-M6 e Ib-A4 fueron los 50P25. Aunque estos no muestran una gran diferencia en la cinética de liberación en comparación con los 25P25, ya que ambos sistemas logran la retención del colorante por un tiempo de 60 minutos, si es posible apreciar una diferencia significativa en la forma de los canales internos de los sistemas. Los pellets de 50P25 son los que presentan los canales más definidos y poseen una estructura global más compacta lo que permite tener homogeneidad en la forma de los pellets preparados.

**Figura 26.** Cinética de liberación del cristal violeta en agua desde los pellets con una concentración total de PVA del **a)** 2,5%, **b)** 5,0% y **c)** 7,5%. Para las tres gráficas aplica que la relación de polímero de 0% de PVA-15 se encuentra representada por los círculos rojos, 25% PVA-15 por los triángulos azules, 50% PVA-15 por los cuadros verdes, 75% PVA-15 por los diamantes amarillos y 100% PVA-15 por los triángulos sin relleno.



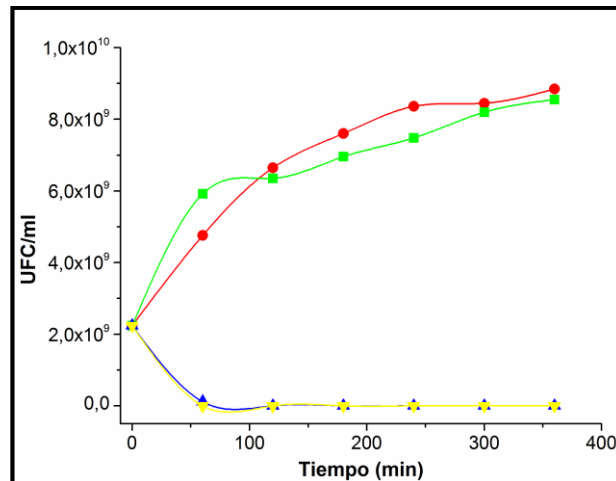
### 3.2.3. Actividad antimicrobial de los pellets de 50P25-M6 y 50P25-A4

Los pellets de 50P25-M6 y 50P25-A4 se prepararon a partir de soluciones stock de 50 $\mu$ M de los péptidos y de soluciones del 10% en masa de PVA-98 y PVA-15. Teniendo en cuenta que los compuestos atrapados en el interior de los pellets de PVA son liberados por un mecanismo basado en la hidratación e hinchazón del polímero seguido de la disolución del compuesto atrapado en el interior (Robinson, 1978), se presumió que los porcentajes de liberación obtenidos para los péptidos serían similares a los obtenidos para el cristal violeta.

Con base en esto, se realizaron los cálculos necesarios para que la concentración final de los péptidos en el medio de cultivo fuera de 5  $\mu$ M.

La actividad antibacteriana del péptido Ib-M6 se realizó por conteo de colonias en caja Petri cada hora por un periodo de 6 horas. La actividad antifúngica del péptido Ib-A4 se realizó en placas de 96 pocillos permitiendo el crecimiento del hongo en un medio líquido de caldo papa dextrosa. En las Figuras 27 y 28 se presentan los resultados de la actividad antibacteriana y antifúngica de los pellets 50P25-M6 y 50P25-A4, respectivamente. Se observa que no se presentó crecimiento de los microorganismos estudiados en presencia de los pellets, indicando que estos presentan una actividad antimicrobial similar a la presentada por los péptidos Ib-M6 e Ib-A4 libres. Esto indica que la liberación de los péptidos desde estos pellets ocurre y que no se existe ningún efecto sobre la actividad cuando son atrapados en el PVA.

**Figura 27.** Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* K-12 (círculos rojos) en presencia de pellets de 50P25 (cuadrados verde), péptido en buffer tris (10mM, pH 7.4) (triángulos azules), pellets 50P25-M6 (triángulos inversos amarillos).



**Figura 28.** Crecimiento de *Moniliophthora roreri* en caldo papa-dextrosa en **a)** ausencia de pellets de PVA y **b)** presencia de pellets 50P25-A4



Por otro lado, se encontró que no existe un efecto de enmascaramiento en la actividad de los péptidos por la presencia del polímero, ya que no se observó ningún efecto sobre el crecimiento de los microorganismos estudiados. Esto se puede observar en la Figura 27 donde se muestra que la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* K-12 en presencia de los pellets de 50P25 es similar al control negativo. Esto se debe a que el PVA es biocompatible por lo tanto no ejerce ningún efecto tóxico sobre la bacteria, además el volumen de polímero en los pellets se encuentra en el orden de los microlitros por lo que no existe una saturación del medio que impida el crecimiento microbiano.

### 3.3. CONCLUSIONES

El método ISISA utilizado permitió controlar la estructura de los pellets preparados a partir de la variación de la concentración total de PVA en la solución precursora. A una concentración de 2.5% m/v de PVA se obtienen pellets amorfos con canales poco definidos mientras que a una concentración de polímero del 7.5% m/v se obtienen estructuras definidas con microcanales alineados radialmente.

La variación de la cantidad total de PVA y de la relación de masa de PVA de diferente peso molecular permitió controlar la velocidad de hidratación de los pellets, obteniéndose un control en la liberación del colorante cristal violeta por un periodo de 60 minutos con los pellets de 25P25 y 50P25.

La encapsulación de los péptidos Ib-M6 e Ib-A4 en los pellets 50P25 no afectó la actividad antimicrobial contra *Escherichia coli* K-12 y *Moniliophthora roreri*. Además, no se observaron efectos de enmascaramiento del polímero sobre la actividad antimicrobial de los péptidos, lo cual implica que a partir de estos sistemas pueden desarrollarse potenciales aplicaciones farmacológicas.

### 3.4. REFERENCIAS.

- Aapptec. (n.d.). *Practical synthesis guide to solid phase peptide chemistry*.
- Addorisio, V., Esposito, S., & Sannino, F. (2010). Sorption capacity of mesoporous metal oxides for the removal of MCPA from polluted waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5011–5016.
- Alves, M. H., Jensen, B. E. B., Smith, A. a a, & Zelikin, A. N. (2011). Poly(vinyl alcohol) physical hydrogels: New vista on a long serving biomaterial. *Macromolecular Bioscience*, 11(10), 1293–1313. <http://doi.org/10.1002/mabi.201100145>
- Amatani, T., Nakanishi, K., Hirao, K., & Kodaira, T. (2005). Monolithic Periodic Mesoporous Silica with Well-Defined Macropores Monolithic Periodic Mesoporous Silica with Well-Defined Macropores. *Chemistry of Materials*, 17(March), 2114–2119. <http://doi.org/10.1021/cm048091c>
- Antonio, P. P. (2013). *Silicatos y alúminosilicatos mesoporosos funcionalizados como catalizadores en reacciones de interés en química fina*. Universidad de Córdoba.
- Arbelaez, L. (2010). *Análisis de la diversidad intraespecie de Moniliophthora roreri por medio de marcadores morfológicos y genéticos*. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/1938/1/43276997.20101.pdf>
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., ... Stockinger, H. (2012). ExpASY: SIB bioinformatics resource portal. Retrieved from <http://www.expasy.org/>
- Ayala Benítez, M. F. (2008). *Manejo integrado de moniliasis (Moniliophthora roreri) en el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.) mediante el uso de fungicidas, combinado con labores culturales*. Escuela superior politecnica del litoral.
- Benoiton, N. L. (2006). *Chemistry of peptide synthesis*. Boca Raton.
- Beveridge, T. J. (1999). Structure of fram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, 181(16), 4725–4733.
- Bisht, G. S., Rawat, D. S., Kumar, A., Kumar, R., & Pasha, S. (2007). Antimicrobial activity of rationally designed amino terminal modified peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(15), 4343–6. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.05.015>
- Blanco-Labra, A., & Aguirre Mancilla, C. (2002). Proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de plantas. *Acta Universitaria*, 12(3), 31–43.
- Bolognini, M., Cavani, F., Scagliarini, D., Flego, C., Perego, C., & Saba, M. (2002). Heterogeneous basic catalysts as alternatives to homogeneous catalysts: reactivity of

- Mg/Al mixed oxides in the alkylation of m-cresol with methanol. *Catalysis Today*, 75(1-4), 103–111. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(02\)00050-0](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(02)00050-0)
- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28(8), 799–808. <http://doi.org/10.1002/bies.20441>
- Brogden, K. a. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 238–50. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Carlos Andres, R. V. (2011). *Síntesis y determinación estructural de péptidos derivados de Dermaseptina con actividad antileishmanial*. Universidad Nacional de Colombia-sede Medellin.
- Chacón Almeyda, A. V. (2014). *Evaluación In Vitro de la actividad antifúngica contra Moniliophthora roreri(Cif. y Par.) Evans Et al. de extratos obtenidos de Justicia secunda Vahl*. Universidad Industrial de Santander.
- Chan, W., & White, P. (2000). *Fmoc solid phase peptide synthesis*. New York: OXFORD University Press. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300043056>
- Chen, Y., Mant, C. T., Farmer, S. W., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2005). Rational Design of  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity / Therapeutic Index \*, 280(13), 12316–12329. <http://doi.org/10.1074/jbc>
- Cho, S. H., Oh, S. H., & Lee, J. H. (2005). Fabrication and characterization of porous alginate/polyvinyl alcohol hybrid scaffolds for 3D cell culture. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 16(8), 933–947. <http://doi.org/10.1163/1568562054414658>
- Contreras, L. Y. S., & Riaño, A. L. R. (2013). Aislamiento de microorganismos para control biológico de moniliophthora roreri. *Acta Agronomica*, 62, 370–378.
- Das, S. K., Kapoor, S., Yamada, H., & Bhattacharyya, A. J. (2009). Effects of surface acidity and pore size of mesoporous alumina on degree of loading and controlled release of ibuprofen. *Microporous and Mesoporous Materials*, 118(1-3), 267–272. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.08.042>
- Davis, M. E. (2002). Ordered porous materials for Emerging Applications. *Nat*, 417(June), 813–821.
- De Queiroz, Á. a. a., Passos, E. D., De Brito Alves, S., Silva, G. S., Higa, O. Z., & Vítolo, M. (2006). Alginate–poly(vinyl alcohol) core–shell microspheres for lipase immobilization. *Journal of Applied Polymer Science*, 102(2), 1553–1560. <http://doi.org/10.1002/app.23444>
- Degim, I. T., & Celebi, N. (2007). Controlled delivery of peptides and proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 13(1), 99–117. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17266590>
- Dongyuan, Z., Jianglin, F., Qisheng, H., Nicholas, M., Glenn H., F., Bradley F., C., & Galen D., S. (1998). Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science*, 279(5350), 548–552. <http://doi.org/10.1126/science.279.5350.548>
- Espinal G, C. F., Martínez C, H. J., & Peña M, Y. (2005). *La cadena del cacao en Colombia. Una mirada golbal de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de*

trabajo No. 92.

- Everett, D. H. (1972). Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units, Appendix II: Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry. (D. H. Everett, Ed.) *Pure and Applied Chemistry*. London.  
<http://doi.org/10.1351/pac197231040577>
- Fogueri, L. R., & Singh, S. (2009). Smart polymers for controlled delivery of proteins and peptides: a review of patents. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 3(1), 40–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19149728>
- Garcia, M. I., & Le Bouguéneq, C. (1996). Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic *Escherichia coli*. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 94(3), 201–236. [http://doi.org/10.1016/S0020-2452\(97\)86017-4](http://doi.org/10.1016/S0020-2452(97)86017-4)
- Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents : mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 501–517.
- Glukhov, E., Stark, M., Burrows, L. L., & Deber, C. M. (2005). Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33960–33967.  
<http://doi.org/10.1074/jbc.M507042200>
- Green, R. J., Frazier, R. A., Shakesheff, K. M., Davies, M. C., Roberts, C. J., & Tendler, S. J. . (2000). Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials*, 21(18), 1823–1835. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00077-6](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00077-6)
- Guerrero, R. C. (2010). *Desarrollo de materiales porosos para la sorción de CO2*. Instituto Politécnico Nacional.
- Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., & Monte, F. (2008). Ice-Templated Materials : Sophisticated Structures Exhibiting Enhanced Functionalities Obtained after Unidirectional Freezing. *Chemical Materials*, 20(3), 634–648.
- Gutiérrez, M. C., García-Carvajal, Z. Y., Jobbágy, M., Rubio, F., Yuste, L., Rojo, F., ... del Monte, F. (2007). Poly(vinyl alcohol) Scaffolds with Tailored Morphologies for Drug Delivery and Controlled Release. *Advanced Functional Materials*, 17(17), 3505–3513. <http://doi.org/10.1002/adfm.200700093>
- Guzmán, F., Marshall, S., Ojeda, C., Albericio, F., & Carvajal-Rondanelli, P. (2013). Inhibitory effect of short cationic homopeptides against Gram-positive bacteria. *Journal of Peptide Science*, 19(October), 792–800. <http://doi.org/10.1002/psc.2578>
- Han, C., Li, H., Pu, H., Yu, H., Deng, L., Huang, S., & Luo, Y. (2013). Synthesis and characterization of mesoporous alumina and their performances for removing arsenic(V). *Chemical Engineering Journal*, 217, 1–9.  
<http://doi.org/10.1016/j.cej.2012.11.087>
- Hancock, R. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters*, 206(2), 143–149. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00480-3](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00480-3)
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.04.013>

- Haney, E. F., Petersen, A. P., Lau, C. K., Jing, W., Storey, D. G., & Vogel, H. J. (2013). Mechanism of action of puroidoline derived tryptophan-rich antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(8), 1802–1813. <http://doi.org/10.1016/j.bbmem.2013.03.023>
- Helmerhorst, E. J., Reijnders, I. M., van 't Hof, W., Veerman, E. C., & Nieuw Amerongen, a V. (1999). A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Letters*, 449(2-3), 105–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10338113>
- Hicks, R. W., Castagnola, N. B., Zhang, Z., Pinnavaia, T. J., & Marshall, C. L. (2003). Lathlike mesostructured  $\gamma$ -alumina as a hydrodesulfurization catalyst support, 254, 311–317. [http://doi.org/10.1016/S0926-860X\(03\)00476-9](http://doi.org/10.1016/S0926-860X(03)00476-9)
- International journal of hydrogen energy, 1980. (1980). *International Journal of Hydrogen Energy*. [http://doi.org/10.1016/0360-3199\(80\)90035-X](http://doi.org/10.1016/0360-3199(80)90035-X)
- Jaimes Suárez, Y., & Aranzazu Hernández, F. (2010). *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L) en Colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora roreri)*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA.
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511. <http://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>
- Jiang, Z., Vasil, A. I., Hale, J. D., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2008). Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic  $\alpha$ -helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 90(3), 369–383. <http://doi.org/10.1002/bip.20911>
- Jofré, C., Guzmán, F., Cárdenas, C., Albericio, F., & Marshall, S. H. (2011). A natural peptide and its variants derived from the processing of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) displaying enhanced antimicrobial activity: A novel alternative for the control of bacterial diseases. *Peptides*, 32, 852–858. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.026>
- Johansson, E. M., Córdoba, J. M., & Odén, M. (2009). Synthesis and characterization of large mesoporous silica SBA-15 sheets with ordered accessible 18 nm pores. *Materials Letters*, 63(24-25), 2129–2131. <http://doi.org/10.1016/j.matlet.2009.07.013>
- Kapoor, S., Hegde, R., & Bhattacharyya, A. J. (2009). Influence of surface chemistry of mesoporous alumina with wide pore distribution on controlled drug release. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 140(1), 34–9. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.07.015>
- Kent, S. B. (1988). Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 57(1), 957–89. <http://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.004521>
- Kosmulski, M. (2009). Compilation of PZC and IEP of sparingly soluble metal oxides and hydroxides from literature. *Advances in Colloid and Interface Science*, 152(1-2), 14–25. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2009.08.003>
- Kresge, C. T., & Roth, W. J. (2013). The discovery of mesoporous molecular sieves from the twenty year perspective. *Chemical Society Reviews*, 42(9), 3663–70. <http://doi.org/10.1039/c3cs60016e>
- Krstic, V. (2005, October 26). Catalizadores de Rh-soportado y su aplicación en la hidrogenación de crotonaldehído. Universidad de Cantabria. Retrieved from <http://www.tdx.cat/handle/10803/10685>

- Lee, D., Shin, S., Kim, D., Seo, M., & Kang, J. (1999). Antifungal mechanism of a cysteine-rich antimicrobial peptide, Ib-AMP1, from *Impatiens balsamina* against *Candida albicans*. *Biotechnology ...*, 1047–1050. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1005636610512>
- Leofanti, G., Padovan, M., Tozzola, G., & Venturelli, B. (1998). Surface area and pore texture of catalysts. *Catalysis Today*, 41(1-3), 207–219. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(98\)00050-9](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(98)00050-9)
- Li, W., & Zhao, D. (2013). An overview of the synthesis of ordered mesoporous materials. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 49(10), 943–6. <http://doi.org/10.1039/c2cc36964h>
- Llop Hernández, A., Valdés-Dapena Vivanco, M. M., & Zuazo Silva, J. L. (2001). *Microbiología y parasitología médicas*. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
- Lloyd-Williams, P. (1997). *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. New directions in organic and biological chemistry CN - QP551 .L56 1997*. Boca Raton: CRC Press.
- Lozada, B. S., Herrera, L. V., Perea, J. A., Stashenko, E., & Escobar, P. (2012). Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 61(2), 102–110.
- Lu, J. R., Su, T. J., Thirtle, P. N., Thomas, R. K., Rennie, A. R., & Cubitt, R. (1998). The Denaturation of Lysozyme Layers Adsorbed at the Hydrophobic Solid/Liquid Surface Studied by Neutron Reflection. *Journal of Colloid and Interface Science*, 206(1), 212–223. <http://doi.org/10.1006/jcis.1998.5680>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., & Gacto Fernández, M. (2004). *Brock biología de los microorganismos*. México: Prentice Hall Hispanoamericana.
- Márquez-Alvarez, C., Žilková, N., Pérez-Pariente, J., & Čejka, J. (2008). Synthesis, Characterization and Catalytic Applications of Organized Mesoporous Aluminas. *Catalysis Reviews*, 50(2), 222–286. <http://doi.org/10.1080/01614940701804042>
- Marr, A. K., Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(5), 468–72. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.006>
- Matsuura, S., Ishii, R., Itoh, T., Hanaoka, T., Hamakawa, S., Tsunoda, T., & Mizukami, F. (2010). Direct visualization of hetero-enzyme co-encapsulated in mesoporous silicas. *Microporous and Mesoporous Materials*, 127(1-2), 61–66. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.06.029>
- Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1462(1-2), 1–10. [http://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00197-2](http://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00197-2)
- McGinity, J. W., & Felton, L. A. (2008). *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical disage forms*. (J. W. McGinity & L. A. Felton, Eds.) (Third edit). New York.
- Meincken, M., Holroyd, D. L., & Rautenbach, M. (2005). Atomic Force Microscopy Study of the Effect of Antimicrobial Peptides on the Cell Envelope of *Escherichia coli*. *Society*, 49(10), 4085–4092. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4085>

- Miyahara, M., Vinu, A., & Ariga, K. (2007). Adsorption myoglobin over mesoporous silica molecular sieves: Pore size effect and pore-filling model. *Materials Science and Engineering: C*, 27(2), 232–236. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.012>
- Muschert, S., Siepman, F., Leclercq, B., Carlin, B., & Siepman, J. (2009). Drug release mechanisms from ethylcellulose: PVA-PEG graft copolymer-coated pellets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.12.007>
- Navarre, W. W., & Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 63(1), 174–229. [http://doi.org/10.1092-2172/99/\\$04.00+0](http://doi.org/10.1092-2172/99/$04.00+0)Barnett, Timothy C.
- Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 464–472. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>
- Niesz, K., Yang, P., & Somorjai, G. a. (2005). Sol-gel synthesis of ordered mesoporous alumina. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, (15), 1986–1987. <http://doi.org/10.1039/b419249d>
- Oficial, G., & Divulga, I. (2005). El control de la moniliasis en el cacao, 23–26.
- Orth, D., Grif, K., Zimmerhackl, L. B., & Würzner, R. (2008). Prevention and treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections in humans. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 6(1), 101–108. <http://doi.org/10.1586/14787210.6.1.101>
- Pennington, M. W., & Dunn, B. M. (1994). Peptide Synthesis Protocols (In: *Methods Mol. Biol.* 1994, 35). <http://doi.org/10.1385/0896032736>
- Perullini, A. (2009). *Síntesis de materiales inorgánicos con porosidad controlada para la inmovilización de células: aplicaciones en biorreactores*. Retrieved from [http://bldigital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_4413\\_Perullini.pdf](http://bldigital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4413_Perullini.pdf)
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78–82. [http://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70024-X](http://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70024-X)
- Postgate, J. R., Crumpton, J. E., & Hunter, J. R. (1961). The measurement of bacterial viabilities by slide culture. *Journal of General Microbiology*, 24(1954), 15–24. <http://doi.org/10.1099/00221287-24-1-15>
- Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J. A., & Piedrola-Angulo, G. (1987). *Microbiología y parasitología médica*. Barcelona: Salvat.
- Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(6), 536–47. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>
- Reyes, R. E., Ramírez Saad, H., Solís Galicia, C., Ortiz Herrera, M., & Coria Jiménez, R. (2009). Mecanismos involucrados en la variabilidad del antígeno O de bacterias Gram negativas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 52, 32–43.
- Rink, H. (1987). Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Letters*, 28(33), 3787–3790. [http://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)96384-6](http://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)96384-6)
- Robens, E., Dabrowski, A., & Kutarov, V. V. (2004). Comments on surface structure

- analysis by water and nitrogen adsorption. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 76(2), 647–657. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000221460800030
- Robinson, J. R. (1978). *Sustained and controlled release drug delivery systems* (Vol. 6). M. Dekker.
- Rodríguez, E. (2006). Técnica de reducción de inóculo para controlar la Moniliasis del cacao en Santander. *Revista Corpoica*, 4(4), 68–78. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Técnica+de+reducción+de+inoculo+para+controlar+la+Moniliasis+del+cacao+en+Santander#0>
- Saldarriaga, Y., & Pineda, F. (2001). *Aislamiento de hongos fitopatógenos. Manual de micología aplicada*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Schlossbauer, A., Schaffert, D., Kecht, J., Wagner, E., & Bein, T. (2008). Click Chemistry for High-Density Biofunctionalization of Mesoporous Silica. *Journal of the American Chemical Society*, 130(38), 12558–12559. <http://doi.org/10.1021/ja803018w>
- Slowing, I. I., Trewyn, B. G., & Lin, V. S.-Y. (2007). Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Delivery of Membrane-Impermeable Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 129(28), 8845–8849. <http://doi.org/10.1021/ja0719780>
- Soler-Illia, G. J. D. a a, Sanchez, C., Lebeau, B., & Patarin, J. (2002). Chemical strategies to design textured materials: From microporous and mesoporous oxides to nanonetworks and hierarchical structures. *Chemical Reviews*, 102(11), 4093–4138. <http://doi.org/10.1021/cr0200062>
- Suhrenbrock, L., Radtke, G., Knop, K., & Kleinebudde, P. (2011). Suspension pellet layering using PVA-PEG graft copolymer as a new binder. *International Journal of Pharmaceutics*. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.061>
- Taylor, R. H., Acland, D. P., Attenborough, S., Cammue, B. P., Evans, I. J., Osborn, R. W., ... Broekaert, W. F. (1997). A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(39), 24480–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9305910>
- Tang, E. S. K., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2005). Coating of multiparticulates for sustained release. *American Journal of Drug Delivery*.
- Tantirungrotechai, J., Chotmongkolsap, P., & Pohmakotr, M. (2010). Synthesis, characterization, and activity in transesterification of mesoporous Mg–Al mixed-metal oxides. *Microporous and Mesoporous Materials*, 128(1-3), 41–47. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.08.001>
- Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, 51(2), 149–77. <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>
- Thevissen, K., François, I. E. J. a, Sijtsma, L., van Amerongen, A., Schaaper, W. M. M., Meloen, R., ... Cammue, B. P. a. (2005). Antifungal activity of synthetic peptides derived from *Impatiens balsamina* antimicrobial peptides Ib-AMP1 and Ib-AMP4. *Peptides*, 26(7), 1113–9. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.01.008>
- Thevissen, K., Ghazi, A., Samblanx, W. De, Brownlee, C., Rupert, W., & Broekaert, W. F. (1996). Fungal Membrane Responses Induced by Plant Defensins and Thionins. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 15018–15025. <http://doi.org/10.1074/jbc.271.25.15018>

- Vaara, M., & Nurminen, M. (1999). Outer Membrane Permeability Barrier in *Escherichia coli* Mutants That Are Defective in the Late Acyltransferases of Lipid A Biosynthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), 1459–1462. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89296/>
- Vallet-Regi, M., Rámila, A., del Real, R. P., & Pérez-Pariente, J. (2001). A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. *Chemistry of Materials*, 13(2), 308–311. <http://doi.org/10.1021/cm0011559>
- van der Kraan, M. I. a, van der Made, C., Nazmi, K., van't Hof, W., Groenink, J., Veerman, E. C. I., ... Nieuw Amerongen, A. V. (2005). Effect of amino acid substitutions on the candidacidal activity of LFampin 265-284. *Peptides*, 26(11), 2093–7. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.03.056>
- van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., & Anderson, M. a. (2013). Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 70(19), 3545–70. <http://doi.org/10.1007/s00018-013-1260-1>
- Vásquez, L. E., Guzmán, F., Patarroyo, M. E., & Arango, R. (2009). IN VITRO EVALUATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES AGAINST *Mycosphaerella fijiensis* MORELET AND THEIR INTERACTION WITH SOME CHEMICAL FUNGICIDES. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*.
- Velandía, A., Santiago, J., Esteban, C., & Teresa, M. (2008). *Moniliophthora roreri* EN CACAO *Teobroma cacao* L ., 1–3.
- Wan, Y., & Zhao, D. (2007). On the controllable soft-templating approach to mesoporous silicates. *Chemical Reviews*, 107(7), 2821–60. <http://doi.org/10.1021/cr068020s>
- Wang, P., Bang, J.-K., Kim, H. J., Kim, J.-K., Kim, Y., & Shin, S. Y. (2009). Antimicrobial specificity and mechanism of action of disulfide-removed linear analogs of the plant-derived Cys-rich antimicrobial peptide Ib-AMP1. *Peptides*, 30(12), 2144–9. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.09.020>
- Wang, S. (2009). Ordered mesoporous materials for drug delivery. *Microporous and Mesoporous Materials*, 117(1-2), 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.07.002>
- Wang, Y., Noguchi, M., Takahashi, Y., & Ohtsuka, Y. (2001). Synthesis of SBA-15 with different pore sizes and the utilization as supports of high loading of cobalt catalysts. *Catalysis Today*, 68(1-3), 3–9. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(01\)00317-0](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(01)00317-0)
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Xu, L., Song, H., & Chou, L. (2012). One-Pot Synthesis of Ordered Mesoporous NiO – CaO – Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Composite Oxides for Catalyzing CO<sub>2</sub> Reforming of CH<sub>4</sub>.
- Yau, W. M., Wimley, W. C., Gawrisch, K., & White, S. H. (1998). The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry*, 37(42), 14713–14718.
- Yiu, H. H. P., & Wright, P. a. (2005). Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic–organic hybrid. *Journal of Materials Chemistry*, 15(35-36), 3690. <http://doi.org/10.1039/b506090g>
- Yuan, Q., Yin, A.-X., Luo, C., Sun, L.-D., Zhang, Y.-W., Duan, W.-T., ... Yan, C.-H. (2008). Facile synthesis for ordered mesoporous gamma-aluminas with high thermal stability.

*Journal of the American Chemical Society*, 130(11), 3465–3472.  
<http://doi.org/10.1021/ja0764308>

- Zhang, H., & Cooper, A. I. (2007). Aligned porous structures by directional freezing. *Advanced Materials*, 19(11), 1529–1533. <http://doi.org/10.1002/adma.200700154>
- 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. <http://doi.org/10.1074/jbc.M104925200>
- Zhang, Y., Chan, H. F., & Leong, K. W. (2013). Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 104–20. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.003>
- Zinieris, N., Leondiadis, L., & Ferderigos, N. (2005). Nalpha-Fmoc removal from resin-bound amino acids by 5% piperidine solution. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 7(1), 4–6. <http://doi.org/10.1021/cc049872d>

## **CAPITULO 4**

# **PREPARACIÓN DE OXIDOS MESOPOROSOS DE Al(III)-Mg(II) COMO SOPORTES DE LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIALES Ib-M6 E Ib-A4**

*"Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa"*

*Mahatma Ghandi*

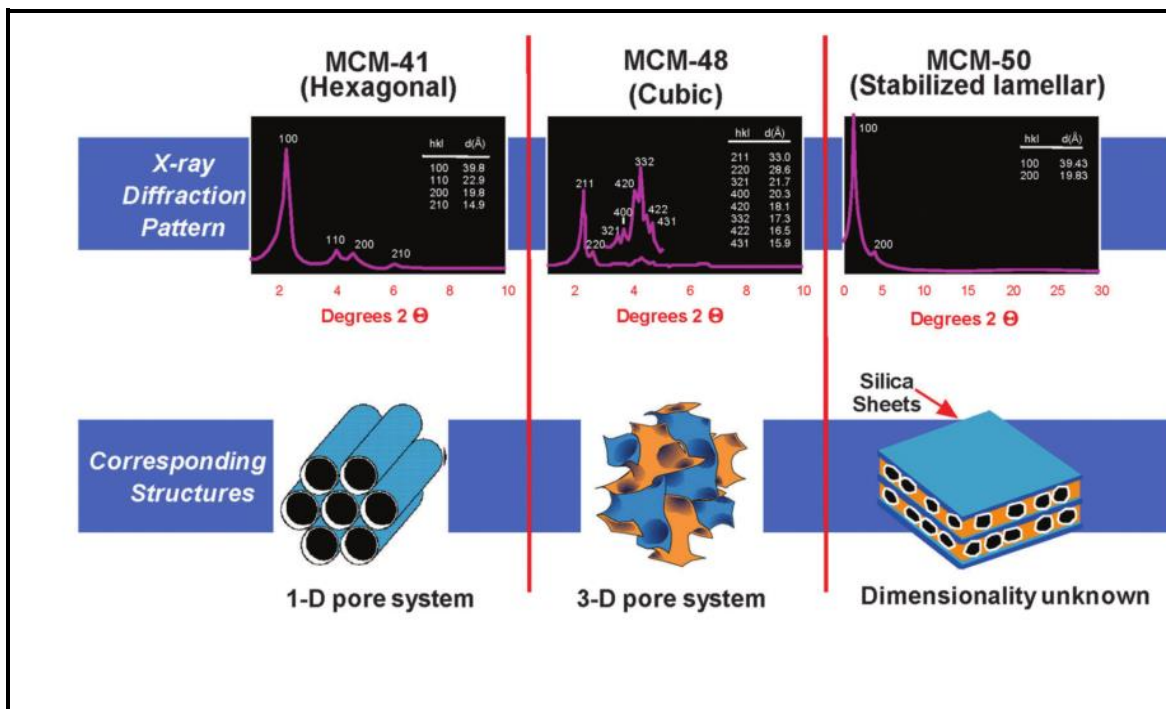
Los materiales porosos han despertado un gran interés tecnológico y científico debido a la capacidad que poseen para interactuar con átomos, iones o moléculas a través de su vasta superficie (Davis, 2002; Li & Zhao, 2013). Las propiedades físicas y químicas que posean estos materiales están determinadas por el tamaño, la forma y el volumen de los poros; por lo tanto su diseño, entendimiento y manipulación han representado avances importantes en ciencia de materiales (Wan & Zhao, 2007).

De acuerdo a la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) los materiales porosos se pueden clasificar de acuerdo al diámetro de sus poros en: microporosos (<2 nm), mesoporosos (2-50 nm) y macroporosos (>50 nm) (Everett, 1972). Entre estos, los materiales mesoporosos poseen una gran estabilidad estructural y presentan características interesantes como: altas áreas superficiales (>1000 m<sup>2</sup>/g), la posibilidad de ajustar el tamaño de poro y funcionalizar su superficie. Por esa razón han sido ampliamente utilizados en catálisis (Hicks, Castagnola, Zhang, Pinnavaia, & Marshall, 2003; Márquez-Alvarez, Žilková, Pérez-Pariente, & Čejka, 2008), purificación de gases (Robens, Dabrowski, & Kutarov, 2004) y aguas residuales (Addorisio, Esposito, & Sannino, 2010; Han et al., 2013), en liberación controlada de drogas, entre otros. Además se han convertido en una forma versátil de atrapar biomoléculas como proteínas y péptidos (Das, Kapoor, Yamada, & Bhattacharyya, 2009).

A principios de 1980 se comenzaron a estudiar las arcillas pilareadas mesoporosas. Sin embargo, estos materiales presentaban una distribución de poros desordenada, no era posible manipular el tamaño de los poros y además se observaba la degradación del material durante los procesos catalíticos (Li & Zhao, 2013). En 1992, un grupo de investigadores de la compañía Mobil reportó la preparación de silicatos mesoestructurados utilizando surfactantes catiónicos de amonio cuaternario, los cuales funcionaban como agentes directores de la estructura (ADE). Dentro de esta familia de materiales se pueden mencionar el MCM-41, por Mobil Composition of Matter (Soler-Illia, Sanchez, Lebeau, & Patarin, 2002), MCM-48 y MCM-50 que se caracterizan por tener una distribución ordenada de los poros y áreas superficiales superiores a los 700 m<sup>2</sup>/g (Guerrero, 2010).

Controlando las condiciones de la síntesis como la concentración y tipo de surfactante es posible obtener tres estructuras bien definidas para los materiales mesoporosos: hexagonal, cubica y laminar. Cada una de estas estructuras presenta reflexiones características a ángulos bajos de sus respectivos perfiles de difracción de rayos X (DRX) (Antonio, 2013; Guerrero, 2010; Krstic, 2005) tal como se muestra en la Figura 29 donde aparecen los perfiles de difracción de los materiales MCM-41 con estructura hexagonal, MCM-48 con estructura cúbica y MCM-50 con estructura laminar estabilizada.

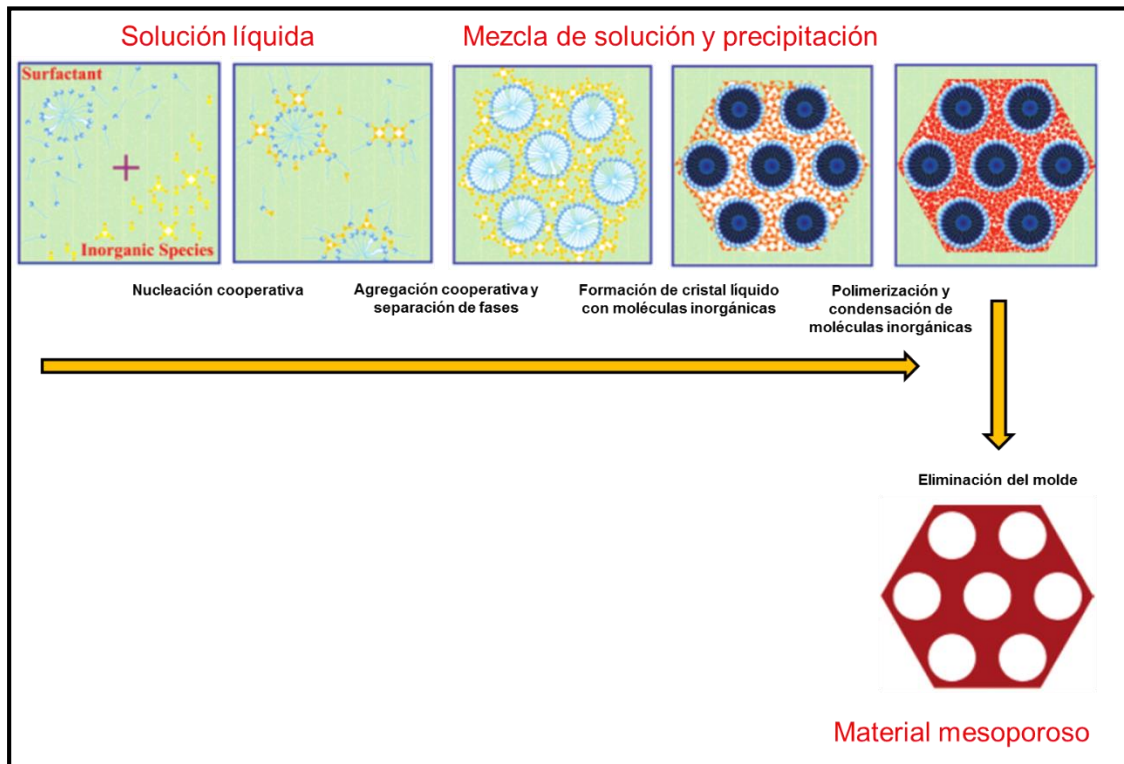
**Figura 29.** Perfiles de difracción de rayos X y estructuras correspondientes a los materiales mesoporosos MCM-41, MCM-48 y MCM-50. (Imagen tomada de Kresge y colaboradores (Kresge & Roth, 2013))



Se han utilizado como ADE una gran variedad de surfactantes para la obtención de materiales mesoporosos. Entre ellos se pueden mencionar los co-polímeros anfífilicos de tres bloques consistentes en óxido de polietileno-óxido de polipropileno-óxido de polietileno,  $(PEO)_x(PPO)_y(PEO)_x$ , denominados comercialmente como Pluronic. Estos compuestos presentan la ventaja de inducir un ordenamiento mesoestructural que facilita el direccionamiento de la estructura

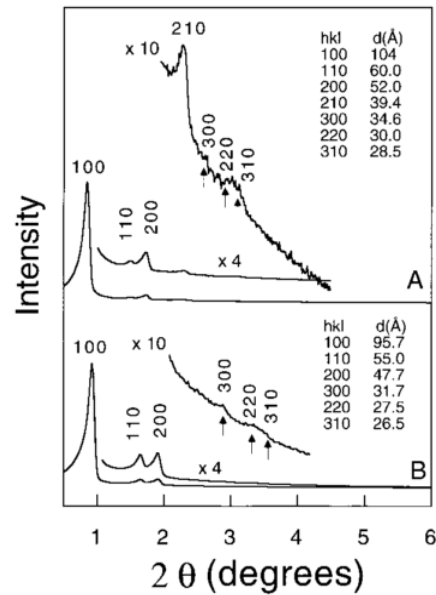
del material. Además, forman micelas que se organizan en forma hexagonal dando una característica estructural importante a los materiales obtenidos (Antonio, 2013). Por otro lado, son biodegradables y poseen un bajo costo. La primera fase del mecanismo de síntesis propuesto utilizando este tipo ADE es la formación de micelas; seguido de un autoensamble orgánico-inorgánico entre el surfactante y los precursores metálicos. Esto es conducido por enlaces no covalentes como los puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y/o enlaces covalentes (Wan & Zhao, 2007); de esta manera las densidades de carga entre ambas especies se influyen mutuamente, por lo que la composición de estos híbridos orgánico-inorgánico difiere de las especies originales. Esta coincidencia de la densidad de carga gobierna los procesos de ensamble que resulta en la separación de fases y la reorganización que finalmente conduce la disposición tridimensional de más baja energía (Li & Zhao, 2013). La remoción posterior del surfactante da lugar a los mesoporos deseados. (Figura 30)

**Figura 30.** Síntesis de materiales mesoporosos utilizando autoensamble cooperativo. (Imagen tomada de Wan and Zhao (Wan & Zhao, 2007))



Se han utilizado diferentes tipos de precursores metálicos para la preparación de materiales mesoporosos; sin embargo, los más utilizados son los precursores de silicio con los que se han obtenidos materiales como MCM-41 y SBA-15. Los materiales SBA-15 fueron sintetizados por primera vez por Dongyuan y colaboradores en 1998 (Dongyuan et al., 1998) quienes reportaron que el espesor de las paredes de silica y el tamaño del poro pueden ser ajustados modificando las condiciones de síntesis como la temperatura de calentamiento y el tiempo de la reacción. La estructura mesoporosa hexagonal fue obtenida utilizando temperaturas de reacción entre 35° a 80°C y una concentración entre 0,5% a 1% m/m del surfactante Pluronic L121. Esta estructura fue confirmada en los perfiles de DRX a ángulos bajos en los cuales se encontraron tres picos (100), (110) y (200) que son característicos de la estructura hexagonal y los cuales se conservan antes y después de calcinar los materiales a 500 °C (Figura 31). Adicionalmente, por microscopía electrónica de barrido (SEM) determinaron que estos materiales poseen canales tubulares con un diámetro superior a los 30 nm. En comparación con los MCM-41, los cuales poseen una estructura hexagonal similar, los SBA-15 presenta una mayor estabilidad térmica (Dongyuan et al., 1998; Johansson, Córdoba, & Odén, 2009; Y. Wang, Noguchi, Takahashi, & Ohtsuka, 2001), por lo que han sido utilizados en diferentes procesos catalíticos y en la inmovilización de enzimas como la lisosima (Schlossbauer, Schaffert, Kecht, Wagner, & Bein, 2008), mioglobina (Miyahara, Vinu, & Ariga, 2007), lipasa y tripsina (Matsuura et al., 2010).

**Figura 31.** Perfiles de DRX en polvo de material SBA-15 A) sin calcinar y B) calcinado a 500°C. (Imagen tomada de Dongyuan y colaboradores (Dongyuan et al., 1998))



Los óxidos mesoporosos han despertado un gran interés para ser utilizados como sistemas de liberación controlada (SLC) debido a que sus estructuras son capaces de resistir la degradación (Slowing, Trewyn, & Lin, 2007; Vallet-Regi, Rámila, del Real, & Pérez-Pariente, 2001). Por lo tanto, facilitan la liberación de drogas en el tiempo y cantidades requeridas; a diferencia de sistemas como los liposomas o los sistemas a base de polímeros que pueden degradarse antes de llegar al blanco requerido (Kapoor, Hegde, & Bhattacharyya, 2009). En la mayoría de publicaciones en este campo se encuentra la descripción de materiales mesoporosos a base de silicio con una distribución única de poro de aproximadamente 2,5 nm lo que requiere realizar la síntesis de diferentes matrices si es necesaria una distribución de poro diferente [25]. En el 2009, Kapoor y colaboradores evaluaron la liberación de ibuprofeno (IBU) desde óxidos mesoporosos de aluminio con un amplio rango de distribución de tamaño de poro; este rango fue obtenido con la modificación superficial de los materiales adicionando grupos metilo (-CH<sub>3</sub>), 2,3-dihidroxinaftaleno y grupos amino (-NH<sub>2</sub>). En este estudio se evaluó la interacción entre el IBU y cada una de las superficies modificadas encontrando que estos materiales son más apropiados para la liberación de múltiples drogas que los mesoporosos de silicio tipo MCM, los cuales poseen una única distribución de tamaño de poro.

Al mezclar precursores de diferentes óxidos metálicos se pueden obtener materiales con propiedades interesantes que difieren de los obtenidos con los precursores individuales. El aluminio, que posee propiedades ácido-base que pueden ser modificadas a través de las condiciones de síntesis y post-síntesis, puede mezclarse con el magnesio que tiene propiedades básicas. De esta manera se pueden obtener materiales con un rango de propiedades particulares (Tantirungrotechai, Chotmongkolsap, & Pohmakotr, 2010) que pueden ser útiles en catálisis (Tantirungrotechai et al., 2010) y a la hora de atrapar biomoléculas como los péptidos.

En este capítulo se describe la preparación de óxidos mesoporosos de Al(II)-Mg(III), los cuales poseen relaciones desde 0% hasta 30% de magnesio en su estructura. Se utilizó como ADE el pluronic P123. Se determinó el porcentaje de impregnación de los de los péptidos Ib-M6 e Ib-A4 en los óxidos mesoporosos preparados y se determinó la liberación de cada uno de ellos a pH de 7,4 y 5,6, respectivamente. Finalmente, se determinó la actividad antifúngica contra *Moniliophthora roreri* del péptido Ib-A4 soportado en los óxidos mesoporosos de Al(II)-Mg(III) preparados.

## 4.1. METODOLOGÍA

### 4.1.1. Preparación de los óxidos mesoporosos de Al(III)-Mg(II).

Inicialmente se realizó la preparación de materiales mesoporosos de Aluminio utilizando el isopropóxido de aluminio como precursor metálico y como ADE el Pluronic P123. Se adicionó 1 g de Pluronic P123 en 100 mL de etanol absoluto (EtOH) a temperatura ambiente. Posteriormente, a esta solución se adicionó una cantidad variable de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) al 67% m/m o ácido clorhídrico (HCl) al 37% m/m junto con cantidades entre 0,12 a 0,36 mol de ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O) por mol de precursor de Aluminio. La mezcla fue cubierta con papel parafilm y se dejó en agitación constante hasta disolución completa del precursor. Se realizó la evaporación del solvente en una estufa a 60 °C durante 3 días y finalmente se realizó la calcinación del sólido con un incremento lento de la temperatura (1°C/min) hasta 600 °C durante 5 horas (Xu, Song, & Chou, 2012).

---

Para la preparación de los materiales mesoporosos de Aluminio y Magnesio se utilizaron acetato de magnesio e isopropóxido de aluminio como precursores metálicos. Se utilizó en procedimiento similar al utilizado para la obtención de los mesoporosos de Aluminio empleando cantidades variables de los precursores metálicos ( $\text{mol Al(III)} + \text{mol Mg(II)} = 1 \text{ mol}$ ) y 2,97 moles de  $\text{HNO}_3$  al 67% m/m por mol de precursor.

#### **4.1.2. Caracterización de los materiales mesoporosos de Al(III)-Mg(II).**

El grado de estructuración (mesoporosidad) de los materiales mesoporosos preparados se determinó por medio de difracción de rayos X de polvos (PDRX) midiendo a valores de  $2\theta$  entre  $1$  y  $5^\circ$ . Esto se realizó en un difractómetro de polvo marca Bruker modelo D8 ADVANCE con geometría DaVinci utilizando radiación  $\text{CuK}\alpha$ .

Adicionalmente se determinaron las isotermas de adsorción y desorción de  $\text{N}_2$  a 77K en un analizador de sólidos marca Micromeritic Serencia 3FLEX y se utilizó la ecuación de BET para calcular el área superficial y el método BJH para calcular el diámetro y distribución de tamaño de poro.

Por último se determinó el potencial zeta de los materiales en suspensión al pH de liberación de los péptidos (7,4 para Ib-M6 y 5,6 para Ib-A4), utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS90 de Malvern. 0,05g de mesoporoso/L fueron dispersados en una solución buffer Tris-HCl (10mM, pH=7,4).

#### **4.1.3. Impregnación de los materiales mesoporosos con los péptidos Ib-M6 e Ib-A4.**

Previamente a la impregnación se realizó un lavado de los materiales mesoporosos con agua Tipo Milli-Q. Para esto se tomaron 0,05 g de cada uno de los materiales y se agitaron con 10 mL de agua durante 30 minutos; a continuación, se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 minutos y finalmente se llevaron a una estufa a  $60^\circ\text{C}$  hasta sequedad completa.

Los materiales secos fueron puestos en agitación en 10 mL de solución 100  $\mu\text{M}$  de los péptidos Ib-M6 e Ib-A4 a pH de 10 en un buffer  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$  0,1 M durante 15 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 minutos y se determinó la concentración del péptido en el sobrenadante midiendo la absorbancia a 281 nm por medio de espectroscopia UV-vis, utilizando un equipo Genesis 10S. La disminución de la

absorbancia del sobrenadante indicó la cantidad adsorbida de péptido por los materiales mesoporosos.

#### **4.1.4. Determinación del porcentaje de liberación los péptidos Ib-M6 e Ib-A4 desde los materiales mesoporosos.**

Se tomaron 0,05g de cada uno de los materiales impregnados y se colocaron en agitación constante en buffer Tris-HCl 10mM a pH 7,4 para los materiales impregnados con Ib-M6 y en buffer acetato 0,1M a pH 5,6 para los materiales impregnados con Ib-A4. Cada 15 minutos se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 minutos y se determinó la concentración de los péptidos en el sobrenadante a una absorbancia de 281 nm por espectroscopia UV-vis, utilizando un equipo Genesis 10S. El aumento de la absorbancia en el sobrenadante indicó la cantidad de péptido liberada desde los materiales mesoporosos.

#### **4.1.5. Determinación de la actividad antifungica contra *Moniliophthora rorei* de los péptidos Ib-M6 e Ib-A4 atrapados en los óxidos mesoporosos preparados.**

Se incubaron  $1 \times 10^6$  esporas/mL de *M. rorei* en 5 mL de caldo de papa dextrosa (CPD) con 0,05 g de cada uno de los materiales mesoporosos sintetizados e impregnados con el péptido Ib-A4. Transcurridos 7 días se observó el crecimiento micelial del hongo. Como control negativo se tomaron los materiales mesoporosos sin péptido impregnados.

## **4.2. RESULTADOS Y ANALISIS**

### **4.2.1. Preparación y caracterización de los óxidos mesoporosos de Aluminio**

La hidrólisis de los precursores de aluminio se ve fuertemente afectada por como la cantidad de ácido en el medio de reacción (Niesz, Yang, & Somorjai, 2005). En el 2008 Yuan y colaboradores utilizaron HNO<sub>3</sub> y HCl junto con C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> para la hidrólisis de diferentes precursores de aluminio, entre los que se encontraba el isopropóxido de aluminio (Yuan et al., 2008). Los autores encontraron que es posible obtener estructuras mesoporosas independientemente del ácido empleado. Con base en esto, se realizó la síntesis de óxidos mesoporosos de aluminio variando la cantidad de HNO<sub>3</sub> y HCl. Adicionalmente, junto con ambos ácidos se utilizó el C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> como ADE adicional con el fin lograr un mayor control en la estructura. En la Tabla IV1 se enumeran los materiales de óxido de aluminio obtenidos

al variar la cantidad en moles de HNO<sub>3</sub> al 67% m/m y HCl 37% m/m junto con ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>.H<sub>2</sub>O).

**Tabla 8.** Óxidos mesoporosos de aluminio obtenidos al variar las cantidades de HNO<sub>3</sub> al 67% m/m y HCl 37% m/m junto con ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> H<sub>2</sub>O).

ID Muestra	HNO <sub>3</sub> (mol)	HCl (mol)	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> H <sub>2</sub> O (mol)
Al-1,2N	1,19	-	-
Al-2,4N	2,4	-	-
Al-3,0N	2,97	-	-
Al-2,4N(0,1AC)	2,4	-	0,12
Al-2,4N(0,2AC)	2,4	-	0,24
Al-2,4N(0,4AC)	2,4	-	0,36
Al-1,2N(0,2AC)	1,19	-	0,24
Al-3,0N(0,2AC)	2,97	-	0,24
Al-1,0Cl(0,2AC)	-	0,96	0,24
Al-2,0Cl(0,2AC)	-	1,9	0,24
Al-2,4Cl(0,2AC)	-	2,41	0,24
Al-2,0Cl(0,1AC)	-	1,9	0,12
Al-2,0Cl(0,4AC)	-	1,9	0,36

Con el fin de evidenciar la formación de estructuras mesoporosas se realizaron medidas de difracción de Rayos X (DRX) a ángulos bajos de los óxidos de aluminio sintetizados y calcinados a 600 °C. Los resultados obtenidos fueron comparados con el de una muestra patrón con estructura mesoporosa reportada en el 2005 por Amatani y colaboradores (Amatani, Nakanishi, Hirao, & Kodaira, 2005) (Figura 32a). En la muestra patrón se

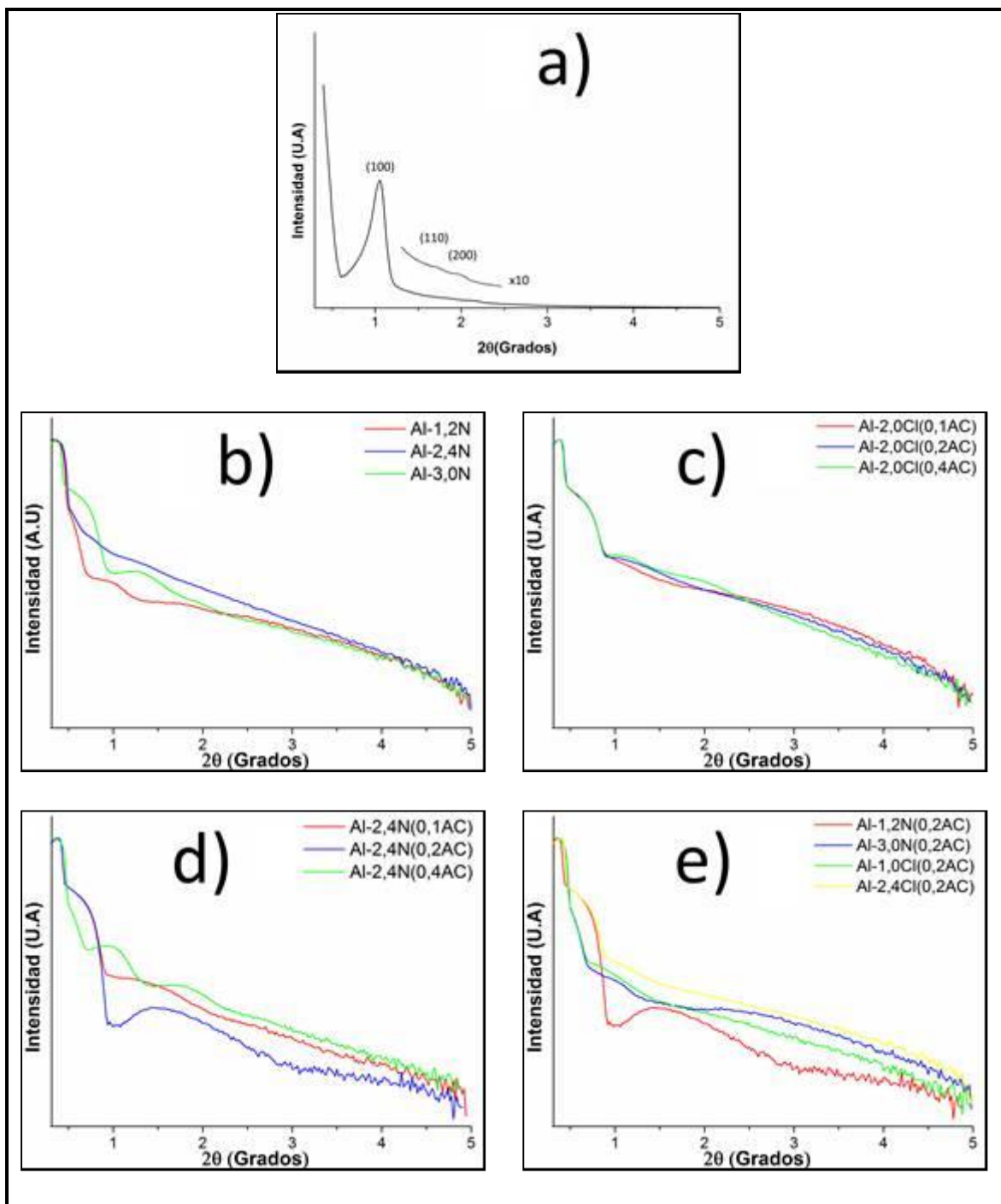
observan tres reflexiones características de las estructuras mesoporosas hexagonales: (1 0 0), (1 1 0) y (2 0 0) (Kresge & Roth, 2013).

En todos los perfiles de difracción obtenidos las señales que se encuentran por debajo de un grado corresponde al artefacto de medición por lo que son descartadas del análisis. En la Figura 32.b se puede apreciar que al utilizar 2,4 moles de HNO<sub>3</sub> no se observan reflexiones en los perfiles de difracción en los óxidos de aluminio preparados. Sin embargo, al adicionar ácido cítrico se observa la aparición de picos de reflexión a medida que la cantidad de este ácido aumenta (Figura 32.d). Esto se debe a que el ácido cítrico es un ácido hidroxicarboxílico que puede ejercer como ADE y actuar como ligando mono o bidentado y coordinarse con el aluminio. Sin embargo, se observan reflexiones muy anchas como en el caso de los materiales Al-2,4N(0,1 AC) y Al-2,4N(0,2AC) (Figura 4.4.d). Situación similar se observa en las materiales Al-1,2N(0,2AC) y Al-3,0N(0,2AC) presentados en la Figura 32.d. Por esta razón, la utilización de ácido cítrico junto con HNO<sub>3</sub> fue descartada para la preparación de los materiales de Al(III)-Mg(II).

Los materiales preparados con HCl en presencia de ácido cítrico (Figura 32.c y 32.e) presentaron reflexiones muy anchas indicando una estructura poco definida, por esta razón estas condiciones de síntesis también fueron descartadas para la preparación de los materiales de Al(III)-Mg(II).

Finalmente, en la Figura 32.b se observa que los materiales Al-3,0N presentan una reflexión a 1.28 grados dando indicios de una estructura mesoporosa ordenada. Por esta razón, para la preparación de los materiales de Al(III)-Mg(II) se utilizaron 2,97 moles de HNO<sub>3</sub>.

**Figura 32.** Perfiles de difracción de rayos X a ángulos bajos obtenidos para los óxidos de aluminio mesoporosos sintetizados utilizando cantidades variables en moles de b)  $\text{HNO}_3$  al 67% m/m, c)  $\text{HNO}_3$  al 67% m/m junto con cantidades desde 0,12 a 0,36 moles de ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), d)  $\text{HCl}$  37% m/m junto con cantidades desde 0,12 a 0,36 moles ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) y e) cantidades variables da  $\text{HNO}_3$  al 67% m/m y  $\text{HCl}$  37% m/m en presencia de 0,2 moles de  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . La figura a) corresponde a la muestra patrón con estructura mesoporosa reportada en el 2005 por Amatani y colaboradores (Amatani et al., 2005)

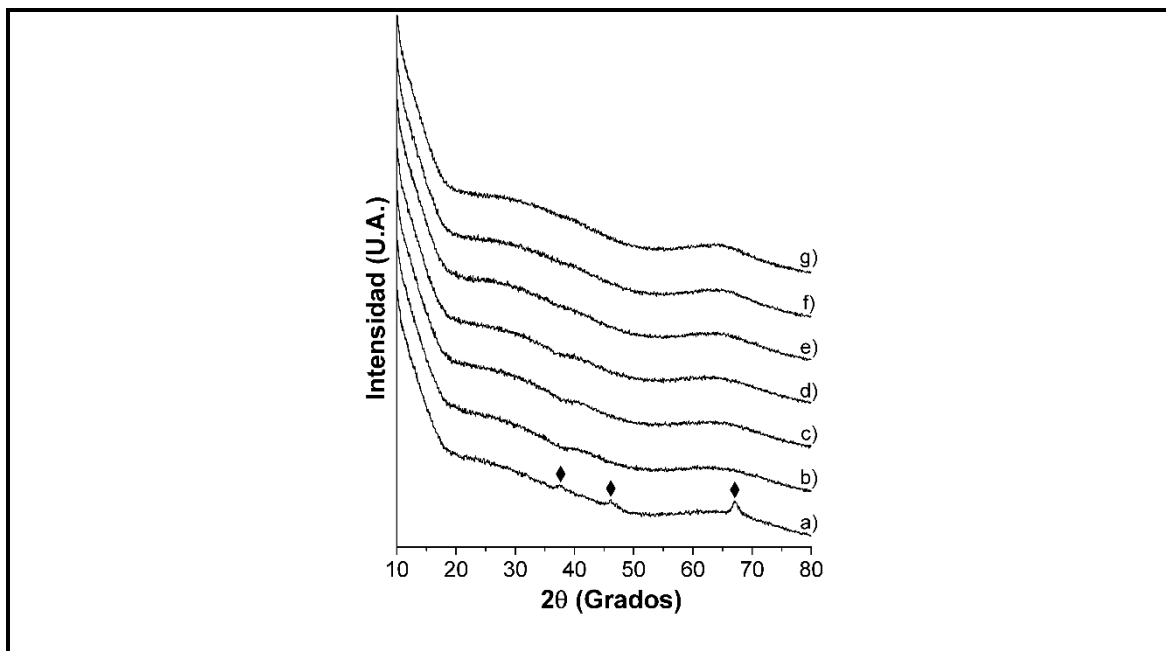


#### **4.2.2. Preparación y caracterización de los óxidos mesoporosos de Al(III)-Mg(II).**

Los óxidos mesoporosos de Al(III)-Mg(II) fueron sintetizados variando la relación de magnesio desde 5% hasta el 30%. Por esta razón, fueron denominados materiales AMX, donde X es un número que varía de 5 hasta 30.

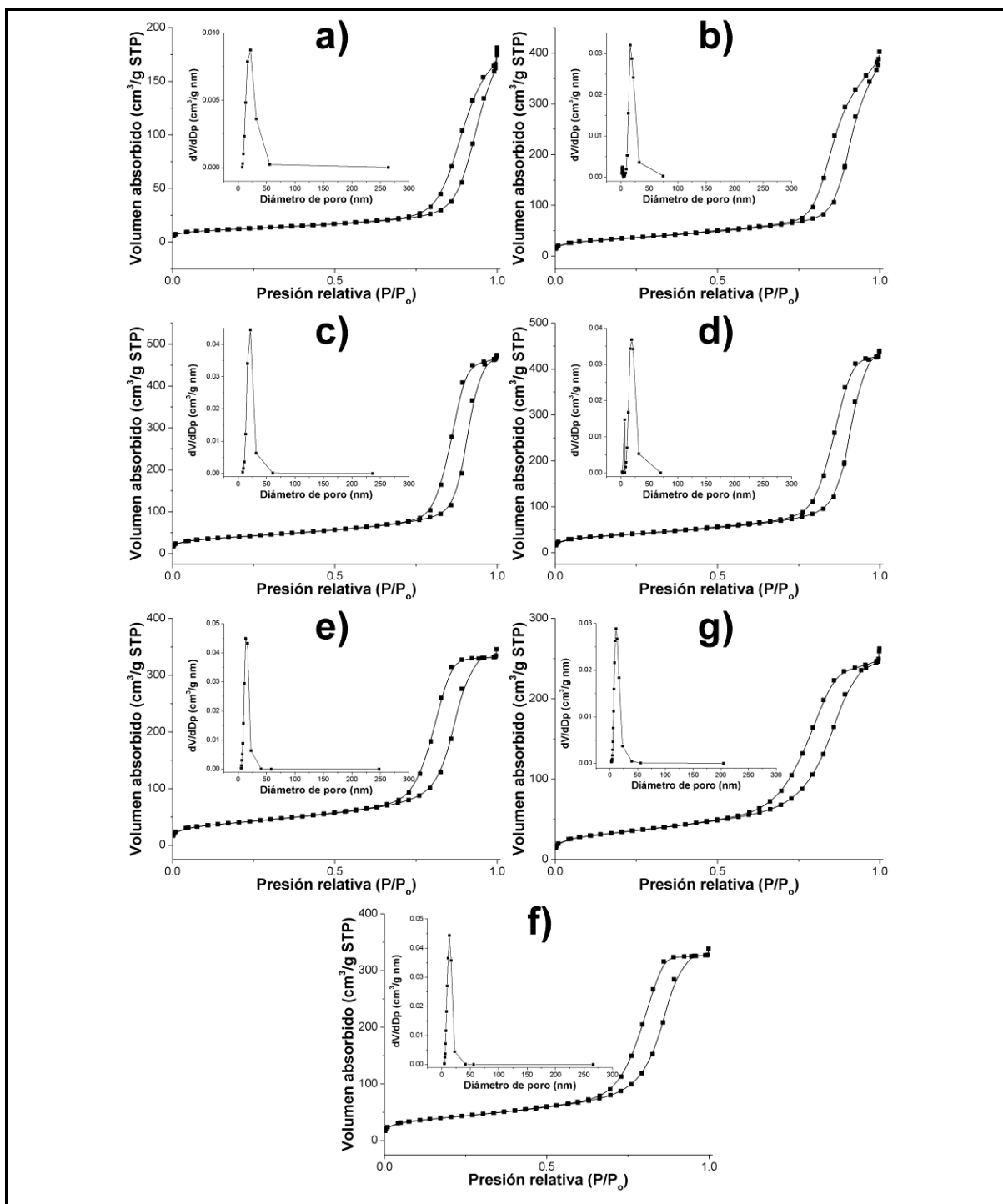
En la Figura 33 se presentan los perfiles de difracción de rayos X a ángulos altos para cada uno de los óxidos de AMX preparados. En el caso del material AM0 (Figura 33a) se puede apreciar la formación de la fase cristalina  $\gamma$  del óxido de aluminio (JCPDS No. 10-0425). La adición de magnesio al material mesoporoso en cualquiera de las proporciones utilizadas, inhibe la formación de dicha fase cristalina. Lo anterior puede indicar que el catión magnesio ingresa a la estructura del óxido base (óxido de aluminio), lo que conlleva a la formación de un óxido mixto, teniendo en cuenta además que no se observa formación de alguna fase cristalina que contenga magnesio. Este tipo de comportamiento en esta clase de materiales ya ha sido observado por otros autores ("International journal of hydrogen energy, 1980," 1980).

**Figura 33.** Perfiles de difracción de rayos X a ángulos altos obtenidos para cada uno de los óxidos preparados: a) Al-3,0N, b) AM5, c) AM10, d) AM15, e) AM20, f) AM25 y g) AM30. Las reflexiones marcadas con  $\blacklozenge$  corresponden a la fase cristalina  $\gamma$  del óxido de aluminio.



En la Figura 34 se presentan las isotermas de adsorción de N<sub>2</sub> a 77 K para cada uno de los óxidos de AMX preparados. Todas las isotermas son de Tipo IV, características de materiales mesoporosos. Así mismo, la forma de la histéresis es Tipo H1 lo cual sugiere la presencia de canales mesoporosos con forma cilíndrica ("International journal of hydrogen energy, 1980," 1980; Leofanti, Padovan, Tozzola, & Venturelli, 1998). Las curvas de distribución de tamaño de poro (inset en cada una de las gráficas de la Figura 34) indican que el tamaño y forma de los poros en cada uno de los materiales preparados es homogénea.

**Figura 34.** Isothermas de adsorción de N<sub>2</sub> para cada uno de los óxidos de: a) Al-3,0N, b) AM5, c) AM10, d) AM15, e) AM20, f) AM25 y g) AM30. Inset: Curva de distribución de tamaño de poro para el respectivo material.



En la Tabla 4.2 se presentan los valores de área superficial, volumen y diámetro de poro para cada uno de los óxidos de AMX preparados y calcinados a 600 °C. Los valores de área superficial están dentro del rango de 42 y 146 m<sup>2</sup>/g, donde el material Al-3,0N fue el que presentó la menor área. La adición de un 5 % de magnesio (material AM5) incrementa el área superficial del material aproximadamente 3 veces en comparación con el que no posee magnesio (AM0). A partir de dicha relación Mg-Al, los valores de área superficial continúan incrementando en cuanto incrementa la cantidad de magnesio, alcanzando un máximo de 146 m<sup>2</sup>/g para el material AM25 (25 % Mg – 75 % Al).

**Tabla 9.** Área superficial, volumen y diámetro de poro de los óxidos mesoporosos de Al(III)-Mg(II) preparados y calcinados a 600 °C.

<b>Muestra</b>	<b>Área superficial<sup>a</sup></b> <b>(m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>Volumen del poro</b> <b>(cm<sup>3</sup>/g)</b>	<b>Diámetro del poro<sup>b</sup></b> <b>(nm)</b>
<b>Al-3,0N</b>	42,0	0,25	17,0
<b>AM5</b>	120	0,56	14,7
<b>AM10</b>	139	0,72	14,0
<b>AM15</b>	135	0,65	14,0
<b>AM20</b>	140	0,51	10,2
<b>AM25</b>	146	0,50	9,6
<b>AM30</b>	120	0,38	9,3

<sup>a</sup> Área superficial BET

<sup>b</sup> Diámetro promedio del poro desorción BJH

En el caso del diámetro de poro hay una relación inversa respecto al área superficial. A medida que incrementa la cantidad de magnesio en la estructura, disminuye el diámetro de poro del material. Por su parte, no se encuentra una relación directa entre el volumen de poro y el área superficial.

### **4.2.3. Impregnación de los óxidos mesoporosos sintetizados con los péptidos Ib-M6 e Ib-A4.**

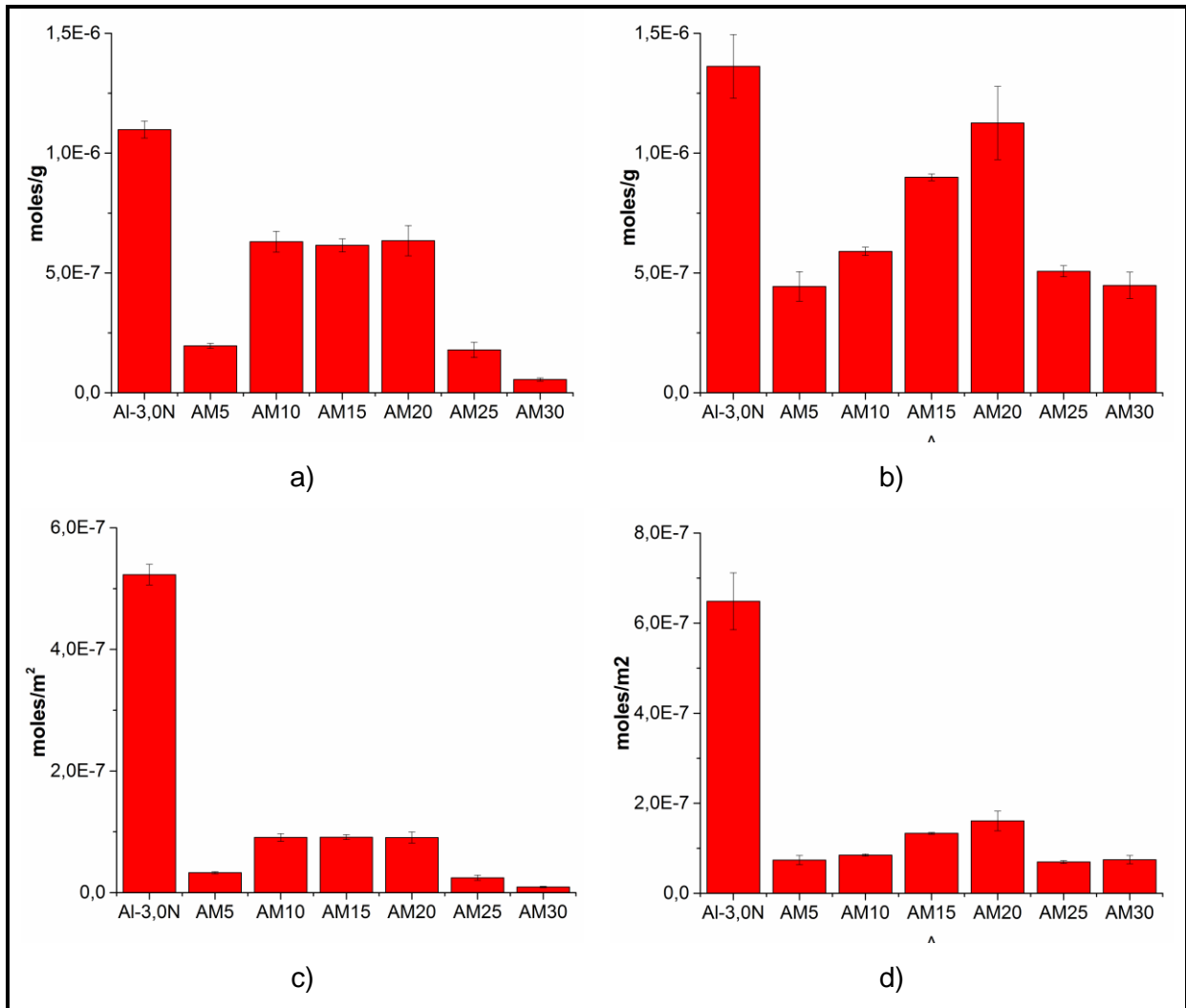
El pH en el cual se realiza la adsorción de las biomoléculas en los materiales mesoporosos es determinante para garantizar las interacciones electrostáticas superficie-biomolécula. Cuando la adsorción se realiza a un valor de pH que se encuentra por debajo del punto isoeléctrico (pI) de la biomolécula pero por encima del potencial de carga cero (pZ) del material se aumentan las interacciones electrostáticas; sin embargo, también se observa un aumento de la repulsión entre las moléculas adsorbidas lo que podría producir una desorción desde el material (Yiu & Wright, 2005). La adsorción superficial de biomoléculas varía de acuerdo a una curva tipo campana, donde el máximo corresponde al pI (Green et al., 2000; Lu et al., 1998). Conociendo este valor es posible realizar una adsorción selectiva de la biomolécula y realizar la desorción al variar el pH de la solución.

Los valores de pI para los péptidos Ib-M6 e Ib-A4 fueron determinados utilizando la herramienta *compute pI/Mw* de la base de datos ExPASy (Artimo et al., 2012), los valores obtenidos son 12,40 y 12,13 respectivamente. Según la literatura el valor de pZ para los óxidos de aluminio se encuentra entre 8 y 9 (Kosmulski, 2009); adicionalmente, Bolognini y colaboradores en el 2002 (Bolognini et al., 2002) reportaron que la mezcla de óxidos de Al/Mg presentan una disminución en la basicidad en comparación con los óxidos puros (MgO y Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Por esta razón, el pH escogido para la inmovilización fue de 10 con el objetivo de garantizar la carga negativa superficial de los materiales sintetizados. Debido a que este valor de pH se encuentra por debajo del pI de los péptidos estos tendrán una carga positiva, de esta manera se garantizaron las interacciones electrostáticas superficie-péptido.

En la Figura 35 se presentan los los datos de moles de péptido/g y moles de péptido/m<sup>2</sup> de los óxidos mesoporosos Al-3,0N y AMX a un pH de 10. Se puede observar que los péptidos Ib-M6 e Ib-A4 fueron absorbidos en todos los materiales sintetizados indicando una posible interacción electrostática entre los péptidos y la superficie de los materiales. El óxido Al-3,0N fue el material en el cual se soportó la mayor cantidad de péptido con un valor de  $1,10 \times 10^{-6}$  mol/g para Ib-M6, lo que corresponde a un porcentaje del 74,4 % (Anexo D). El valor obtenido para el Ib-A4 es de  $1,23 \times 10^{-6}$  mol/g correspondiente a un 83,7 % (Anexo D). Aunque el óxido Al-3,0N presentó un área superficial muy baja en comparación con los

materiales AMX, es posible que presente una carga negativa mayor y por lo tanto una mayor interacción electrostática con los péptidos.

**Figura 35.** Moles de péptido por gramo de óxido mesoporoso obtenidos para a) Ib-M6 e b) Ib-A4 y moles de péptido por m<sup>2</sup> para c) Ib-M6 e d) Ib-A4



Los materiales AM5 y AM30 fueron los que adsorbieron una menor cantidad de los péptidos Ib-M6 e Ib-A4, es probable que esto se encuentre relacionado con la baja área superficial que presentaron estos materiales (Tabla 4.2), en comparación con los demás materiales AMX sintetizados.

#### **4.2.4. Determinación del porcentaje de liberación los péptidos Ib-M6 e Ib-A4 desde los óxidos mesoporosos sintetizados.**

El pH de los medios de cultivo empleados en las pruebas de inhibición contra *Escherichia coli* K-12 y *Moniliophthora roreri* es de 7,4 y 5,6 respectivamente. Con el fin de determinar si a estos valores de pH sería posible la desorción desde la superficie de los óxidos mesoporosos sintetizados, se determinó la carga superficial a pH de 5,6 y 7,4 de cada uno de estos utilizando medidas de potencial zeta.

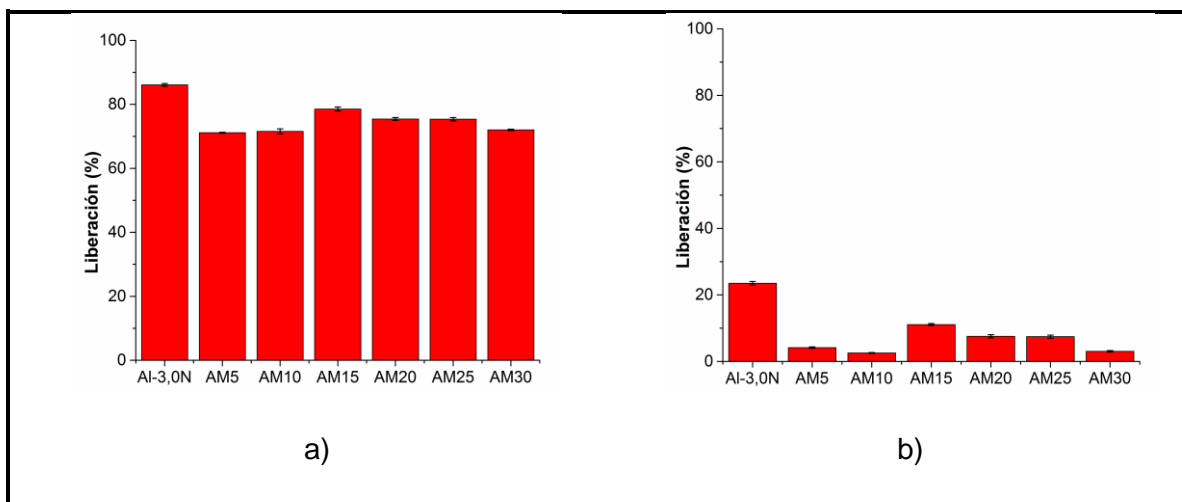
En la Tabla 4.3 se presentan los valores de potencial zeta en mV a pH 5,6 y 7,4 de los óxidos mesoporosos sintetizados. Se puede observar que a pH 5,6 todos los óxidos sintetizados presentan un valor de potencial zeta positivo; mientras que, a pH 7,4 todos los óxidos poseen carga negativa con excepción del material Al-3,0N. Por otro lado, la adición de Mg en cualquier proporción da como resultado potenciales zeta con valores negativos. Adicionalmente se observa que, para ambos valores de pH, la adición de magnesio en la estructura del material disminuye el valor de potencial zeta del mismo. Este resultado se puede relacionar con lo determinado en el análisis de difracción de rayos X a ángulos altos (Figura 32). La inclusión del catión magnesio en la estructura del óxido de aluminio conlleva a una modificación de la basicidad del material, lo cual finalmente afectará la carga superficial (y por lo tanto el potencial zeta) del mismo (Bolognini et al., 2002).

**Tabla 10.** Potencial zeta en mV a pH 7,4 y 5,6 de los óxidos mesoporosos preparados

Muestra	Potencial zeta (mV)	
	pH 5,6	pH 7,4
Al-3,0N	20,3	16,5
AM5	1,22	-0,118
AM10	3,33	-1,71
AM15	7,43	-5,34
AM20	7,87	-5,58
AM25	9,67	-18,9
AM30	10,2	-19,7

En la Figura 36 se presentan los valores de porcentaje de liberación del péptido Ib-A4 e Ib-M6 después de 135 minutos de agitación. En ella se puede apreciar que el péptido Ib-A4 es liberado desde todos los óxidos sintetizados; siendo el material Al-3,0N el que presenta un valor mayor de liberación (83,4 %) debido a que es el que posee un valor de potencial zeta mayor a pH de 5,6.

**Figura 36.** Porcentaje de Liberación del péptido a) Ib-A4 a pH 5,6 e b) Ib-M6 a pH 7,4 desde los óxidos mesoporosos sintetizados después de 135 minutos de agitación.



Por otro lado, a pH de 7,4, en el cual se no se esperaba observar desorción del péptido desde ninguno de los materiales AMX, se observó una liberación pequeña desde todos los materiales con una valor máximo del 11% desde el material AM15 (Figura 36.b), lo cual se deba posiblemente a que las fuerzas de repulsión entre las moléculas de péptido adsorbido superaron las fuerzas de atracción entre el péptido y la superficie permitiendo la desorción de una pequeña cantidad del péptido. Aun así, esto no garantiza un control total sobre la cantidad de péptido liberado en solución y por lo tanto estos materiales no fueron utilizados para las pruebas de inhibición contra *Escherichia coli K-12*.

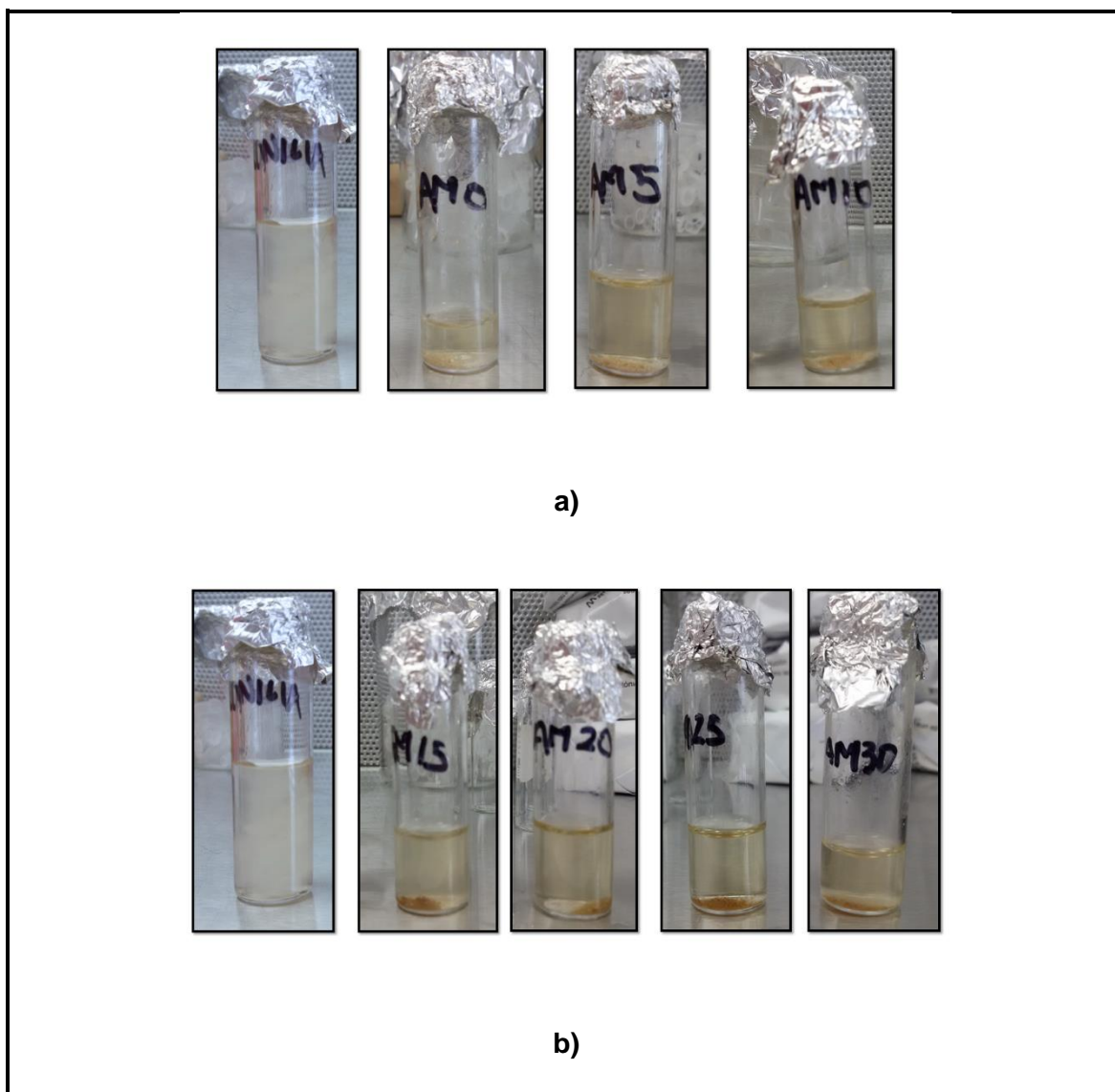
El material Al-3,0N, el cual es el único de los óxidos mesoporosos sintetizados que presenta una carga positiva a pH 7,4, solo libera el 23,9% del péptido Ib-M6 lo cual no es suficiente para alcanzar la CMI del péptido (1  $\mu$ M). Por lo tanto, este material también fue descartado para la realización de las pruebas de inhibición contra *Escherichia coli K-12*.

#### **4.2.5. Determinación de la actividad antifúngica contra *Moniliophthora roreri* del péptido Ib-A4 atrapados en los óxidos mesoporosos preparados.**

Después de permitir el crecimiento de *M roreri* durante 7 días y en presencia de los materiales mesoporosos impregnados con el péptido Ib-A4 no fue posible observar crecimiento micelial lo que indica que los procesos de adsorción y desorción de los péptidos

no afectaron su actividad antifúngica, lo que convierte a estos materiales en buenos candidatos para la inmovilización y posterior liberación controlada del péptido Ib-A4.

**Figura 37.** Crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en presencia de los materiales mesoporosos a) Al-3,0N, AM5, AM10, b) AM15, AM20, AM25 y AM30, todos los materiales se encontraban impregnados con el péptido Ib-A4.



### 4.3. CONCLUSIONES.

Los óxidos mesoporosos de Al(III)-Mg(II) fueron sintetizados utilizando 2,97 moles de HNO<sub>3</sub> y P123 como agente director de la estructura. Bajo las condiciones de síntesis empeladas se obtuvieron óxidos mixtos de Al(III)-Mg(II) con una distribución de tamaño de poro homogénea y un área superficial entre 42 y 146 m<sup>2</sup>/g.

La impregnación de los péptidos Ib-A4 e Ib-M6 se realizó a un pH de 10 con el fin de garantizar la carga negativa de los óxidos mesoporosos sintetizados. El óxido mesoporoso de aluminio, denominado Al-3,0N, fue el óxido en el cual se logró la máxima adsorción de los péptidos con porcentajes de retención del 74,4 % para Ib-M6 y 83,7 % para Ib-A4.

Los valores de pH empleados para la liberación de los péptidos Ib-A4 e Ib-M6 soportados en los óxidos mesoporosos sintetizados fueron de 5,6 y 7,4, los cuales corresponden a los valores de pH de los medios de cultivo de *Escherichia coli K-12* y *Moniliophthora roreri* (Cif & Par). A pH de 5,6 todos los óxidos mesoporosos sintetizados presentan un valor de carga superficial positivo que garantiza la desorción del péptido Ib-A4 a este pH. El óxido mesoporoso Al-3,0N fue el que presentó un mayor valor de liberación del péptido con un porcentaje de 83,4 %. Con base en esto se puede afirmar que estos materiales pueden ser utilizados como sistemas de liberación del péptido Ib-A4 ya que la actividad antifúngica del péptido no se ve afectada por los procesos de adsorción-desorción.

A pH 7,4 todos los óxidos mesoporosos sintetizados, con excepción del Al-3,0N, presentan un valor de potencial zeta negativo por lo que no es posible asegurar una desorción completa del péptido Ib-M6 a este valor de pH. Los valores de liberación que se presentan a este pH se deben a procesos de repulsión de cargas entre las moléculas de péptido en el interior de los poros, por lo que no se puede realizar un control total de la desorción de esta biomolécula en estos materiales.

Aunque se observa desorción del péptido Ib-M6 a pH 7,4 desde el óxido Al-3,0N (23,9%), la cantidad de moles desorbidas no son suficientes para obtener una concentración de 1 μM en el volumen del ensayo de actividad antibacteriana contra *E. coli*.

---

#### 4.4. REFERENCIAS.

- Aapptec. (n.d.). *Practical synthesis guide to solid phase peptide chemistry*.
- Addorisio, V., Esposito, S., & Sannino, F. (2010). Sorption capacity of mesoporous metal oxides for the removal of MCPA from polluted waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5011–5016.
- Alves, M. H., Jensen, B. E. B., Smith, A. a a, & Zelikin, A. N. (2011). Poly(vinyl alcohol) physical hydrogels: New vista on a long serving biomaterial. *Macromolecular Bioscience*, 11(10), 1293–1313. <http://doi.org/10.1002/mabi.201100145>
- Amatani, T., Nakanishi, K., Hirao, K., & Kodaira, T. (2005). Monolithic Periodic Mesoporous Silica with Well-Defined Macropores Monolithic Periodic Mesoporous Silica with Well-Defined Macropores. *Chemistry of Materials*, 17(March), 2114–2119. <http://doi.org/10.1021/cm048091c>
- Antonio, P. P. (2013). *Silicatos y alúminosilicatos mesoporosos funcionalizados como catalizadores en reacciones de interés en química fina*. Universidad de Córdoba.
- Arbelaez, L. (2010). *Análisis de la diversidad intraespecie de Moniliophthora roreri por medio de marcadores morfológicos y genéticos*. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/1938/1/43276997.20101.pdf>
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., ... Stockinger, H. (2012). EXPASy: SIB bioinformatics resource portal. Retrieved from <http://www.expasy.org/>
- Ayala Benítez, M. F. (2008). *Manejo integrado de moniliasis (Moniliophthora roreri) en el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.) mediante el uso de fungicidas, combinado con labores culturales*. Escuela superior politecnica del litoral.
- Benoiton, N. L. (2006). *Chemistry of peptide synthesis*. Boca Raton.
- Beveridge, T. J. (1999). Structure of fram-negative cell walls and their derived mebrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, 181(16), 4725–4733.
- Bisht, G. S., Rawat, D. S., Kumar, A., Kumar, R., & Pasha, S. (2007). Antimicrobial activity of rationally designed amino terminal modified peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(15), 4343–6. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.05.015>
- Blanco-Labra, A., & Aguirre Mancilla, C. (2002). Proteínas Involucradas en los mecanismos de defensa de plantas. *Acta Universitaria*, 12(3), 31–43.
- Bolognini, M., Cavani, F., Scagliarini, D., Flego, C., Perego, C., & Saba, M. (2002). Heterogeneous basic catalysts as alternatives to homogeneous catalysts: reactivity of Mg/Al mixed oxides in the alkylation of m-cresol with methanol. *Catalysis Today*, 75(1-4), 103–111. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(02\)00050-0](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(02)00050-0)
- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28(8), 799–808. <http://doi.org/10.1002/bies.20441>
- Brogden, K. a. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 238–50. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Carlos Andres, R. V. (2011). *Síntesis y determinación estructural de péptidos derivados de*

- 
- Dermaseptina con actividad antileishmanial*. Universidad Nacional de Colombia-sede Medellin.
- Chacón Almeyda, A. V. (2014). *Evaluación In Vitro de la actividad antifúngica contra Moniliophthora roreri(Cif. y Par.) Evans Et al. de extratos obtenidos de Justicia secunda Vahl*. Universidad Industrial de Santander.
- Chan, W., & White, P. (2000). *Fmoc solid phase peptide synthesis*. New York: OXFORD University Press. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300043056>
- Chen, Y., Mant, C. T., Farmer, S. W., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2005). Rational Design of  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity / Therapeutic Index \*, *280(13)*, 12316–12329. <http://doi.org/10.1074/jbc>.
- Cho, S. H., Oh, S. H., & Lee, J. H. (2005). Fabrication and characterization of porous alginate/polyvinyl alcohol hybrid scaffolds for 3D cell culture. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, *16(8)*, 933–947. <http://doi.org/10.1163/1568562054414658>
- Contreras, L. Y. S., & Riaño, A. L. R. (2013). Aislamiento de microorganismos para control biológico de moniliophthora roreri. *Acta Agronomica*, *62*, 370–378.
- Das, S. K., Kapoor, S., Yamada, H., & Bhattacharyya, A. J. (2009). Effects of surface acidity and pore size of mesoporous alumina on degree of loading and controlled release of ibuprofen. *Microporous and Mesoporous Materials*, *118(1-3)*, 267–272. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.08.042>
- Davis, M. E. (2002). Ordered porous materials for Emerging Applications. *Nat*, *417(June)*, 813–821.
- De Queiroz, Á. a. a., Passos, E. D., De Brito Alves, S., Silva, G. S., Higa, O. Z., & Vítolo, M. (2006). Alginate–poly(vinyl alcohol) core–shell microspheres for lipase immobilization. *Journal of Applied Polymer Science*, *102(2)*, 1553–1560. <http://doi.org/10.1002/app.23444>
- Degim, I. T., & Celebi, N. (2007). Controlled delivery of peptides and proteins. *Current Pharmaceutical Design*, *13(1)*, 99–117. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17266590>
- Dongyuan, Z., Jianglin, F., Qisheng, H., Nicholas, M., Glenn H., F., Bradley F., C., & Galen D., S. (1998). Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science*, *279(5350)*, 548–552. <http://doi.org/10.1126/science.279.5350.548>
- Espinal G, C. F., Martínez C, H. J., & Peña M, Y. (2005). *La cadena del cacao en Colombia. Una mirada golbal de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de trabajo No. 92*.
- Everett, D. H. (1972). Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units, Appendix II: Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry. (D. H. Everett, Ed.)*Pure and Applied Chemistry*. London. <http://doi.org/10.1351/pac197231040577>
- Fogueri, L. R., & Singh, S. (2009). Smart polymers for controlled delivery of proteins and peptides: a review of patents. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, *3(1)*, 40–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19149728>

- Garcia, M. I., & Le Bouguéneq, C. (1996). Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic *Escherichia coli*. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 94(3), 201–236. [http://doi.org/10.1016/S0020-2452\(97\)86017-4](http://doi.org/10.1016/S0020-2452(97)86017-4)
- Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents : mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 501–517.
- Glukhov, E., Stark, M., Burrows, L. L., & Deber, C. M. (2005). Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33960–33967. <http://doi.org/10.1074/jbc.M507042200>
- Green, R. J., Frazier, R. A., Shakesheff, K. M., Davies, M. C., Roberts, C. J., & Tendler, S. J. (2000). Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials*, 21(18), 1823–1835. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00077-6](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00077-6)
- Guerrero, R. C. (2010). *Desarrollo de materiales porosos para la sorción de CO2*. Instituto Politécnico Nacional.
- Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., & Monte, F. (2008). Ice-Templated Materials : Sophisticated Structures Exhibiting Enhanced Functionalities Obtained after Unidirectional Freezing. *Chemical Materials*, 20(3), 634–648.
- Gutiérrez, M. C., García-Carvajal, Z. Y., Jobbágy, M., Rubio, F., Yuste, L., Rojo, F., ... del Monte, F. (2007). Poly(vinyl alcohol) Scaffolds with Tailored Morphologies for Drug Delivery and Controlled Release. *Advanced Functional Materials*, 17(17), 3505–3513. <http://doi.org/10.1002/adfm.200700093>
- Guzmán, F., Marshall, S., Ojeda, C., Albericio, F., & Carvajal-Rondanelli, P. (2013). Inhibitory effect of short cationic homopeptides against Gram-positive bacteria. *Journal of Peptide Science*, 19(October), 792–800. <http://doi.org/10.1002/psc.2578>
- Han, C., Li, H., Pu, H., Yu, H., Deng, L., Huang, S., & Luo, Y. (2013). Synthesis and characterization of mesoporous alumina and their performances for removing arsenic(V). *Chemical Engineering Journal*, 217, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2012.11.087>
- Hancock, R. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters*, 206(2), 143–149. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00480-3](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00480-3)
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.04.013>
- Haney, E. F., Petersen, A. P., Lau, C. K., Jing, W., Storey, D. G., & Vogel, H. J. (2013). Mechanism of action of puoroindoline derived tryptophan-rich antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(8), 1802–1813. <http://doi.org/10.1016/j.bbmem.2013.03.023>
- Helmerhorst, E. J., Reijnders, I. M., van 't Hof, W., Veerman, E. C., & Nieuw Amerongen, A. V. (1999). A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Letters*, 449(2-3), 105–110. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10338113>

- 
- Hicks, R. W., Castagnola, N. B., Zhang, Z., Pinnavaia, T. J., & Marshall, C. L. (2003). Lathlike mesostructured  $\gamma$ -alumina as a hydrodesulfurization catalyst support, 254, 311–317. [http://doi.org/10.1016/S0926-860X\(03\)00476-9](http://doi.org/10.1016/S0926-860X(03)00476-9)
- International journal of hydrogen energy, 1980. (1980). *International Journal of Hydrogen Energy*. [http://doi.org/10.1016/0360-3199\(80\)90035-X](http://doi.org/10.1016/0360-3199(80)90035-X)
- Jaimes Suárez, Y., & Aranzazu Hernández, F. (2010). *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L) en Colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora roreri)*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA.
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511. <http://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>
- Jiang, Z., Vasil, A. I., Hale, J. D., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2008). Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic  $\alpha$ -helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 90(3), 369–383. <http://doi.org/10.1002/bip.20911>
- Jofré, C., Guzmán, F., Cárdenas, C., Albericio, F., & Marshall, S. H. (2011). A natural peptide and its variants derived from the processing of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) displaying enhanced antimicrobial activity: A novel alternative for the control of bacterial diseases. *Peptides*, 32, 852–858. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.026>
- Johansson, E. M., Córdoba, J. M., & Odén, M. (2009). Synthesis and characterization of large mesoporous silica SBA-15 sheets with ordered accessible 18 nm pores. *Materials Letters*, 63(24-25), 2129–2131. <http://doi.org/10.1016/j.matlet.2009.07.013>
- Kapoor, S., Hegde, R., & Bhattacharyya, A. J. (2009). Influence of surface chemistry of mesoporous alumina with wide pore distribution on controlled drug release. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 140(1), 34–9. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.07.015>
- Kent, S. B. (1988). Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 57(1), 957–89. <http://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.004521>
- Kosmulski, M. (2009). Compilation of PZC and IEP of sparingly soluble metal oxides and hydroxides from literature. *Advances in Colloid and Interface Science*, 152(1-2), 14–25. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2009.08.003>
- Kresge, C. T., & Roth, W. J. (2013). The discovery of mesoporous molecular sieves from the twenty year perspective. *Chemical Society Reviews*, 42(9), 3663–70. <http://doi.org/10.1039/c3cs60016e>
- Krstic, V. (2005, October 26). Catalizadores de Rh-soportado y su aplicación en la hidrogenación de crotonaldehído. Universidad de Cantabria. Retrieved from <http://www.tdx.cat/handle/10803/10685>
- Lee, D., Shin, S., Kim, D., Seo, M., & Kang, J. (1999). Antifungal mechanism of a cysteine-rich antimicrobial peptide, Ib-AMP1, from *Impatiens balsamina* against *Candida albicans*. *Biotechnology ...*, 1047–1050. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1005636610512>
- Leofanti, G., Padovan, M., Tozzola, G., & Venturelli, B. (1998). Surface area and pore texture of catalysts. *Catalysis Today*, 41(1-3), 207–219. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(98\)00050-9](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(98)00050-9)

- Li, W., & Zhao, D. (2013). An overview of the synthesis of ordered mesoporous materials. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 49(10), 943–6. <http://doi.org/10.1039/c2cc36964h>
- Llop Hernández, A., Valdés-Dapena Vivanco, M. M., & Zuazo Silva, J. L. (2001). *Microbiología y parasitología médicas*. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
- Lloyd-Williams, P. (1997). *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. New directions in organic and biological chemistry CN - QP551 .L56 1997*. Boca Raton: CRC Press.
- Lozada, B. S., Herrera, L. V., Perea, J. A., Stashenko, E., & Escobar, P. (2012). Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de Lippia sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 61(2), 102–110.
- Lu, J. R., Su, T. J., Thirtle, P. N., Thomas, R. K., Rennie, A. R., & Cubitt, R. (1998). The Denaturation of Lysozyme Layers Adsorbed at the Hydrophobic Solid/Liquid Surface Studied by Neutron Reflection. *Journal of Colloid and Interface Science*, 206(1), 212–223. <http://doi.org/10.1006/jcis.1998.5680>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., & Gacto Fernández, M. (2004). *Brock biología de los microorganismos*. México: Prentice Hall Hispanoamericana.
- Márquez-Alvarez, C., Žilková, N., Pérez-Pariente, J., & Čejka, J. (2008). Synthesis, Characterization and Catalytic Applications of Organized Mesoporous Aluminas. *Catalysis Reviews*, 50(2), 222–286. <http://doi.org/10.1080/01614940701804042>
- Marr, A. K., Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(5), 468–72. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.006>
- Matsuura, S., Ishii, R., Itoh, T., Hanaoka, T., Hamakawa, S., Tsunoda, T., & Mizukami, F. (2010). Direct visualization of hetero-enzyme co-encapsulated in mesoporous silicas. *Microporous and Mesoporous Materials*, 127(1-2), 61–66. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.06.029>
- Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1462(1-2), 1–10. [http://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00197-2](http://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00197-2)
- McGinity, J. W., & Felton, L. A. (2008). *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical disage forms*. (J. W. McGinity & L. A. Felton, Eds.) (Third edit). New York.
- Meincken, M., Holroyd, D. L., & Rautenbach, M. (2005). Atomic Force Microscopy Study of the Effect of Antimicrobial Peptides on the Cell Envelope of *Escherichia coli*. *Society*, 49(10), 4085–4092. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4085>
- Miyahara, M., Vinu, A., & Ariga, K. (2007). Adsorption myoglobin over mesoporous silica molecular sieves: Pore size effect and pore-filling model. *Materials Science and Engineering: C*, 27(2), 232–236. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.012>
- Muschert, S., Siepman, F., Leclercq, B., Carlin, B., & Siepman, J. (2009). Drug release mechanisms from ethylcellulose: PVA-PEG graft copolymer-coated pellets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.12.007>

- Navarre, W. W., & Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 63(1), 174–229. [http://doi.org/1092-2172/99/\\$04.00+0](http://doi.org/1092-2172/99/$04.00+0)Barnett, Timothy C.
- Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 464–472. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>
- Niesz, K., Yang, P., & Somorjai, G. a. (2005). Sol-gel synthesis of ordered mesoporous alumina. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, (15), 1986–1987. <http://doi.org/10.1039/b419249d>
- Oficial, G., & Divulga, I. (2005). El control de la moniliasis en el cacao, 23–26.
- Orth, D., Grif, K., Zimmerhackl, L. B., & Würzner, R. (2008). Prevention and treatment of enterohemorrhagic Escherichia coli infections in humans. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 6(1), 101–108. <http://doi.org/10.1586/14787210.6.1.101>
- Pennington, M. W., & Dunn, B. M. (1994). Peptide Synthesis Protocols (In: Methods Mol. Biol. 1994, 35). <http://doi.org/10.1385/0896032736>
- Perullini, A. (2009). *Síntesis de materiales inorgánicos con porosidad controlada para la inmovilización de células: aplicaciones en biorreactores*. Retrieved from [http://bldigital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_4413\\_Perullini.pdf](http://bldigital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4413_Perullini.pdf)
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78–82. [http://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70024-X](http://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70024-X)
- Postgate, J. R., Crumpton, J. E., & Hunter, J. R. (1961). The measurement of bacterial viabilities by slide culture. *Journal of General Microbiology*, 24(1954), 15–24. <http://doi.org/10.1099/00221287-24-1-15>
- Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J. A., & Piedrola-Angulo, G. (1987). *Microbiología y parasitología médica*. Barcelona: Salvat.
- Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(6), 536–47. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>
- Reyes, R. E., Ramírez Saad, H., Solís Galicia, C., Ortiz Herrera, M., & Coria Jiménez, R. (2009). Mecanismos involucrados en la variabilidad del antígeno O de bacterias Gram negativas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 52, 32–43.
- Rink, H. (1987). Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Letters*, 28(33), 3787–3790. [http://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)96384-6](http://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)96384-6)
- Robens, E., Dabrowski, A., & Kutarov, V. V. (2004). Comments on surface structure analysis by water and nitrogen adsorption. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 76(2), 647–657. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000221460800030
- Robinson, J. R. (1978). *Sustained and controlled release drug delivery systems* (Vol. 6). M. Dekker.
- Rodríguez, E. (2006). Técnica de reducción de inóculo para controlar la Moniliasis del cacao en Santander. *Revista Corpoica*, 4(4), 68–78. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Técnica+de+reducci>

- 
- ón+de+inoculo+para+controlar+la+Moniliasis+del+cacao+en+Santander#0
- Saldarriaga, Y., & Pineda, F. (2001). *Aislamiento de hongos fitopatógenos. Manual de micología aplicada*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Schlossbauer, A., Schaffert, D., Kecht, J., Wagner, E., & Bein, T. (2008). Click Chemistry for High-Density Biofunctionalization of Mesoporous Silica. *Journal of the American Chemical Society*, 130(38), 12558–12559. <http://doi.org/10.1021/ja803018w>
- Slowing, I. I., Trewyn, B. G., & Lin, V. S.-Y. (2007). Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Delivery of Membrane-Impermeable Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 129(28), 8845–8849. <http://doi.org/10.1021/ja0719780>
- Soler-Illia, G. J. D. a a, Sanchez, C., Lebeau, B., & Patarin, J. (2002). Chemical strategies to design textured materials: From microporous and mesoporous oxides to nanonetworks and hierarchical structures. *Chemical Reviews*, 102(11), 4093–4138. <http://doi.org/10.1021/cr0200062>
- Suhrenbrock, L., Radtke, G., Knop, K., & Kleinebudde, P. (2011). Suspension pellet layering using PVA-PEG graft copolymer as a new binder. *International Journal of Pharmaceutics*. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.061>
- Taylor, R. H., Acland, D. P., Attenborough, S., Cammue, B. P., Evans, I. J., Osborn, R. W., ... Broekaert, W. F. (1997). A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(39), 24480–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9305910>
- Tang, E. S. K., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2005). Coating of multiparticulates for sustained release. *American Journal of Drug Delivery*.
- Tantirungrotechai, J., Chotmongkolsap, P., & Pohmakotr, M. (2010). Synthesis, characterization, and activity in transesterification of mesoporous Mg–Al mixed-metal oxides. *Microporous and Mesoporous Materials*, 128(1-3), 41–47. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.08.001>
- Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, 51(2), 149–77. <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>
- Thevissen, K., François, I. E. J. a, Sijtsma, L., van Amerongen, A., Schaaper, W. M. M., Meloen, R., ... Cammue, B. P. a. (2005). Antifungal activity of synthetic peptides derived from *Impatiens balsamina* antimicrobial peptides Ib-AMP1 and Ib-AMP4. *Peptides*, 26(7), 1113–9. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.01.008>
- Thevissen, K., Ghazi, A., Samblanx, W. De, Brownlee, C., Rupert, W., & Broekaert, W. F. (1996). Fungal Membrane Responses Induced by Plant Defensins and Thionins. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 15018–15025. <http://doi.org/10.1074/jbc.271.25.15018>
- Vaara, M., & Nurminen, M. (1999). Outer Membrane Permeability Barrier in *Escherichia coli* Mutants That Are Defective in the Late Acyltransferases of Lipid A Biosynthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), 1459–1462. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89296/>
- Vallet-Regi, M., Rámila, A., del Real, R. P., & Pérez-Pariente, J. (2001). A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. *Chemistry of Materials*, 13(2), 308–311.

---

<http://doi.org/10.1021/cm0011559>

- van der Kraan, M. I. a, van der Made, C., Nazmi, K., van't Hof, W., Groenink, J., Veerman, E. C. I., ... Nieuw Amerongen, A. V. (2005). Effect of amino acid substitutions on the candidacidal activity of LFampin 265-284. *Peptides*, 26(11), 2093–7. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.03.056>
- van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., & Anderson, M. a. (2013). Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 70(19), 3545–70. <http://doi.org/10.1007/s00018-013-1260-1>
- Vásquez, L. E., Guzmán, F., Patarroyo, M. E., & Arango, R. (2009). IN VITRO EVALUATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES AGAINST *Mycosphaerella fijiensis* MORELET AND THEIR INTERACTION WITH SOME CHEMICAL FUNGICIDES. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*.
- Velandía, A., Santiago, J., Esteban, C., & Teresa, M. (2008). *Moniliophthora roreri* EN CACAO *Theobroma cacao* L., 1–3.
- Wan, Y., & Zhao, D. (2007). On the controllable soft-templating approach to mesoporous silicates. *Chemical Reviews*, 107(7), 2821–60. <http://doi.org/10.1021/cr068020s>
- Wang, P., Bang, J.-K., Kim, H. J., Kim, J.-K., Kim, Y., & Shin, S. Y. (2009). Antimicrobial specificity and mechanism of action of disulfide-removed linear analogs of the plant-derived Cys-rich antimicrobial peptide Ib-AMP1. *Peptides*, 30(12), 2144–9. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.09.020>
- Wang, S. (2009). Ordered mesoporous materials for drug delivery. *Microporous and Mesoporous Materials*, 117(1-2), 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.07.002>
- Wang, Y., Noguchi, M., Takahashi, Y., & Ohtsuka, Y. (2001). Synthesis of SBA-15 with different pore sizes and the utilization as supports of high loading of cobalt catalysts. *Catalysis Today*, 68(1-3), 3–9. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(01\)00317-0](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(01)00317-0)
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Xu, L., Song, H., & Chou, L. (2012). One-Pot Synthesis of Ordered Mesoporous NiO – CaO – Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Composite Oxides for Catalyzing CO<sub>2</sub> Reforming of CH<sub>4</sub>.
- Yau, W. M., Wimley, W. C., Gawrisch, K., & White, S. H. (1998). The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry*, 37(42), 14713–14718.
- Yiu, H. H. P., & Wright, P. a. (2005). Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic–organic hybrid. *Journal of Materials Chemistry*, 15(35-36), 3690. <http://doi.org/10.1039/b506090g>
- Yuan, Q., Yin, A.-X., Luo, C., Sun, L.-D., Zhang, Y.-W., Duan, W.-T., ... Yan, C.-H. (2008). Facile synthesis for ordered mesoporous gamma-aluminas with high thermal stability. *Journal of the American Chemical Society*, 130(11), 3465–3472. <http://doi.org/10.1021/ja0764308>
- Zhang, H., & Cooper, A. I. (2007). Aligned porous structures by directional freezing. *Advanced Materials*, 19(11), 1529–1533. <http://doi.org/10.1002/adma.200700154>
- 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. <http://doi.org/10.1074/jbc.M104925200>

Zhang, Y., Chan, H. F., & Leong, K. W. (2013). Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 104–20. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.003>

Zinieris, N., Leondiadis, L., & Ferderigos, N. (2005). Nalpha-Fmoc removal from resin-bound amino acids by 5% piperidine solution. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 7(1), 4–6. <http://doi.org/10.1021/cc049872d>

## **CAPITULO 5**

### **CONCLUSIONES GENERALES**

*"Soy de las que piensa que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es solo un técnico, es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas"*

*Marie Curie*

## CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo de investigación se utilizó la síntesis en fase sólida para la obtención de 12 péptidos análogos al péptido antifúngico Ib-AMP4, los cuales presentaban modificaciones en la carga y la hidrofobicidad del C-terminal. Además, los puentes disulfuro característicos del péptido Ib-AMP4 fueron removidos al eliminar los residuos de cisteína de la secuencia, lográndose de esta manera la disminución de los subproductos obtenidos durante la síntesis.

Con estas modificaciones realizados se obtuvieron análogos con actividad antimicrobial contra *Escherichia coli K-12* y *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) superior a la presentada por el péptido Ib-AMP4.

El péptido denominado Ib-M6 presenta valores de CMI y CMB de 1 y 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente, contra *Escherichia coli K-12*. Mientras que el péptido denominado Ib-A4 presenta un valor de CMI de 1  $\mu\text{M}$  contra *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) y un porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del 75 %. Estos péptidos no presentan actividad hemolítica contra eritrocitos humanos a los valores de CMI, lo cual los convierte en buenos candidatos para el tratamiento de las enfermedades producidas por estos microorganismos.

Para la encapsulación de los péptidos Ib-A4 e Ib-M6 en pellets de PVA se utilizó el método ISISA que permitió un control sobre la estructura a partir de la variación de la concentración total de PVA en la solución precursora. A mayor concentración de polímero se obtienen estructuras definidas con microcanales alineados de manera radial.

Al variar la cantidad total de PVA y la relación de masas de PVA con diferentes pesos moleculares fue posible controlar la velocidad de hidratación de los pellets. De esta manera se logró un control en la liberación de compuestos como el cristal violeta y los péptidos Ib-A4 e Ib-M6 durante un periodo de 60 minutos con los pellets denominados 50P25.

La encapsulación de los péptidos Ib-A4 e Ib-M6 en los pellets 50P25 no afectó la actividad antimicrobial contra *Escherichia coli K-12* y *Moniliophthora roreri* (Cif & Par). Además, no se observó ningún efecto negativo en el crecimiento de los microorganismos por la presencia del PVA, lo que implica que a partir de estos sistemas pueden desarrollarse potenciales aplicaciones farmacológicas.

Finalmente, se prepararon óxidos mesoporosos de Al(III)-Mg(II). Estos óxidos fueron sintetizados utilizando 2,97 moles de HNO<sub>3</sub> y como agente director de la estructura el co-polímero P-123. De esta manera, se obtuvieron óxidos mixtos de Al(III)-Mg(II) con una distribución de tamaño de poro homogénea y un área superficial entre 42 y 146 m<sup>2</sup>/g.

Durante el proceso de impregnación de los péptidos Ib-A4 e Ib-M6 la carga superficial de los óxidos mesoporosos se mantuvo en un valor negativo utilizando un valor de pH de impregnación de 10. De esta manera se favoreció la interacción electrostática con las cargas positivas del péptido.

El óxido mesoporoso denominado Al-3,0N, fue el óxido en el cual se logró la máxima adsorción de los péptidos con porcentajes de retención del 74,4 % para Ib-M6 y 83,7 % para Ib-A4.

Para la liberación de los péptidos desde los óxidos mesoporosos sintetizados se emplearon valores de pH de 5,6 para el péptido Ib-A4 y 7,4 para el péptido Ib-M6. Estos valores de pH corresponden a los valores de pH de los medios de cultivo de *Escherichia coli K-12* y *Moniliophthora roreri (Cif & Par)*.

Fue posible la desorción del péptido Ib-A4 a un pH de 5,6, debido a que a este valor de pH todos los óxidos mesoporosos sintetizados presentan un valor de carga superficial positivo que garantiza la desorción del péptido. El óxido mesoporoso Al-3,0N presentó un mayor valor de liberación del péptido Ib-A4 con un porcentaje de 83,4 %. Por lo tanto, este material puede ser utilizado como sistema de liberación del péptido Ib-A4 ya que la actividad antifúngica del péptido no se ve afectada por los procesos de adsorción-desorción.

No fue posible controlar, a pH de 7,4, la desorción del péptido Ib-M6 desde los óxidos mesoporosos sintetizados debido a que a este valor de pH todos los óxidos mesoporosos sintetizados presentan un valor de carga superficial negativo. Aunque es posible observar una pequeña liberación del péptido Ib-M6 esto se debe a procesos de repulsión de cargas entre las moléculas de péptido en el interior de los poros, por lo que no se puede realizar un control total de la desorción de esta biomolécula en estos materiales.

## **CAPITULO 6**

### **RECOMENDACIONES**

*"En la vida no hay cosas que temer, solo cosas que comprender"*

*Marie Curie*

## RECOMENDACIONES

A continuación se presentan una serie de recomendaciones propuestas con el fin de complementar los resultados obtenidos, mejorar las propiedades de los péptidos y los materiales obtenidos o iniciar nuevos trabajos en el área de los biomateriales.

Determinar la estructura secundaria de los péptidos análogos sintetizados utilizando técnicas como dicroísmo circular o espectroscopia infrarroja (IR).

Realizar biotinyación de los péptidos análogos sintetizados y con ayuda de un microscopio de fluorescencia determinar si estos péptidos interactúan solo con la membrana celular o son interiorizados por las células de *E. coli* y *M. roreri*. De esta manera se daría un primer paso para determinar el mecanismo de acción de estos compuestos.

Escoger blancos moleculares de *Escherichia coli* K-12 y realizar acoplamiento molecular con las secuencias de los péptidos análogos sintetizados con el fin de determinar el mecanismo de acción de estos péptidos.

Realizar estudios de actividad antibacteriana de los análogos Ib-M contra otras bacterias gram-negativas y gram-positivas de importancia clínica.

Realizar estudios de actividad antifúngica de los análogos Ib-A contra otros hongos fitopatógenos de importancia para Colombia.

Preparar monolitos de PVA variando la concentración y relación de peso molecular de polímero. De esta manera se pueden obtener matrices más grandes que permitan la cuantificación de la cantidad de péptido liberado.

Modificar químicamente la superficie de los óxidos mesoporosos de Al(III)-Mg(II) preparados, incluyendo grupos funcionales que permitan tener un mayor control sobre la carga superficial de los materiales.

Modificar las condiciones de preparación de los óxidos mesoporosos de Al(III)-Mg(II) preparados en este trabajo, con el fin de obtener mayores áreas superficiales.

## BIBLIOGRAFÍA PRESENTADA EN ESTE LIBRO

## BIBLIOGRAFIA INTRODUCCIÓN

- Aapptec. (n.d.). *Practical synthesis guide to solid phase peptide chemistry*.
- Addorisio, V., Esposito, S., & Sannino, F. (2010). Sorption capacity of mesoporous metal oxides for the removal of MCPA from polluted waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5011–5016.
- Alves, M. H., Jensen, B. E. B., Smith, A. a a, & Zelikin, A. N. (2011). Poly(vinyl alcohol) physical hydrogels: New vista on a long serving biomaterial. *Macromolecular Bioscience*, 11(10), 1293–1313. <http://doi.org/10.1002/mabi.201100145>
- Amatani, T., Nakanishi, K., Hirao, K., & Kodaira, T. (2005). Monolithic Periodic Mesoporous Silica with Well-Defined Macropores Monolithic Periodic Mesoporous Silica with Well-Defined Macropores. *Chemistry of Materials*, 17(March), 2114–2119. <http://doi.org/10.1021/cm048091c>
- Antonio, P. P. (2013). *Silicatos y alúminosilicatos mesoporosos funcionalizados como catalizadores en reacciones de interés en química fina*. Universidad de Córdoba.
- Arbelaez, L. (2010). *Análisis de la diversidad intraespecie de Moniliophthora roreri por medio de marcadores morfológicos y genéticos*. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/1938/1/43276997.20101.pdf>
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., ... Stockinger, H. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. Retrieved from <http://www.expasy.org/>
- Ayala Benítez, M. F. (2008). *Manejo integrado de moniliasis (Moniliophthora roreri) en el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.) mediante el uso de fungicidas, combinado con labores culturales*. Escuela superior politecnica del litoral.
- Benoiton, N. L. (2006). *Chemistry of peptide synthesis*. Boca Raton.
- Beveridge, T. J. (1999). Structure of fram-negative cell walls and their derived mebrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, 181(16), 4725–4733.
- Bisht, G. S., Rawat, D. S., Kumar, A., Kumar, R., & Pasha, S. (2007). Antimicrobial activity of rationally designed amino terminal modified peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(15), 4343–6. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.05.015>
- Blanco-Labra, A., & Aguirre Mancilla, C. (2002). Proteínas Involucradas en los mecanismos de defensa de plantas. *Acta Universitaria*, 12(3), 31–43.
- Bolognini, M., Cavani, F., Scagliarini, D., Flego, C., Perego, C., & Saba, M. (2002). Heterogeneous basic catalysts as alternatives to homogeneous catalysts: reactivity of Mg/Al mixed oxides in the alkylation of m-cresol with methanol. *Catalysis Today*, 75(1-4), 103–111. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(02\)00050-0](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(02)00050-0)
- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28(8), 799–808. <http://doi.org/10.1002/bies.20441>
- Brogden, K. a. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 238–50.

<http://doi.org/10.1038/nrmicro1098>

- Carlos Andres, R. V. (2011). *Síntesis y determinación estructural de péptidos derivados de Dermaseptina con actividad antileishmanial*. Universidad Nacional de Colombia-sede Medellín.
- Chacón Almeyda, A. V. (2014). *Evaluación In Vitro de la actividad antifúngica contra Moniliophthora roreri (Cif. y Par.) Evans Et al. de extratos obtenidos de Justicia secunda Vahl*. Universidad Industrial de Santander.
- Chan, W., & White, P. (2000). *Fmoc solid phase peptide synthesis*. New York: OXFORD University Press. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300043056>
- Chen, Y., Mant, C. T., Farmer, S. W., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2005). Rational Design of  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity / Therapeutic Index \*, *280*(13), 12316–12329. <http://doi.org/10.1074/jbc>.
- Cho, S. H., Oh, S. H., & Lee, J. H. (2005). Fabrication and characterization of porous alginate/polyvinyl alcohol hybrid scaffolds for 3D cell culture. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, *16*(8), 933–947. <http://doi.org/10.1163/1568562054414658>
- Contreras, L. Y. S., & Riaño, A. L. R. (2013). Aislamiento de microorganismos para control biológico de moniliophthora roreri. *Acta Agronomica*, *62*, 370–378.
- Das, S. K., Kapoor, S., Yamada, H., & Bhattacharyya, A. J. (2009). Effects of surface acidity and pore size of mesoporous alumina on degree of loading and controlled release of ibuprofen. *Microporous and Mesoporous Materials*, *118*(1-3), 267–272. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.08.042>
- Davis, M. E. (2002). Ordered porous materials for Emerging Applications. *Nat*, *417*(June), 813–821.
- De Queiroz, Á. a. a., Passos, E. D., De Brito Alves, S., Silva, G. S., Higa, O. Z., & Vítolo, M. (2006). Alginate–poly(vinyl alcohol) core–shell microspheres for lipase immobilization. *Journal of Applied Polymer Science*, *102*(2), 1553–1560. <http://doi.org/10.1002/app.23444>
- Degim, I. T., & Celebi, N. (2007). Controlled delivery of peptides and proteins. *Current Pharmaceutical Design*, *13*(1), 99–117. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17266590>
- Dongyuan, Z., Jianglin, F., Qisheng, H., Nicholas, M., Glenn H., F., Bradley F., C., & Galen D., S. (1998). Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science*, *279*(5350), 548–552. <http://doi.org/10.1126/science.279.5350.548>
- Espinal G, C. F., Martínez C, H. J., & Peña M, Y. (2005). *La cadena del cacao en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de trabajo No. 92*.
- Everett, D. H. (1972). Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units, Appendix II: Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry. (D. H. Everett, Ed.) *Pure and Applied Chemistry*. London. <http://doi.org/10.1351/pac197231040577>
- Fogueri, L. R., & Singh, S. (2009). Smart polymers for controlled delivery of proteins and

- peptides: a review of patents. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 3(1), 40–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19149728>
- Garcia, M. I., & Le Bouguéneq, C. (1996). Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic *Escherichia coli*. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 94(3), 201–236. [http://doi.org/10.1016/S0020-2452\(97\)86017-4](http://doi.org/10.1016/S0020-2452(97)86017-4)
- Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents : mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 501–517.
- Glukhov, E., Stark, M., Burrows, L. L., & Deber, C. M. (2005). Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33960–33967. <http://doi.org/10.1074/jbc.M507042200>
- Green, R. J., Frazier, R. A., Shakesheff, K. M., Davies, M. C., Roberts, C. J., & Tendler, S. J. . (2000). Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials*, 21(18), 1823–1835. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00077-6](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00077-6)
- Guerrero, R. C. (2010). *Desarrollo de materiales porosos para la sorción de CO2*. Instituto Politécnico Nacional.
- Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., & Monte, F. (2008). Ice-Templated Materials : Sophisticated Structures Exhibiting Enhanced Functionalities Obtained after Unidirectional Freezing. *Chemical Materials*, 20(3), 634–648.
- Gutiérrez, M. C., García-Carvajal, Z. Y., Jobbágy, M., Rubio, F., Yuste, L., Rojo, F., ... del Monte, F. (2007). Poly(vinyl alcohol) Scaffolds with Tailored Morphologies for Drug Delivery and Controlled Release. *Advanced Functional Materials*, 17(17), 3505–3513. <http://doi.org/10.1002/adfm.200700093>
- Guzmán, F., Marshall, S., Ojeda, C., Albericio, F., & Carvajal-Rondanelli, P. (2013). Inhibitory effect of short cationic homopeptides against Gram-positive bacteria. *Journal of Peptide Science*, 19(October), 792–800. <http://doi.org/10.1002/psc.2578>
- Han, C., Li, H., Pu, H., Yu, H., Deng, L., Huang, S., & Luo, Y. (2013). Synthesis and characterization of mesoporous alumina and their performances for removing arsenic(V). *Chemical Engineering Journal*, 217, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2012.11.087>
- Hancock, R. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters*, 206(2), 143–149. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00480-3](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00480-3)
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.04.013>
- Haney, E. F., Petersen, A. P., Lau, C. K., Jing, W., Storey, D. G., & Vogel, H. J. (2013). Mechanism of action of puroidoline derived tryptophan-rich antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(8), 1802–1813. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.03.023>
- Helmerhorst, E. J., Reijnders, I. M., van 't Hof, W., Veerman, E. C., & Nieuw Amerongen, a V. (1999). A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Letters*, 449(2-3), 105–110. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10338113>

- Hicks, R. W., Castagnola, N. B., Zhang, Z., Pinnavaia, T. J., & Marshall, C. L. (2003). Lathlike mesostructured  $\gamma$ -alumina as a hydrodesulfurization catalyst support, 254, 311–317. [http://doi.org/10.1016/S0926-860X\(03\)00476-9](http://doi.org/10.1016/S0926-860X(03)00476-9)
- International journal of hydrogen energy, 1980. (1980). *International Journal of Hydrogen Energy*. [http://doi.org/10.1016/0360-3199\(80\)90035-X](http://doi.org/10.1016/0360-3199(80)90035-X)
- Jaimes Suárez, Y., & Aranzazu Hernández, F. (2010). *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L) en Colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora roreri)*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA.
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511. <http://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>
- Jiang, Z., Vasil, A. I., Hale, J. D., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2008). Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic  $\alpha$ -helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 90(3), 369–383. <http://doi.org/10.1002/bip.20911>
- Jofré, C., Guzmán, F., Cárdenas, C., Albericio, F., & Marshall, S. H. (2011). A natural peptide and its variants derived from the processing of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) displaying enhanced antimicrobial activity: A novel alternative for the control of bacterial diseases. *Peptides*, 32, 852–858. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.026>
- Johansson, E. M., Córdoba, J. M., & Odén, M. (2009). Synthesis and characterization of large mesoporous silica SBA-15 sheets with ordered accessible 18 nm pores. *Materials Letters*, 63(24-25), 2129–2131. <http://doi.org/10.1016/j.matlet.2009.07.013>
- Kapoor, S., Hegde, R., & Bhattacharyya, A. J. (2009). Influence of surface chemistry of mesoporous alumina with wide pore distribution on controlled drug release. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 140(1), 34–9. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.07.015>
- Kent, S. B. (1988). Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 57(1), 957–89. <http://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.004521>
- Kosmulski, M. (2009). Compilation of PZC and IEP of sparingly soluble metal oxides and hydroxides from literature. *Advances in Colloid and Interface Science*, 152(1-2), 14–25. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2009.08.003>
- Kresge, C. T., & Roth, W. J. (2013). The discovery of mesoporous molecular sieves from the twenty year perspective. *Chemical Society Reviews*, 42(9), 3663–70. <http://doi.org/10.1039/c3cs60016e>
- Krstic, V. (2005, October 26). Catalizadores de Rh-soportado y su aplicación en la hidrogenación de crotonaldehído. Universidad de Cantabria. Retrieved from <http://www.tdx.cat/handle/10803/10685>
- Lee, D., Shin, S., Kim, D., Seo, M., & Kang, J. (1999). Antifungal mechanism of a cysteine-rich antimicrobial peptide, Ib-AMP1, from *Impatiens balsamina* against *Candida albicans*. *Biotechnology ...*, 1047–1050. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1005636610512>
- Leofanti, G., Padovan, M., Tozzola, G., & Venturelli, B. (1998). Surface area and pore texture of catalysts. *Catalysis Today*, 41(1-3), 207–219. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(98\)00050-9](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(98)00050-9)

- Li, W., & Zhao, D. (2013). An overview of the synthesis of ordered mesoporous materials. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 49(10), 943–6. <http://doi.org/10.1039/c2cc36964h>
- Llop Hernández, A., Valdés-Dapena Vivanco, M. M., & Zuazo Silva, J. L. (2001). *Microbiología y parasitología médicas*. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
- Lloyd-Williams, P. (1997). *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. New directions in organic and biological chemistry CN - QP551 .L56 1997*. Boca Raton: CRC Press.
- Lozada, B. S., Herrera, L. V., Perea, J. A., Stashenko, E., & Escobar, P. (2012). Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 61(2), 102–110.
- Lu, J. R., Su, T. J., Thirtle, P. N., Thomas, R. K., Rennie, A. R., & Cubitt, R. (1998). The Denaturation of Lysozyme Layers Adsorbed at the Hydrophobic Solid/Liquid Surface Studied by Neutron Reflection. *Journal of Colloid and Interface Science*, 206(1), 212–223. <http://doi.org/10.1006/jcis.1998.5680>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., & Gacto Fernández, M. (2004). *Brock biología de los microorganismos*. México: Prentice Hall Hispanoamericana.
- Márquez-Alvarez, C., Žilková, N., Pérez-Pariente, J., & Čejka, J. (2008). Synthesis, Characterization and Catalytic Applications of Organized Mesoporous Aluminas. *Catalysis Reviews*, 50(2), 222–286. <http://doi.org/10.1080/01614940701804042>
- Marr, A. K., Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(5), 468–72. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.006>
- Matsuura, S., Ishii, R., Itoh, T., Hanaoka, T., Hamakawa, S., Tsunoda, T., & Mizukami, F. (2010). Direct visualization of hetero-enzyme co-encapsulated in mesoporous silicas. *Microporous and Mesoporous Materials*, 127(1-2), 61–66. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.06.029>
- Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1462(1-2), 1–10. [http://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00197-2](http://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00197-2)
- McGinity, J. W., & Felton, L. A. (2008). *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms*. (J. W. McGinity & L. A. Felton, Eds.) (Third edit). New York.
- Meincken, M., Holroyd, D. L., & Rautenbach, M. (2005). Atomic Force Microscopy Study of the Effect of Antimicrobial Peptides on the Cell Envelope of *Escherichia coli*. *Society*, 49(10), 4085–4092. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4085>
- Miyahara, M., Vinu, A., & Ariga, K. (2007). Adsorption myoglobin over mesoporous silica molecular sieves: Pore size effect and pore-filling model. *Materials Science and Engineering: C*, 27(2), 232–236. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.012>
- Muschert, S., Siepmann, F., Leclercq, B., Carlin, B., & Siepmann, J. (2009). Drug release mechanisms from ethylcellulose: PVA-PEG graft copolymer-coated pellets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.12.007>
- Navarre, W. W., & Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and

- mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : *MMBR*, 63(1), 174–229. [http://doi.org/1092-2172/99/\\$04.00+0](http://doi.org/1092-2172/99/$04.00+0)Barnett, Timothy C.
- Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 464–472. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>
- Niesz, K., Yang, P., & Somorjai, G. a. (2005). Sol-gel synthesis of ordered mesoporous alumina. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, (15), 1986–1987. <http://doi.org/10.1039/b419249d>
- Oficial, G., & Divulga, I. (2005). El control de la moniliasis en el cacao, 23–26.
- Orth, D., Grif, K., Zimmerhackl, L. B., & Würzner, R. (2008). Prevention and treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections in humans. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 6(1), 101–108. <http://doi.org/10.1586/14787210.6.1.101>
- Pennington, M. W., & Dunn, B. M. (1994). Peptide Synthesis Protocols (In: *Methods Mol. Biol.* 1994, 35). <http://doi.org/10.1385/0896032736>
- Perullini, A. (2009). *Síntesis de materiales inorgánicos con porosidad controlada para la inmovilización de células: aplicaciones en biorreactores*. Retrieved from [http://bldigital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_4413\\_Perullini.pdf](http://bldigital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4413_Perullini.pdf)
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78–82. [http://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70024-X](http://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70024-X)
- Postgate, J. R., Crumpton, J. E., & Hunter, J. R. (1961). The measurement of bacterial viabilities by slide culture. *Journal of General Microbiology*, 24(1954), 15–24. <http://doi.org/10.1099/00221287-24-1-15>
- Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J. A., & Piedrola-Angulo, G. (1987). *Microbiología y parasitología médica*. Barcelona: Salvat.
- Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(6), 536–47. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>
- Reyes, R. E., Ramírez Saad, H., Solís Galicia, C., Ortiz Herrera, M., & Coria Jiménez, R. (2009). Mecanismos involucrados en la variabilidad del antígeno O de bacterias Gram negativas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 52, 32–43.
- Rink, H. (1987). Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Letters*, 28(33), 3787–3790. [http://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)96384-6](http://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)96384-6)
- Robens, E., Dabrowski, A., & Kutarov, V. V. (2004). Comments on surface structure analysis by water and nitrogen adsorption. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 76(2), 647–657. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000221460800030
- Robinson, J. R. (1978). *Sustained and controlled release drug delivery systems* (Vol. 6). M. Dekker.
- Rodríguez, E. (2006). Técnica de reducción de inóculo para controlar la Moniliasis del cacao en Santander. *Revista Corpoica*, 4(4), 68–78. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Técnica+de+reducción+de+inoculo+para+controlar+la+Moniliasis+del+cacao+en+Santander#0>

- Saldarriaga, Y., & Pineda, F. (2001). *Aislamiento de hongos fitopatógenos. Manual de micología aplicada*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Schlossbauer, A., Schaffert, D., Kecht, J., Wagner, E., & Bein, T. (2008). Click Chemistry for High-Density Biofunctionalization of Mesoporous Silica. *Journal of the American Chemical Society*, *130*(38), 12558–12559. <http://doi.org/10.1021/ja803018w>
- Slowing, I. I., Trewyn, B. G., & Lin, V. S.-Y. (2007). Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Delivery of Membrane-Impermeable Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, *129*(28), 8845–8849. <http://doi.org/10.1021/ja0719780>
- Soler-Illia, G. J. D. a a, Sanchez, C., Lebeau, B., & Patarin, J. (2002). Chemical strategies to design textured materials: From microporous and mesoporous oxides to nanonetworks and hierarchical structures. *Chemical Reviews*, *102*(11), 4093–4138. <http://doi.org/10.1021/cr0200062>
- Suhrenbrock, L., Radtke, G., Knop, K., & Kleinebudde, P. (2011). Suspension pellet layering using PVA-PEG graft copolymer as a new binder. *International Journal of Pharmaceutics*. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.061>
- Taylor, R. H., Acland, D. P., Attenborough, S., Cammue, B. P., Evans, I. J., Osborn, R. W., ... Broekaert, W. F. (1997). A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(39), 24480–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9305910>
- Tang, E. S. K., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2005). Coating of multiparticulates for sustained release. *American Journal of Drug Delivery*.
- Tantirungrotechai, J., Chotmongkolsap, P., & Pohmakotr, M. (2010). Synthesis, characterization, and activity in transesterification of mesoporous Mg–Al mixed-metal oxides. *Microporous and Mesoporous Materials*, *128*(1-3), 41–47. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.08.001>
- Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, *51*(2), 149–77. <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>
- Thevissen, K., François, I. E. J. a, Sijtsma, L., van Amerongen, A., Schaaper, W. M. M., Meloen, R., ... Cammue, B. P. a. (2005). Antifungal activity of synthetic peptides derived from *Impatiens balsamina* antimicrobial peptides Ib-AMP1 and Ib-AMP4. *Peptides*, *26*(7), 1113–9. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.01.008>
- Thevissen, K., Ghazi, A., Samblanx, W. De, Brownlee, C., Rupert, W., & Broekaert, W. F. (1996). Fungal Membrane Responses Induced by Plant Defensins and Thionins. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(25), 15018–15025. <http://doi.org/10.1074/jbc.271.25.15018>
- Vaara, M., & Nurminen, M. (1999). Outer Membrane Permeability Barrier in *Escherichia coli* Mutants That Are Defective in the Late Acyltransferases of Lipid A Biosynthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *43*(6), 1459–1462. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89296/>
- Vallet-Regi, M., Rámila, A., del Real, R. P., & Pérez-Pariente, J. (2001). A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. *Chemistry of Materials*, *13*(2), 308–311. <http://doi.org/10.1021/cm0011559>
- van der Kraan, M. I. a, van der Made, C., Nazmi, K., van't Hof, W., Groenink, J., Veerman,

- E. C. I., ... Nieuw Amerongen, A. V. (2005). Effect of amino acid substitutions on the candidacidal activity of LFampin 265-284. *Peptides*, 26(11), 2093–7. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.03.056>
- van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., & Anderson, M. a. (2013). Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 70(19), 3545–70. <http://doi.org/10.1007/s00018-013-1260-1>
- Vásquez, L. E., Guzmán, F., Patarroyo, M. E., & Arango, R. (2009). IN VITRO EVALUATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES AGAINST *Mycosphaerella fijiensis* MORELET AND THEIR INTERACTION WITH SOME CHEMICAL FUNGICIDES. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*.
- Velandía, A., Santiago, J., Esteban, C., & Teresa, M. (2008). *Moniliophthora roreri* EN CACAO *Teobroma cacao* L., 1–3.
- Wan, Y., & Zhao, D. (2007). On the controllable soft-templating approach to mesoporous silicates. *Chemical Reviews*, 107(7), 2821–60. <http://doi.org/10.1021/cr068020s>
- Wang, P., Bang, J.-K., Kim, H. J., Kim, J.-K., Kim, Y., & Shin, S. Y. (2009). Antimicrobial specificity and mechanism of action of disulfide-removed linear analogs of the plant-derived Cys-rich antimicrobial peptide Ib-AMP1. *Peptides*, 30(12), 2144–9. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.09.020>
- Wang, S. (2009). Ordered mesoporous materials for drug delivery. *Microporous and Mesoporous Materials*, 117(1-2), 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.07.002>
- Wang, Y., Noguchi, M., Takahashi, Y., & Ohtsuka, Y. (2001). Synthesis of SBA-15 with different pore sizes and the utilization as supports of high loading of cobalt catalysts. *Catalysis Today*, 68(1-3), 3–9. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(01\)00317-0](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(01)00317-0)
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Xu, L., Song, H., & Chou, L. (2012). One-Pot Synthesis of Ordered Mesoporous NiO – CaO – Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Composite Oxides for Catalyzing CO<sub>2</sub> Reforming of CH<sub>4</sub>.
- Yau, W. M., Wimley, W. C., Gawrisch, K., & White, S. H. (1998). The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry*, 37(42), 14713–14718.
- Yiu, H. H. P., & Wright, P. a. (2005). Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic–organic hybrid. *Journal of Materials Chemistry*, 15(35-36), 3690. <http://doi.org/10.1039/b506090g>
- Yuan, Q., Yin, A.-X., Luo, C., Sun, L.-D., Zhang, Y.-W., Duan, W.-T., ... Yan, C.-H. (2008). Facile synthesis for ordered mesoporous gamma-aluminas with high thermal stability. *Journal of the American Chemical Society*, 130(11), 3465–3472. <http://doi.org/10.1021/ja0764308>
- Zhang, H., & Cooper, A. I. (2007). Aligned porous structures by directional freezing. *Advanced Materials*, 19(11), 1529–1533. <http://doi.org/10.1002/adma.200700154>
- 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. <http://doi.org/10.1074/jbc.M104925200>
- Zhang, Y., Chan, H. F., & Leong, K. W. (2013). Advanced materials and processing for

drug delivery: the past and the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 104–20. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.003>

Zinieris, N., Leondiadis, L., & Ferderigos, N. (2005). Nalpha-Fmoc removal from resin-bound amino acids by 5% piperidine solution. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 7(1), 4–6. <http://doi.org/10.1021/cc049872d>

## BIBLIOGRAFÍA CAPITULO 1

Aapptec. (n.d.). *Practical synthesis guide to solid phase peptide chemistry*.

Addorisio, V., Esposito, S., & Sannino, F. (2010). Sorption capacity of mesoporous metal oxides for the removal of MCPA from polluted waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5011–5016.

Alves, M. H., Jensen, B. E. B., Smith, A. a a, & Zelikin, A. N. (2011). Poly(vinyl alcohol) physical hydrogels: New vista on a long serving biomaterial. *Macromolecular Bioscience*, 11(10), 1293–1313. <http://doi.org/10.1002/mabi.201100145>

Amatani, T., Nakanishi, K., Hirao, K., & Kodaira, T. (2005). Monolithic Periodic Mesoporous Silica with Well-Defined Macropores Monolithic Periodic Mesoporous Silica with Well-Defined Macropores. *Chemistry of Materials*, 17(March), 2114–2119. <http://doi.org/10.1021/cm048091c>

Antonio, P. P. (2013). *Silicatos y alúminosilicatos mesoporosos funcionalizados como catalizadores en reacciones de interés en química fina*. Universidad de Córdoba.

Arbelaez, L. (2010). *Análisis de la diversidad intraespecie de Moniliophthora roreri por medio de marcadores morfológicos y genéticos*. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/1938/1/43276997.20101.pdf>

Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., ... Stockinger, H. (2012). EXPASy: SIB bioinformatics resource portal. Retrieved from <http://www.expasy.org/>

Ayala Benítez, M. F. (2008). *Manejo integrado de moniliasis (Moniliophthora roreri) en el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.) mediante el uso de fungicidas, combinado con labores culturales*. Escuela superior politecnica del litoral.

Benoiton, N. L. (2006). *Chemistry of peptide synthesis*. Boca Raton.

Beveridge, T. J. (1999). Structure of fram-negative cell walls and their derived mebrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, 181(16), 4725–4733.

Bisht, G. S., Rawat, D. S., Kumar, A., Kumar, R., & Pasha, S. (2007). Antimicrobial activity of rationally designed amino terminal modified peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(15), 4343–6. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.05.015>

Blanco-Labra, A., & Aguirre Mancilla, C. (2002). Proteínas Involucradas en los mecanismos de defensa de plantas. *Acta Universitaria*, 12(3), 31–43.

Bolognini, M., Cavani, F., Scagliarini, D., Flego, C., Perego, C., & Saba, M. (2002). Heterogeneous basic catalysts as alternatives to homogeneous catalysts: reactivity of Mg/Al mixed oxides in the alkylation of m-cresol with methanol. *Catalysis Today*, 75(1-4), 103–111. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(02\)00050-0](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(02)00050-0)

- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28(8), 799–808. <http://doi.org/10.1002/bies.20441>
- Brogden, K. a. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 238–50. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Carlos Andres, R. V. (2011). *Síntesis y determinación estructural de péptidos derivados de Dermaseptina con actividad antileishmanial*. Universidad Nacional de Colombia-sede Medellin.
- Chacón Almeyda, A. V. (2014). *Evaluación In Vitro de la actividad antifúngica contra Moniliophthora roreri(Cif. y Par.) Evans Et al. de extratos obtenidos de Justicia secunda Vahl*. Universidad Industrial de Santander.
- Chan, W., & White, P. (2000). *Fmoc solid phase peptide synthesis*. New York: OXFORD University Press. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300043056>
- Chen, Y., Mant, C. T., Farmer, S. W., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2005). Rational Design of  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity / Therapeutic Index \*, 280(13), 12316–12329. <http://doi.org/10.1074/jbc>.
- Cho, S. H., Oh, S. H., & Lee, J. H. (2005). Fabrication and characterization of porous alginate/polyvinyl alcohol hybrid scaffolds for 3D cell culture. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 16(8), 933–947. <http://doi.org/10.1163/1568562054414658>
- Contreras, L. Y. S., & Riaño, A. L. R. (2013). Aislamiento de microorganismos para control biológico de moniliophthora roreri. *Acta Agronomica*, 62, 370–378.
- Das, S. K., Kapoor, S., Yamada, H., & Bhattacharyya, A. J. (2009). Effects of surface acidity and pore size of mesoporous alumina on degree of loading and controlled release of ibuprofen. *Microporous and Mesoporous Materials*, 118(1-3), 267–272. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.08.042>
- Davis, M. E. (2002). Ordered porous materials for Emerging Applications. *Nat*, 417(June), 813–821.
- De Queiroz, Á. a. a., Passos, E. D., De Brito Alves, S., Silva, G. S., Higa, O. Z., & Vítolo, M. (2006). Alginate–poly(vinyl alcohol) core–shell microspheres for lipase immobilization. *Journal of Applied Polymer Science*, 102(2), 1553–1560. <http://doi.org/10.1002/app.23444>
- Degim, I. T., & Celebi, N. (2007). Controlled delivery of peptides and proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 13(1), 99–117. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17266590>
- Dongyuan, Z., Jianglin, F., Qisheng, H., Nicholas, M., Glenn H., F., Bradley F., C., & Galen D., S. (1998). Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science*, 279(5350), 548–552. <http://doi.org/10.1126/science.279.5350.548>
- Espinal G, C. F., Martínez C, H. J., & Peña M, Y. (2005). *La cadena del cacao en Colombia. Una mirada golbal de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de trabajo No. 92*.
- Everett, D. H. (1972). *Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities*

- and Units, Appendix II: Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry. (D. H. Everett, Ed.) *Pure and Applied Chemistry*. London.  
<http://doi.org/10.1351/pac197231040577>
- Fogueri, L. R., & Singh, S. (2009). Smart polymers for controlled delivery of proteins and peptides: a review of patents. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 3(1), 40–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19149728>
- Garcia, M. I., & Le Bouguéneq, C. (1996). Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic *Escherichia coli*. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 94(3), 201–236. [http://doi.org/10.1016/S0020-2452\(97\)86017-4](http://doi.org/10.1016/S0020-2452(97)86017-4)
- Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents : mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 501–517.
- Glukhov, E., Stark, M., Burrows, L. L., & Deber, C. M. (2005). Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33960–33967.  
<http://doi.org/10.1074/jbc.M507042200>
- Green, R. J., Frazier, R. A., Shakesheff, K. M., Davies, M. C., Roberts, C. J., & Tendler, S. J. (2000). Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials*, 21(18), 1823–1835. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00077-6](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00077-6)
- Guerrero, R. C. (2010). *Desarrollo de materiales porosos para la sorción de CO2*. Instituto Politécnico Nacional.
- Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., & Monte, F. (2008). Ice-Templated Materials : Sophisticated Structures Exhibiting Enhanced Functionalities Obtained after Unidirectional Freezing. *Chemical Materials*, 20(3), 634–648.
- Gutiérrez, M. C., García-Carvajal, Z. Y., Jobbágy, M., Rubio, F., Yuste, L., Rojo, F., ... del Monte, F. (2007). Poly(vinyl alcohol) Scaffolds with Tailored Morphologies for Drug Delivery and Controlled Release. *Advanced Functional Materials*, 17(17), 3505–3513. <http://doi.org/10.1002/adfm.200700093>
- Guzmán, F., Marshall, S., Ojeda, C., Albericio, F., & Carvajal-Rondanelli, P. (2013). Inhibitory effect of short cationic homopeptides against Gram-positive bacteria. *Journal of Peptide Science*, 19(October), 792–800. <http://doi.org/10.1002/psc.2578>
- Han, C., Li, H., Pu, H., Yu, H., Deng, L., Huang, S., & Luo, Y. (2013). Synthesis and characterization of mesoporous alumina and their performances for removing arsenic(V). *Chemical Engineering Journal*, 217, 1–9.  
<http://doi.org/10.1016/j.cej.2012.11.087>
- Hancock, R. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters*, 206(2), 143–149. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00480-3](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00480-3)
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.04.013>
- Haney, E. F., Petersen, A. P., Lau, C. K., Jing, W., Storey, D. G., & Vogel, H. J. (2013). Mechanism of action of puoroindoline derived tryptophan-rich antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(8), 1802–1813.

<http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.03.023>

- Helmerhorst, E. J., Reijnders, I. M., van 't Hof, W., Veerman, E. C., & Nieuw Amerongen, A. V. (1999). A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Letters*, *449*(2-3), 105–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10338113>
- Hicks, R. W., Castagnola, N. B., Zhang, Z., Pinnavaia, T. J., & Marshall, C. L. (2003). Lathlike mesostructured  $\gamma$ -alumina as a hydrodesulfurization catalyst support, *254*, 311–317. [http://doi.org/10.1016/S0926-860X\(03\)00476-9](http://doi.org/10.1016/S0926-860X(03)00476-9)
- International journal of hydrogen energy, 1980. (1980). *International Journal of Hydrogen Energy*. [http://doi.org/10.1016/0360-3199\(80\)90035-X](http://doi.org/10.1016/0360-3199(80)90035-X)
- Jaimes Suárez, Y., & Aranzazu Hernández, F. (2010). *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L) en Colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora roreri)*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA.
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, *19*(3), 491–511. <http://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>
- Jiang, Z., Vasil, A. I., Hale, J. D., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2008). Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic  $\alpha$ -helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers - Peptide Science Section*, *90*(3), 369–383. <http://doi.org/10.1002/bip.20911>
- Jofré, C., Guzmán, F., Cárdenas, C., Albericio, F., & Marshall, S. H. (2011). A natural peptide and its variants derived from the processing of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) displaying enhanced antimicrobial activity: A novel alternative for the control of bacterial diseases. *Peptides*, *32*, 852–858. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.026>
- Johansson, E. M., Córdoba, J. M., & Odén, M. (2009). Synthesis and characterization of large mesoporous silica SBA-15 sheets with ordered accessible 18 nm pores. *Materials Letters*, *63*(24-25), 2129–2131. <http://doi.org/10.1016/j.matlet.2009.07.013>
- Kapoor, S., Hegde, R., & Bhattacharyya, A. J. (2009). Influence of surface chemistry of mesoporous alumina with wide pore distribution on controlled drug release. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, *140*(1), 34–9. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.07.015>
- Kent, S. B. (1988). Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annual Review of Biochemistry*, *57*(1), 957–89. <http://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.004521>
- Kosmulski, M. (2009). Compilation of PZC and IEP of sparingly soluble metal oxides and hydroxides from literature. *Advances in Colloid and Interface Science*, *152*(1-2), 14–25. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2009.08.003>
- Kresge, C. T., & Roth, W. J. (2013). The discovery of mesoporous molecular sieves from the twenty year perspective. *Chemical Society Reviews*, *42*(9), 3663–70. <http://doi.org/10.1039/c3cs60016e>
- Krstic, V. (2005, October 26). Catalizadores de Rh-soportado y su aplicación en la hidrogenación de crotonaldehído. Universidad de Cantabria. Retrieved from <http://www.tdx.cat/handle/10803/10685>
- Lee, D., Shin, S., Kim, D., Seo, M., & Kang, J. (1999). Antifungal mechanism of a cysteine-rich antimicrobial peptide, Ib-AMP1, from *Impatiens balsamina* against *Candida albicans*. *Biotechnology ...*, 1047–1050. Retrieved from

- <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1005636610512>
- Leofanti, G., Padovan, M., Tozzola, G., & Venturelli, B. (1998). Surface area and pore texture of catalysts. *Catalysis Today*, 41(1-3), 207–219. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(98\)00050-9](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(98)00050-9)
- Li, W., & Zhao, D. (2013). An overview of the synthesis of ordered mesoporous materials. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 49(10), 943–6. <http://doi.org/10.1039/c2cc36964h>
- Llop Hernández, A., Valdés-Dapena Vivanco, M. M., & Zuazo Silva, J. L. (2001). *Microbiología y parasitología médicas*. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
- Lloyd-Williams, P. (1997). *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. New directions in organic and biological chemistry CN - QP551 .L56 1997*. Boca Raton: CRC Press.
- Lozada, B. S., Herrera, L. V., Perea, J. A., Stashenko, E., & Escobar, P. (2012). Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 61(2), 102–110.
- Lu, J. R., Su, T. J., Thirtle, P. N., Thomas, R. K., Rennie, A. R., & Cubitt, R. (1998). The Denaturation of Lysozyme Layers Adsorbed at the Hydrophobic Solid/Liquid Surface Studied by Neutron Reflection. *Journal of Colloid and Interface Science*, 206(1), 212–223. <http://doi.org/10.1006/jcis.1998.5680>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., & Gacto Fernández, M. (2004). *Brock biología de los microorganismos*. México: Prentice Hall Hispanoamericana.
- Márquez-Alvarez, C., Žilková, N., Pérez-Pariente, J., & Čejka, J. (2008). Synthesis, Characterization and Catalytic Applications of Organized Mesoporous Aluminas. *Catalysis Reviews*, 50(2), 222–286. <http://doi.org/10.1080/01614940701804042>
- Marr, A. K., Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(5), 468–72. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.006>
- Matsuura, S., Ishii, R., Itoh, T., Hanaoka, T., Hamakawa, S., Tsunoda, T., & Mizukami, F. (2010). Direct visualization of hetero-enzyme co-encapsulated in mesoporous silicas. *Microporous and Mesoporous Materials*, 127(1-2), 61–66. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.06.029>
- Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1462(1-2), 1–10. [http://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00197-2](http://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00197-2)
- McGinity, J. W., & Felton, L. A. (2008). *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms*. (J. W. McGinity & L. A. Felton, Eds.) (Third edit). New York.
- Meincken, M., Holroyd, D. L., & Rautenbach, M. (2005). Atomic Force Microscopy Study of the Effect of Antimicrobial Peptides on the Cell Envelope of *Escherichia coli*. *Society*, 49(10), 4085–4092. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4085>
- Miyahara, M., Vinu, A., & Ariga, K. (2007). Adsorption myoglobin over mesoporous silica molecular sieves: Pore size effect and pore-filling model. *Materials Science and Engineering: C*, 27(2), 232–236. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.012>

- Muschert, S., Siepmann, F., Leclercq, B., Carlin, B., & Siepmann, J. (2009). Drug release mechanisms from ethylcellulose: PVA-PEG graft copolymer-coated pellets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.  
<http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.12.007>
- Navarre, W. W., & Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 63(1), 174–229. [http://doi.org/1092-2172/99/\\$04.00+0](http://doi.org/1092-2172/99/$04.00+0)Barnett, Timothy C.
- Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 464–472. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>
- Niesz, K., Yang, P., & Somorjai, G. a. (2005). Sol-gel synthesis of ordered mesoporous alumina. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, (15), 1986–1987. <http://doi.org/10.1039/b419249d>
- Oficial, G., & Divulga, I. (2005). El control de la moniliasis en el cacao, 23–26.
- Orth, D., Grif, K., Zimmerhackl, L. B., & Würzner, R. (2008). Prevention and treatment of enterohemorrhagic Escherichia coli infections in humans. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 6(1), 101–108. <http://doi.org/10.1586/14787210.6.1.101>
- Pennington, M. W., & Dunn, B. M. (1994). Peptide Synthesis Protocols (In: Methods Mol. Biol. 1994, 35). <http://doi.org/10.1385/0896032736>
- Perullini, A. (2009). *Síntesis de materiales inorgánicos con porosidad controlada para la inmovilización de células: aplicaciones en biorreactores*. Retrieved from [http://bldigital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_4413\\_Perullini.pdf](http://bldigital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4413_Perullini.pdf)
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78–82. [http://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70024-X](http://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70024-X)
- Postgate, J. R., Crumpton, J. E., & Hunter, J. R. (1961). The measurement of bacterial viabilities by slide culture. *Journal of General Microbiology*, 24(1954), 15–24. <http://doi.org/10.1099/00221287-24-1-15>
- Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J. A., & Piedrola-Angulo, G. (1987). *Microbiología y parasitología médica*. Barcelona: Salvat.
- Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(6), 536–47. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>
- Reyes, R. E., Ramírez Saad, H., Solís Galicia, C., Ortiz Herrera, M., & Coria Jiménez, R. (2009). Mecanismos involucrados en la variabilidad del antígeno O de bacterias Gram negativas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 52, 32–43.
- Rink, H. (1987). Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Letters*, 28(33), 3787–3790. [http://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)96384-6](http://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)96384-6)
- Robens, E., Dabrowski, A., & Kutarov, V. V. (2004). Comments on surface structure analysis by water and nitrogen adsorption. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 76(2), 647–657. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000221460800030
- Robinson, J. R. (1978). *Sustained and controlled release drug delivery systems* (Vol. 6).

M. Dekker.

- Rodríguez, E. (2006). Técnica de reducción de inóculo para controlar la Moniliasis del cacao en Santander. *Revista Corpoica*, 4(4), 68–78. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Técnica+de+reducción+de+inóculo+para+controlar+la+Moniliasis+del+cacao+en+Santander#0>
- Saldarriaga, Y., & Pineda, F. (2001). *Aislamiento de hongos fitopatógenos. Manual de micología aplicada*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Schlossbauer, A., Schaffert, D., Kecht, J., Wagner, E., & Bein, T. (2008). Click Chemistry for High-Density Biofunctionalization of Mesoporous Silica. *Journal of the American Chemical Society*, 130(38), 12558–12559. <http://doi.org/10.1021/ja803018w>
- Slowing, I. I., Trewyn, B. G., & Lin, V. S.-Y. (2007). Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Delivery of Membrane-Impermeable Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 129(28), 8845–8849. <http://doi.org/10.1021/ja0719780>
- Soler-Illia, G. J. D. a a, Sanchez, C., Lebeau, B., & Patarin, J. (2002). Chemical strategies to design textured materials: From microporous and mesoporous oxides to nanonetworks and hierarchical structures. *Chemical Reviews*, 102(11), 4093–4138. <http://doi.org/10.1021/cr0200062>
- Suhrenbrock, L., Radtke, G., Knop, K., & Kleinebudde, P. (2011). Suspension pellet layering using PVA-PEG graft copolymer as a new binder. *International Journal of Pharmaceutics*. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.061>
- Taylor, R. H., Acland, D. P., Attenborough, S., Cammue, B. P., Evans, I. J., Osborn, R. W., ... Broekaert, W. F. (1997). A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(39), 24480–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9305910>
- Tang, E. S. K., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2005). Coating of multiparticulates for sustained release. *American Journal of Drug Delivery*.
- Tantirungrotechai, J., Chotmongkolsap, P., & Pohmakotr, M. (2010). Synthesis, characterization, and activity in transesterification of mesoporous Mg–Al mixed-metal oxides. *Microporous and Mesoporous Materials*, 128(1-3), 41–47. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.08.001>
- Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, 51(2), 149–77. <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>
- Thevissen, K., François, I. E. J. a, Sijtsma, L., van Amerongen, A., Schaaper, W. M. M., Meloen, R., ... Cammue, B. P. a. (2005). Antifungal activity of synthetic peptides derived from *Impatiens balsamina* antimicrobial peptides Ib-AMP1 and Ib-AMP4. *Peptides*, 26(7), 1113–9. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.01.008>
- Thevissen, K., Ghazi, A., Samblanx, W. De, Brownlee, C., Rupert, W., & Broekaert, W. F. (1996). Fungal Membrane Responses Induced by Plant Defensins and Thionins. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 15018–15025. <http://doi.org/10.1074/jbc.271.25.15018>
- Vaara, M., & Nurminen, M. (1999). Outer Membrane Permeability Barrier in *Escherichia coli* Mutants That Are Defective in the Late Acyltransferases of Lipid A Biosynthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), 1459–1462. Retrieved from

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89296/>
- Vallet-Regi, M., Rámila, A., del Real, R. P., & Pérez-Pariente, J. (2001). A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. *Chemistry of Materials*, 13(2), 308–311. <http://doi.org/10.1021/cm0011559>
- van der Kraan, M. I. a, van der Made, C., Nazmi, K., van't Hof, W., Groenink, J., Veerman, E. C. I., ... Nieuw Amerongen, A. V. (2005). Effect of amino acid substitutions on the candidacidal activity of LFampin 265-284. *Peptides*, 26(11), 2093–7. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.03.056>
- van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., & Anderson, M. a. (2013). Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 70(19), 3545–70. <http://doi.org/10.1007/s00018-013-1260-1>
- Vásquez, L. E., Guzmán, F., Patarroyo, M. E., & Arango, R. (2009). IN VITRO EVALUATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES AGAINST *Mycosphaerella fijiensis* MORELET AND THEIR INTERACTION WITH SOME CHEMICAL FUNGICIDES. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*.
- Velandía, A., Santiago, J., Esteban, C., & Teresa, M. (2008). *Moniliophthora roreri* EN CACAO *Teobroma cacao* L., 1–3.
- Wan, Y., & Zhao, D. (2007). On the controllable soft-templating approach to mesoporous silicates. *Chemical Reviews*, 107(7), 2821–60. <http://doi.org/10.1021/cr068020s>
- Wang, P., Bang, J.-K., Kim, H. J., Kim, J.-K., Kim, Y., & Shin, S. Y. (2009). Antimicrobial specificity and mechanism of action of disulfide-removed linear analogs of the plant-derived Cys-rich antimicrobial peptide Ib-AMP1. *Peptides*, 30(12), 2144–9. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.09.020>
- Wang, S. (2009). Ordered mesoporous materials for drug delivery. *Microporous and Mesoporous Materials*, 117(1-2), 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.07.002>
- Wang, Y., Noguchi, M., Takahashi, Y., & Ohtsuka, Y. (2001). Synthesis of SBA-15 with different pore sizes and the utilization as supports of high loading of cobalt catalysts. *Catalysis Today*, 68(1-3), 3–9. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(01\)00317-0](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(01)00317-0)
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Xu, L., Song, H., & Chou, L. (2012). One-Pot Synthesis of Ordered Mesoporous NiO – CaO – Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Composite Oxides for Catalyzing CO<sub>2</sub> Reforming of CH<sub>4</sub>.
- Yau, W. M., Wimley, W. C., Gawrisch, K., & White, S. H. (1998). The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry*, 37(42), 14713–14718.
- Yiu, H. H. P., & Wright, P. a. (2005). Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic–organic hybrid. *Journal of Materials Chemistry*, 15(35-36), 3690. <http://doi.org/10.1039/b506090g>
- Yuan, Q., Yin, A.-X., Luo, C., Sun, L.-D., Zhang, Y.-W., Duan, W.-T., ... Yan, C.-H. (2008). Facile synthesis for ordered mesoporous gamma-aluminas with high thermal stability. *Journal of the American Chemical Society*, 130(11), 3465–3472. <http://doi.org/10.1021/ja0764308>
- Zhang, H., & Cooper, A. I. (2007). Aligned porous structures by directional freezing.

- Advanced Materials*, 19(11), 1529–1533. <http://doi.org/10.1002/adma.200700154>
- 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. <http://doi.org/10.1074/jbc.M104925200>
- Zhang, Y., Chan, H. F., & Leong, K. W. (2013). Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 104–20. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.003>
- Zinieris, N., Leondiadis, L., & Ferderigos, N. (2005). Nalpha-Fmoc removal from resin-bound amino acids by 5% piperidine solution. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 7(1), 4–6. <http://doi.org/10.1021/cc049872d>

## BIBLIOGRAFÍA CAPITULO 2

- Aapptec. (n.d.). *Practical synthesis guide to solid phase peptide chemistry*.
- Addorisio, V., Esposito, S., & Sannino, F. (2010). Sorption capacity of mesoporous metal oxides for the removal of MCPA from polluted waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5011–5016.
- Alves, M. H., Jensen, B. E. B., Smith, A. a a, & Zelikin, A. N. (2011). Poly(vinyl alcohol) physical hydrogels: New vista on a long serving biomaterial. *Macromolecular Bioscience*, 11(10), 1293–1313. <http://doi.org/10.1002/mabi.201100145>
- Amatani, T., Nakanishi, K., Hirao, K., & Kodaira, T. (2005). Monolithic Periodic Mesoporous Silica with Well-Defined Macropores Monolithic Periodic Mesoporous Silica with Well-Defined Macropores. *Chemistry of Materials*, 17(March), 2114–2119. <http://doi.org/10.1021/cm048091c>
- Antonio, P. P. (2013). *Silicatos y alúminosilicatos mesoporosos funcionalizados como catalizadores en reacciones de interés en química fina*. Universidad de Córdoba.
- Arbelaez, L. (2010). *Análisis de la diversidad intraespecie de Moniliophthora roreri por medio de marcadores morfológicos y genéticos*. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/1938/1/43276997.20101.pdf>
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., ... Stockinger, H. (2012). ExpASy: SIB bioinformatics resource portal. Retrieved from <http://www.expasy.org/>
- Ayala Benítez, M. F. (2008). *Manejo integrado de moniliasis (Moniliophthora roreri) en el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.) mediante el uso de fungicidas, combinado con labores culturales*. Escuela superior politecnica del litoral.
- Benoiton, N. L. (2006). *Chemistry of peptide synthesis*. Boca Raton.
- Beveridge, T. J. (1999). Structure of fram-negative cell walls and their derived mebrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, 181(16), 4725–4733.
- Bisht, G. S., Rawat, D. S., Kumar, A., Kumar, R., & Pasha, S. (2007). Antimicrobial activity of rationally designed amino terminal modified peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(15), 4343–6. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.05.015>
- Blanco-Labra, A., & Aguirre Mancilla, C. (2002). Proteínas Involucradas en los mecanismos de defensa de plantas. *Acta Universitaria*, 12(3), 31–43.

- Bolognini, M., Cavani, F., Scagliarini, D., Flego, C., Perego, C., & Saba, M. (2002). Heterogeneous basic catalysts as alternatives to homogeneous catalysts: reactivity of Mg/Al mixed oxides in the alkylation of m-cresol with methanol. *Catalysis Today*, 75(1-4), 103–111. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(02\)00050-0](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(02)00050-0)
- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28(8), 799–808. <http://doi.org/10.1002/bies.20441>
- Brogden, K. a. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 238–50. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Carlos Andres, R. V. (2011). *Síntesis y determinación estructural de péptidos derivados de Dermaseptina con actividad antileishmanial*. Universidad Nacional de Colombia-sede Medellin.
- Chacón Almeyda, A. V. (2014). *Evaluación In Vitro de la actividad antifúngica contra Moniliophthora roreri(Cif. y Par.) Evans Et al. de extratos obtenidos de Justicia secunda Vahl*. Universidad Industrial de Santander.
- Chan, W., & White, P. (2000). *Fmoc solid phase peptide synthesis*. New York: OXFORD University Press. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300043056>
- Chen, Y., Mant, C. T., Farmer, S. W., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2005). Rational Design of  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity / Therapeutic Index \*, 280(13), 12316–12329. <http://doi.org/10.1074/jbc>.
- Cho, S. H., Oh, S. H., & Lee, J. H. (2005). Fabrication and characterization of porous alginate/polyvinyl alcohol hybrid scaffolds for 3D cell culture. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 16(8), 933–947. <http://doi.org/10.1163/1568562054414658>
- Contreras, L. Y. S., & Riaño, A. L. R. (2013). Aislamiento de microorganismos para control biológico de moniliophthora roreri. *Acta Agronomica*, 62, 370–378.
- Das, S. K., Kapoor, S., Yamada, H., & Bhattacharyya, A. J. (2009). Effects of surface acidity and pore size of mesoporous alumina on degree of loading and controlled release of ibuprofen. *Microporous and Mesoporous Materials*, 118(1-3), 267–272. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.08.042>
- Davis, M. E. (2002). Ordered porous materials for Emerging Applications. *Nat*, 417(June), 813–821.
- De Queiroz, Á. a. a., Passos, E. D., De Brito Alves, S., Silva, G. S., Higa, O. Z., & Vítolo, M. (2006). Alginate–poly(vinyl alcohol) core–shell microspheres for lipase immobilization. *Journal of Applied Polymer Science*, 102(2), 1553–1560. <http://doi.org/10.1002/app.23444>
- Degim, I. T., & Celebi, N. (2007). Controlled delivery of peptides and proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 13(1), 99–117. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17266590>
- Dongyuan, Z., Jianglin, F., Qisheng, H., Nicholas, M., Glenn H., F., Bradley F., C., & Galen D., S. (1998). Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science*, 279(5350), 548–552. <http://doi.org/10.1126/science.279.5350.548>

- Espinal G, C. F., Martínez C, H. J., & Peña M, Y. (2005). *La cadena del cacao en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de trabajo No. 92.*
- Everett, D. H. (1972). Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units, Appendix II: Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry. (D. H. Everett, Ed.) *Pure and Applied Chemistry*. London.  
<http://doi.org/10.1351/pac197231040577>
- Fogucri, L. R., & Singh, S. (2009). Smart polymers for controlled delivery of proteins and peptides: a review of patents. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 3(1), 40–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19149728>
- Garcia, M. I., & Le Bouguéneq, C. (1996). Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic Escherichia coli. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 94(3), 201–236. [http://doi.org/10.1016/S0020-2452\(97\)86017-4](http://doi.org/10.1016/S0020-2452(97)86017-4)
- Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents : mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 501–517.
- Glukhov, E., Stark, M., Burrows, L. L., & Deber, C. M. (2005). Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33960–33967.  
<http://doi.org/10.1074/jbc.M507042200>
- Green, R. J., Frazier, R. A., Shakesheff, K. M., Davies, M. C., Roberts, C. J., & Tendler, S. J. . (2000). Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials*, 21(18), 1823–1835. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00077-6](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00077-6)
- Guerrero, R. C. (2010). *Desarrollo de materiales porosos para la sorción de CO2*. Instituto Politécnico Nacional.
- Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., & Monte, F. (2008). Ice-Templated Materials : Sophisticated Structures Exhibiting Enhanced Functionalities Obtained after Unidirectional Freezing. *Chemical Materials*, 20(3), 634–648.
- Gutiérrez, M. C., García-Carvajal, Z. Y., Jobbágy, M., Rubio, F., Yuste, L., Rojo, F., ... del Monte, F. (2007). Poly(vinyl alcohol) Scaffolds with Tailored Morphologies for Drug Delivery and Controlled Release. *Advanced Functional Materials*, 17(17), 3505–3513. <http://doi.org/10.1002/adfm.200700093>
- Guzmán, F., Marshall, S., Ojeda, C., Albericio, F., & Carvajal-Rondanelli, P. (2013). Inhibitory effect of short cationic homopeptides against Gram-positive bacteria. *Journal of Peptide Science*, 19(October), 792–800. <http://doi.org/10.1002/psc.2578>
- Han, C., Li, H., Pu, H., Yu, H., Deng, L., Huang, S., & Luo, Y. (2013). Synthesis and characterization of mesoporous alumina and their performances for removing arsenic(V). *Chemical Engineering Journal*, 217, 1–9.  
<http://doi.org/10.1016/j.cej.2012.11.087>
- Hancock, R. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters*, 206(2), 143–149. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00480-3](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00480-3)
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.04.013>
- Haney, E. F., Petersen, A. P., Lau, C. K., Jing, W., Storey, D. G., & Vogel, H. J. (2013). Mechanism of action of puroidoline derived tryptophan-rich antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(8), 1802–1813. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.03.023>
- Helmerhorst, E. J., Reijnders, I. M., van 't Hof, W., Veerman, E. C., & Nieuw Amerongen, A. V. (1999). A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Letters*, 449(2-3), 105–110. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10338113>
- Hicks, R. W., Castagnola, N. B., Zhang, Z., Pinnavaia, T. J., & Marshall, C. L. (2003). Lathlike mesostructured  $\gamma$ -alumina as a hydrodesulfurization catalyst support, 254, 311–317. [http://doi.org/10.1016/S0926-860X\(03\)00476-9](http://doi.org/10.1016/S0926-860X(03)00476-9)
- International journal of hydrogen energy, 1980. (1980). *International Journal of Hydrogen Energy*. [http://doi.org/10.1016/0360-3199\(80\)90035-X](http://doi.org/10.1016/0360-3199(80)90035-X)
- Jaimes Suárez, Y., & Aranzazu Hernández, F. (2010). *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L) en Colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora roreri)*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA.
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511. <http://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>
- Jiang, Z., Vasil, A. I., Hale, J. D., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2008). Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic  $\alpha$ -helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 90(3), 369–383. <http://doi.org/10.1002/bip.20911>
- Jofré, C., Guzmán, F., Cárdenas, C., Albericio, F., & Marshall, S. H. (2011). A natural peptide and its variants derived from the processing of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) displaying enhanced antimicrobial activity: A novel alternative for the control of bacterial diseases. *Peptides*, 32, 852–858. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.026>
- Johansson, E. M., Córdoba, J. M., & Odén, M. (2009). Synthesis and characterization of large mesoporous silica SBA-15 sheets with ordered accessible 18 nm pores. *Materials Letters*, 63(24-25), 2129–2131. <http://doi.org/10.1016/j.matlet.2009.07.013>
- Kapoor, S., Hegde, R., & Bhattacharyya, A. J. (2009). Influence of surface chemistry of mesoporous alumina with wide pore distribution on controlled drug release. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 140(1), 34–9. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.07.015>
- Kent, S. B. (1988). Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 57(1), 957–89. <http://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.004521>
- Kosmulski, M. (2009). Compilation of PZC and IEP of sparingly soluble metal oxides and hydroxides from literature. *Advances in Colloid and Interface Science*, 152(1-2), 14–25. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2009.08.003>
- Kresge, C. T., & Roth, W. J. (2013). The discovery of mesoporous molecular sieves from the twenty year perspective. *Chemical Society Reviews*, 42(9), 3663–70. <http://doi.org/10.1039/c3cs60016e>
- Krstic, V. (2005, October 26). Catalizadores de Rh-soportado y su aplicación en la hidrogenación de crotonaldehído. Universidad de Cantabria. Retrieved from

- <http://www.tdx.cat/handle/10803/10685>
- Lee, D., Shin, S., Kim, D., Seo, M., & Kang, J. (1999). Antifungal mechanism of a cysteine-rich antimicrobial peptide, Ib-AMP1, from *Impatiens balsamina* against *Candida albicans*. *Biotechnology ...*, 1047–1050. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1005636610512>
- Leofanti, G., Padovan, M., Tozzola, G., & Venturelli, B. (1998). Surface area and pore texture of catalysts. *Catalysis Today*, 41(1-3), 207–219. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(98\)00050-9](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(98)00050-9)
- Li, W., & Zhao, D. (2013). An overview of the synthesis of ordered mesoporous materials. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 49(10), 943–6. <http://doi.org/10.1039/c2cc36964h>
- Llop Hernández, A., Valdés-Dapena Vivanco, M. M., & Zuazo Silva, J. L. (2001). *Microbiología y parasitología médicas*. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
- Lloyd-Williams, P. (1997). *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. New directions in organic and biological chemistry CN - QP551 .L56 1997*. Boca Raton: CRC Press.
- Lozada, B. S., Herrera, L. V., Perea, J. A., Stashenko, E., & Escobar, P. (2012). Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 61(2), 102–110.
- Lu, J. R., Su, T. J., Thirtle, P. N., Thomas, R. K., Rennie, A. R., & Cubitt, R. (1998). The Denaturation of Lysozyme Layers Adsorbed at the Hydrophobic Solid/Liquid Surface Studied by Neutron Reflection. *Journal of Colloid and Interface Science*, 206(1), 212–223. <http://doi.org/10.1006/jcis.1998.5680>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., & Gacto Fernández, M. (2004). *Brock biología de los microorganismos*. México: Prentice Hall Hispanoamericana.
- Márquez-Alvarez, C., Žilková, N., Pérez-Pariente, J., & Čejka, J. (2008). Synthesis, Characterization and Catalytic Applications of Organized Mesoporous Aluminas. *Catalysis Reviews*, 50(2), 222–286. <http://doi.org/10.1080/01614940701804042>
- Marr, A. K., Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(5), 468–72. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.006>
- Matsuura, S., Ishii, R., Itoh, T., Hanaoka, T., Hamakawa, S., Tsunoda, T., & Mizukami, F. (2010). Direct visualization of hetero-enzyme co-encapsulated in mesoporous silicas. *Microporous and Mesoporous Materials*, 127(1-2), 61–66. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.06.029>
- Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1462(1-2), 1–10. [http://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00197-2](http://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00197-2)
- McGinity, J. W., & Felton, L. A. (2008). *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical disage forms*. (J. W. McGinity & L. A. Felton, Eds.) (Third edit). New York.
- Meincken, M., Holroyd, D. L., & Rautenbach, M. (2005). Atomic Force Microscopy Study of the Effect of Antimicrobial Peptides on the Cell Envelope of *Escherichia coli*. *Society*, 49(10), 4085–4092. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4085>

- Miyahara, M., Vinu, A., & Ariga, K. (2007). Adsorption myoglobin over mesoporous silica molecular sieves: Pore size effect and pore-filling model. *Materials Science and Engineering: C*, 27(2), 232–236. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.012>
- Muschert, S., Siepmann, F., Leclercq, B., Carlin, B., & Siepmann, J. (2009). Drug release mechanisms from ethylcellulose: PVA-PEG graft copolymer-coated pellets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.12.007>
- Navarre, W. W., & Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 63(1), 174–229. [http://doi.org/10.1092-2172/99/\\$04.00+0](http://doi.org/10.1092-2172/99/$04.00+0)Barnett, Timothy C.
- Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 464–472. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>
- Niesz, K., Yang, P., & Somorjai, G. a. (2005). Sol-gel synthesis of ordered mesoporous alumina. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, (15), 1986–1987. <http://doi.org/10.1039/b419249d>
- Oficial, G., & Divulga, I. (2005). El control de la moniliasis en el cacao, 23–26.
- Orth, D., Grif, K., Zimmerhackl, L. B., & Würzner, R. (2008). Prevention and treatment of enterohemorrhagic Escherichia coli infections in humans. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 6(1), 101–108. <http://doi.org/10.1586/14787210.6.1.101>
- Pennington, M. W., & Dunn, B. M. (1994). Peptide Synthesis Protocols (In: Methods Mol. Biol. 1994, 35). <http://doi.org/10.1385/0896032736>
- Perullini, A. (2009). *Síntesis de materiales inorgánicos con porosidad controlada para la inmovilización de células: aplicaciones en biorreactores*. Retrieved from [http://bldigital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_4413\\_Perullini.pdf](http://bldigital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4413_Perullini.pdf)
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78–82. [http://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70024-X](http://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70024-X)
- Postgate, J. R., Crumpton, J. E., & Hunter, J. R. (1961). The measurement of bacterial viabilities by slide culture. *Journal of General Microbiology*, 24(1954), 15–24. <http://doi.org/10.1099/00221287-24-1-15>
- Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J. A., & Piedrola-Angulo, G. (1987). *Microbiología y parasitología médica*. Barcelona: Salvat.
- Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(6), 536–47. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>
- Reyes, R. E., Ramírez Saad, H., Solís Galicia, C., Ortiz Herrera, M., & Coria Jiménez, R. (2009). Mecanismos involucrados en la variabilidad del antígeno O de bacterias Gram negativas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 52, 32–43.
- Rink, H. (1987). Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Letters*, 28(33), 3787–3790. [http://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)96384-6](http://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)96384-6)
- Robens, E., Dabrowski, A., & Kutarov, V. V. (2004). Comments on surface structure

- analysis by water and nitrogen adsorption. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 76(2), 647–657. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000221460800030
- Robinson, J. R. (1978). *Sustained and controlled release drug delivery systems* (Vol. 6). M. Dekker.
- Rodríguez, E. (2006). Técnica de reducción de inóculo para controlar la Moniliasis del cacao en Santander. *Revista Corpoica*, 4(4), 68–78. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Técnica+de+reducción+de+inoculo+para+controlar+la+Moniliasis+del+cacao+en+Santander#0>
- Saldarriaga, Y., & Pineda, F. (2001). *Aislamiento de hongos fitopatógenos. Manual de micología aplicada*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Schlossbauer, A., Schaffert, D., Kecht, J., Wagner, E., & Bein, T. (2008). Click Chemistry for High-Density Biofunctionalization of Mesoporous Silica. *Journal of the American Chemical Society*, 130(38), 12558–12559. <http://doi.org/10.1021/ja803018w>
- Slowing, I. I., Trewyn, B. G., & Lin, V. S.-Y. (2007). Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Delivery of Membrane-Impermeable Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 129(28), 8845–8849. <http://doi.org/10.1021/ja0719780>
- Soler-Illia, G. J. D. a a, Sanchez, C., Lebeau, B., & Patarin, J. (2002). Chemical strategies to design textured materials: From microporous and mesoporous oxides to nanonetworks and hierarchical structures. *Chemical Reviews*, 102(11), 4093–4138. <http://doi.org/10.1021/cr0200062>
- Suhrenbrock, L., Radtke, G., Knop, K., & Kleinebudde, P. (2011). Suspension pellet layering using PVA-PEG graft copolymer as a new binder. *International Journal of Pharmaceutics*. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.061>
- Taylor, R. H., Acland, D. P., Attenborough, S., Cammue, B. P., Evans, I. J., Osborn, R. W., ... Broekaert, W. F. (1997). A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(39), 24480–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9305910>
- Tang, E. S. K., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2005). Coating of multiparticulates for sustained release. *American Journal of Drug Delivery*.
- Tantirungrotechai, J., Chotmongkolsap, P., & Pohmakotr, M. (2010). Synthesis, characterization, and activity in transesterification of mesoporous Mg–Al mixed-metal oxides. *Microporous and Mesoporous Materials*, 128(1-3), 41–47. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.08.001>
- Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, 51(2), 149–77. <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>
- Thevissen, K., François, I. E. J. a, Sijtsma, L., van Amerongen, A., Schaaper, W. M. M., Meloen, R., ... Cammue, B. P. a. (2005). Antifungal activity of synthetic peptides derived from *Impatiens balsamina* antimicrobial peptides Ib-AMP1 and Ib-AMP4. *Peptides*, 26(7), 1113–9. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.01.008>
- Thevissen, K., Ghazi, A., Samblanx, W. De, Brownlee, C., Rupert, W., & Broekaert, W. F. (1996). Fungal Membrane Responses Induced by Plant Defensins and Thionins. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 15018–15025. <http://doi.org/10.1074/jbc.271.25.15018>

- Vaara, M., & Nurminen, M. (1999). Outer Membrane Permeability Barrier in *Escherichia coli* Mutants That Are Defective in the Late Acyltransferases of Lipid A Biosynthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), 1459–1462. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89296/>
- Vallet-Regi, M., Rámila, A., del Real, R. P., & Pérez-Pariente, J. (2001). A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. *Chemistry of Materials*, 13(2), 308–311. <http://doi.org/10.1021/cm0011559>
- van der Kraan, M. I. a, van der Made, C., Nazmi, K., van't Hof, W., Groenink, J., Veerman, E. C. I., ... Nieuw Amerongen, A. V. (2005). Effect of amino acid substitutions on the candidacidal activity of LFampin 265-284. *Peptides*, 26(11), 2093–7. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.03.056>
- van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., & Anderson, M. a. (2013). Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 70(19), 3545–70. <http://doi.org/10.1007/s00018-013-1260-1>
- Vásquez, L. E., Guzmán, F., Patarroyo, M. E., & Arango, R. (2009). IN VITRO EVALUATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES AGAINST *Mycosphaerella fijiensis* MORELET AND THEIR INTERACTION WITH SOME CHEMICAL FUNGICIDES. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*.
- Velandía, A., Santiago, J., Esteban, C., & Teresa, M. (2008). *Moniliophthora roreri* EN CACAO *Theobroma cacao* L., 1–3.
- Wan, Y., & Zhao, D. (2007). On the controllable soft-templating approach to mesoporous silicates. *Chemical Reviews*, 107(7), 2821–60. <http://doi.org/10.1021/cr068020s>
- Wang, P., Bang, J.-K., Kim, H. J., Kim, J.-K., Kim, Y., & Shin, S. Y. (2009). Antimicrobial specificity and mechanism of action of disulfide-removed linear analogs of the plant-derived Cys-rich antimicrobial peptide Ib-AMP1. *Peptides*, 30(12), 2144–9. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.09.020>
- Wang, S. (2009). Ordered mesoporous materials for drug delivery. *Microporous and Mesoporous Materials*, 117(1-2), 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.07.002>
- Wang, Y., Noguchi, M., Takahashi, Y., & Ohtsuka, Y. (2001). Synthesis of SBA-15 with different pore sizes and the utilization as supports of high loading of cobalt catalysts. *Catalysis Today*, 68(1-3), 3–9. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(01\)00317-0](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(01)00317-0)
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Xu, L., Song, H., & Chou, L. (2012). One-Pot Synthesis of Ordered Mesoporous NiO – CaO – Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Composite Oxides for Catalyzing CO<sub>2</sub> Reforming of CH<sub>4</sub>.
- Yau, W. M., Wimley, W. C., Gawrisch, K., & White, S. H. (1998). The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry*, 37(42), 14713–14718.
- Yiu, H. H. P., & Wright, P. a. (2005). Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic–organic hybrid. *Journal of Materials Chemistry*, 15(35-36), 3690. <http://doi.org/10.1039/b506090g>
- Yuan, Q., Yin, A.-X., Luo, C., Sun, L.-D., Zhang, Y.-W., Duan, W.-T., ... Yan, C.-H. (2008). Facile synthesis for ordered mesoporous gamma-aluminas with high thermal stability. *Journal of the American Chemical Society*, 130(11), 3465–3472.

<http://doi.org/10.1021/ja0764308>

- Zhang, H., & Cooper, A. I. (2007). Aligned porous structures by directional freezing. *Advanced Materials*, 19(11), 1529–1533. <http://doi.org/10.1002/adma.200700154>
- 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. <http://doi.org/10.1074/jbc.M104925200>
- Zhang, Y., Chan, H. F., & Leong, K. W. (2013). Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 104–20. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.003>
- Zinieris, N., Leondiadis, L., & Ferderigos, N. (2005). Nalpha-Fmoc removal from resin-bound amino acids by 5% piperidine solution. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 7(1), 4–6. <http://doi.org/10.1021/cc049872d>

### BIBLIOGRAFÍA CAPITULO 3

- Aapptec. (n.d.). *Practical synthesis guide to solid phase peptide chemistry*.
- Addorisio, V., Esposito, S., & Sannino, F. (2010). Sorption capacity of mesoporous metal oxides for the removal of MCPA from polluted waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5011–5016.
- Alves, M. H., Jensen, B. E. B., Smith, A. a a, & Zelikin, A. N. (2011). Poly(vinyl alcohol) physical hydrogels: New vista on a long serving biomaterial. *Macromolecular Bioscience*, 11(10), 1293–1313. <http://doi.org/10.1002/mabi.201100145>
- Amatani, T., Nakanishi, K., Hirao, K., & Kodaira, T. (2005). Monolithic Periodic Mesoporous Silica with Well-Defined Macropores Monolithic Periodic Mesoporous Silica with Well-Defined Macropores. *Chemistry of Materials*, 17(March), 2114–2119. <http://doi.org/10.1021/cm048091c>
- Antonio, P. P. (2013). *Silicatos y alúminosilicatos mesoporosos funcionalizados como catalizadores en reacciones de interés en química fina*. Universidad de Córdoba.
- Arbelaez, L. (2010). *Análisis de la diversidad intraespecie de Moniliophthora roreri por medio de marcadores morfológicos y genéticos*. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/1938/1/43276997.20101.pdf>
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., ... Stockinger, H. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. Retrieved from <http://www.expasy.org/>
- Ayala Benítez, M. F. (2008). *Manejo integrado de moniliasis (Moniliophthora roreri) en el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.) mediante el uso de fungicidas, combinado con labores culturales*. Escuela superior politecnica del litoral.
- Benoiton, N. L. (2006). *Chemistry of peptide synthesis*. Boca Raton.
- Beveridge, T. J. (1999). Structure of fram-negative cell walls and their derived mebrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, 181(16), 4725–4733.
- Bisht, G. S., Rawat, D. S., Kumar, A., Kumar, R., & Pasha, S. (2007). Antimicrobial activity of rationally designed amino terminal modified peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(15), 4343–6. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.05.015>

- Blanco-Labra, A., & Aguirre Mancilla, C. (2002). Proteínas Involucradas en los mecanismos de defensa de plantas. *Acta Universitaria*, 12(3), 31–43.
- Bolognini, M., Cavani, F., Scagliarini, D., Flego, C., Perego, C., & Saba, M. (2002). Heterogeneous basic catalysts as alternatives to homogeneous catalysts: reactivity of Mg/Al mixed oxides in the alkylation of m-cresol with methanol. *Catalysis Today*, 75(1-4), 103–111. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(02\)00050-0](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(02)00050-0)
- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28(8), 799–808. <http://doi.org/10.1002/bies.20441>
- Brogden, K. a. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 238–50. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Carlos Andres, R. V. (2011). *Síntesis y determinación estructural de péptidos derivados de Dermaseptina con actividad antileishmanial*. Universidad Nacional de Colombia-sede Medellin.
- Chacón Almeyda, A. V. (2014). *Evaluación In Vitro de la actividad antifúngica contra Moniliophthora roreri(Cif. y Par.) Evans Et al. de extratos obtenidos de Justicia secunda Vahl*. Universidad Industrial de Santander.
- Chan, W., & White, P. (2000). *Fmoc solid phase peptide synthesis*. New York: OXFORD University Press. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300043056>
- Chen, Y., Mant, C. T., Farmer, S. W., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2005). Rational Design of  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity / *Therapeutic Index* \*, 280(13), 12316–12329. <http://doi.org/10.1074/jbc>.
- Cho, S. H., Oh, S. H., & Lee, J. H. (2005). Fabrication and characterization of porous alginate/polyvinyl alcohol hybrid scaffolds for 3D cell culture. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 16(8), 933–947. <http://doi.org/10.1163/1568562054414658>
- Contreras, L. Y. S., & Riaño, A. L. R. (2013). Aislamiento de microorganismos para control biológico de moniliophthora roreri. *Acta Agronomica*, 62, 370–378.
- Das, S. K., Kapoor, S., Yamada, H., & Bhattacharyya, A. J. (2009). Effects of surface acidity and pore size of mesoporous alumina on degree of loading and controlled release of ibuprofen. *Microporous and Mesoporous Materials*, 118(1-3), 267–272. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.08.042>
- Davis, M. E. (2002). Ordered porous materials for Emerging Applications. *Nat*, 417(June), 813–821.
- De Queiroz, Á. a. a., Passos, E. D., De Brito Alves, S., Silva, G. S., Higa, O. Z., & Vítolo, M. (2006). Alginate–poly(vinyl alcohol) core–shell microspheres for lipase immobilization. *Journal of Applied Polymer Science*, 102(2), 1553–1560. <http://doi.org/10.1002/app.23444>
- Degim, I. T., & Celebi, N. (2007). Controlled delivery of peptides and proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 13(1), 99–117. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17266590>
- Dongyuan, Z., Jianglin, F., Qisheng, H., Nicholas, M., Glenn H., F., Bradley F., C., & Galen D., S. (1998). Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to

- 300 Angstrom Pores. *Science*, 279(5350), 548–552.  
<http://doi.org/10.1126/science.279.5350.548>
- Espinal G, C. F., Martínez C, H. J., & Peña M, Y. (2005). *La cadena del cacao en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de trabajo No. 92.*
- Everett, D. H. (1972). Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units, Appendix II: Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry. (D. H. Everett, Ed.) *Pure and Applied Chemistry*. London.  
<http://doi.org/10.1351/pac197231040577>
- Fogucri, L. R., & Singh, S. (2009). Smart polymers for controlled delivery of proteins and peptides: a review of patents. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 3(1), 40–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19149728>
- Garcia, M. I., & Le Bouguéneq, C. (1996). Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic *Escherichia coli*. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 94(3), 201–236. [http://doi.org/10.1016/S0020-2452\(97\)86017-4](http://doi.org/10.1016/S0020-2452(97)86017-4)
- Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents : mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 501–517.
- Glukhov, E., Stark, M., Burrows, L. L., & Deber, C. M. (2005). Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33960–33967.  
<http://doi.org/10.1074/jbc.M507042200>
- Green, R. J., Frazier, R. A., Shakesheff, K. M., Davies, M. C., Roberts, C. J., & Tendler, S. J. . (2000). Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials*, 21(18), 1823–1835. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00077-6](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00077-6)
- Guerrero, R. C. (2010). *Desarrollo de materiales porosos para la sorción de CO2*. Instituto Politécnico Nacional.
- Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., & Monte, F. (2008). Ice-Templated Materials : Sophisticated Structures Exhibiting Enhanced Functionalities Obtained after Unidirectional Freezing. *Chemical Materials*, 20(3), 634–648.
- Gutiérrez, M. C., García-Carvajal, Z. Y., Jobbágy, M., Rubio, F., Yuste, L., Rojo, F., ... del Monte, F. (2007). Poly(vinyl alcohol) Scaffolds with Tailored Morphologies for Drug Delivery and Controlled Release. *Advanced Functional Materials*, 17(17), 3505–3513. <http://doi.org/10.1002/adfm.200700093>
- Guzmán, F., Marshall, S., Ojeda, C., Albericio, F., & Carvajal-Rondanelli, P. (2013). Inhibitory effect of short cationic homopeptides against Gram-positive bacteria. *Journal of Peptide Science*, 19(October), 792–800. <http://doi.org/10.1002/psc.2578>
- Han, C., Li, H., Pu, H., Yu, H., Deng, L., Huang, S., & Luo, Y. (2013). Synthesis and characterization of mesoporous alumina and their performances for removing arsenic(V). *Chemical Engineering Journal*, 217, 1–9.  
<http://doi.org/10.1016/j.cej.2012.11.087>
- Hancock, R. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters*, 206(2), 143–149. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00480-3](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00480-3)

- 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. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.04.013>
- Haney, E. F., Petersen, A. P., Lau, C. K., Jing, W., Storey, D. G., & Vogel, H. J. (2013). Mechanism of action of puroidoline derived tryptophan-rich antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(8), 1802–1813. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.03.023>
- Helmerhorst, E. J., Reijnders, I. M., van 't Hof, W., Veerman, E. C., & Nieuw Amerongen, A. V. (1999). A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Letters*, 449(2-3), 105–110. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10338113>
- Hicks, R. W., Castagnola, N. B., Zhang, Z., Pinnavaia, T. J., & Marshall, C. L. (2003). Lathlike mesostructured  $\gamma$ -alumina as a hydrodesulfurization catalyst support, 254, 311–317. [http://doi.org/10.1016/S0926-860X\(03\)00476-9](http://doi.org/10.1016/S0926-860X(03)00476-9)
- International journal of hydrogen energy, 1980. (1980). *International Journal of Hydrogen Energy*. [http://doi.org/10.1016/0360-3199\(80\)90035-X](http://doi.org/10.1016/0360-3199(80)90035-X)
- Jaimes Suárez, Y., & Aranzazu Hernández, F. (2010). *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L) en Colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora roreri)*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA.
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511. <http://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>
- Jiang, Z., Vasil, A. I., Hale, J. D., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2008). Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic  $\alpha$ -helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 90(3), 369–383. <http://doi.org/10.1002/bip.20911>
- Jofré, C., Guzmán, F., Cárdenas, C., Albericio, F., & Marshall, S. H. (2011). A natural peptide and its variants derived from the processing of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) displaying enhanced antimicrobial activity: A novel alternative for the control of bacterial diseases. *Peptides*, 32, 852–858. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.026>
- Johansson, E. M., Córdoba, J. M., & Odén, M. (2009). Synthesis and characterization of large mesoporous silica SBA-15 sheets with ordered accessible 18 nm pores. *Materials Letters*, 63(24-25), 2129–2131. <http://doi.org/10.1016/j.matlet.2009.07.013>
- Kapoor, S., Hegde, R., & Bhattacharyya, A. J. (2009). Influence of surface chemistry of mesoporous alumina with wide pore distribution on controlled drug release. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 140(1), 34–9. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.07.015>
- Kent, S. B. (1988). Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 57(1), 957–89. <http://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.004521>
- Kosmulski, M. (2009). Compilation of PZC and IEP of sparingly soluble metal oxides and hydroxides from literature. *Advances in Colloid and Interface Science*, 152(1-2), 14–25. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2009.08.003>
- Kresge, C. T., & Roth, W. J. (2013). The discovery of mesoporous molecular sieves from the twenty year perspective. *Chemical Society Reviews*, 42(9), 3663–70. <http://doi.org/10.1039/c3cs60016e>

- Krstic, V. (2005, October 26). Catalizadores de Rh-soportado y su aplicación en la hidrogenación de crotonaldehído. Universidad de Cantabria. Retrieved from <http://www.tdx.cat/handle/10803/10685>
- Lee, D., Shin, S., Kim, D., Seo, M., & Kang, J. (1999). Antifungal mechanism of a cysteine-rich antimicrobial peptide, Ib-AMP1, from *Impatiens balsamina* against *Candida albicans*. *Biotechnology ...*, 1047–1050. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1005636610512>
- Leofanti, G., Padovan, M., Tozzola, G., & Venturelli, B. (1998). Surface area and pore texture of catalysts. *Catalysis Today*, 41(1-3), 207–219. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(98\)00050-9](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(98)00050-9)
- Li, W., & Zhao, D. (2013). An overview of the synthesis of ordered mesoporous materials. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 49(10), 943–6. <http://doi.org/10.1039/c2cc36964h>
- Llop Hernández, A., Valdés-Dapena Vivanco, M. M., & Zuazo Silva, J. L. (2001). *Microbiología y parasitología médicas*. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
- Lloyd-Williams, P. (1997). *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. New directions in organic and biological chemistry CN - QP551 .L56 1997*. Boca Raton: CRC Press.
- Lozada, B. S., Herrera, L. V., Perea, J. A., Stashenko, E., & Escobar, P. (2012). Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 61(2), 102–110.
- Lu, J. R., Su, T. J., Thirtle, P. N., Thomas, R. K., Rennie, A. R., & Cubitt, R. (1998). The Denaturation of Lysozyme Layers Adsorbed at the Hydrophobic Solid/Liquid Surface Studied by Neutron Reflection. *Journal of Colloid and Interface Science*, 206(1), 212–223. <http://doi.org/10.1006/jcis.1998.5680>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., & Gacto Fernández, M. (2004). *Brock biología de los microorganismos*. México: Prentice Hall Hispanoamericana.
- Márquez-Alvarez, C., Žilková, N., Pérez-Pariente, J., & Čejka, J. (2008). Synthesis, Characterization and Catalytic Applications of Organized Mesoporous Aluminas. *Catalysis Reviews*, 50(2), 222–286. <http://doi.org/10.1080/01614940701804042>
- Marr, A. K., Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(5), 468–72. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.006>
- Matsuura, S., Ishii, R., Itoh, T., Hanaoka, T., Hamakawa, S., Tsunoda, T., & Mizukami, F. (2010). Direct visualization of hetero-enzyme co-encapsulated in mesoporous silicas. *Microporous and Mesoporous Materials*, 127(1-2), 61–66. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.06.029>
- Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1462(1-2), 1–10. [http://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00197-2](http://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00197-2)
- McGinity, J. W., & Felton, L. A. (2008). *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms*. (J. W. McGinity & L. A. Felton, Eds.) (Third edit). New York.
- Meincken, M., Holroyd, D. L., & Rautenbach, M. (2005). Atomic Force Microscopy Study of

- the Effect of Antimicrobial Peptides on the Cell Envelope of Escherichia coli. *Society*, 49(10), 4085–4092. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4085>
- Miyahara, M., Vinu, A., & Ariga, K. (2007). Adsorption myoglobin over mesoporous silica molecular sieves: Pore size effect and pore-filling model. *Materials Science and Engineering: C*, 27(2), 232–236. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.012>
- Muschert, S., Siepmann, F., Leclercq, B., Carlin, B., & Siepmann, J. (2009). Drug release mechanisms from ethylcellulose: PVA-PEG graft copolymer-coated pellets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.12.007>
- Navarre, W. W., & Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 63(1), 174–229. [http://doi.org/10.1092-2172/99/\\$04.00+0](http://doi.org/10.1092-2172/99/$04.00+0)Barnett, Timothy C.
- Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 464–472. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>
- Niesz, K., Yang, P., & Somorjai, G. a. (2005). Sol-gel synthesis of ordered mesoporous alumina. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, (15), 1986–1987. <http://doi.org/10.1039/b419249d>
- Oficial, G., & Divulga, I. (2005). El control de la moniliasis en el cacao, 23–26.
- Orth, D., Grif, K., Zimmerhackl, L. B., & Würzner, R. (2008). Prevention and treatment of enterohemorrhagic Escherichia coli infections in humans. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 6(1), 101–108. <http://doi.org/10.1586/14787210.6.1.101>
- Pennington, M. W., & Dunn, B. M. (1994). Peptide Synthesis Protocols (In: Methods Mol. Biol. 1994, 35). <http://doi.org/10.1385/0896032736>
- Perullini, A. (2009). *Síntesis de materiales inorgánicos con porosidad controlada para la inmovilización de células: aplicaciones en biorreactores*. Retrieved from [http://bldigital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_4413\\_Perullini.pdf](http://bldigital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4413_Perullini.pdf)
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78–82. [http://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70024-X](http://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70024-X)
- Postgate, J. R., Crumpton, J. E., & Hunter, J. R. (1961). The measurement of bacterial viabilities by slide culture. *Journal of General Microbiology*, 24(1954), 15–24. <http://doi.org/10.1099/00221287-24-1-15>
- Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J. A., & Piedrola-Angulo, G. (1987). *Microbiología y parasitología médica*. Barcelona: Salvat.
- Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(6), 536–47. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>
- Reyes, R. E., Ramírez Saad, H., Solís Galicia, C., Ortiz Herrera, M., & Coria Jiménez, R. (2009). Mecanismos involucrados en la variabilidad del antígeno O de bacterias Gram negativas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 52, 32–43.
- Rink, H. (1987). Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Letters*, 28(33), 3787–3790.

[http://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)96384-6](http://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)96384-6)

- Robens, E., Dabrowski, A., & Kutarov, V. V. (2004). Comments on surface structure analysis by water and nitrogen adsorption. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 76(2), 647–657. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000221460800030
- Robinson, J. R. (1978). *Sustained and controlled release drug delivery systems* (Vol. 6). M. Dekker.
- Rodríguez, E. (2006). Técnica de reducción de inóculo para controlar la Moniliasis del cacao en Santander. *Revista Corpoica*, 4(4), 68–78. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Técnica+de+reducción+de+inoculo+para+controlar+la+Moniliasis+del+cacao+en+Santander#0>
- Saldarriaga, Y., & Pineda, F. (2001). *Aislamiento de hongos fitopatógenos. Manual de micología aplicada*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Schlossbauer, A., Schaffert, D., Kecht, J., Wagner, E., & Bein, T. (2008). Click Chemistry for High-Density Biofunctionalization of Mesoporous Silica. *Journal of the American Chemical Society*, 130(38), 12558–12559. <http://doi.org/10.1021/ja803018w>
- Slowing, I. I., Trewyn, B. G., & Lin, V. S.-Y. (2007). Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Delivery of Membrane-Impermeable Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 129(28), 8845–8849. <http://doi.org/10.1021/ja0719780>
- Soler-Illia, G. J. D. a a, Sanchez, C., Lebeau, B., & Patarin, J. (2002). Chemical strategies to design textured materials: From microporous and mesoporous oxides to nanonetworks and hierarchical structures. *Chemical Reviews*, 102(11), 4093–4138. <http://doi.org/10.1021/cr0200062>
- Suhrenbrock, L., Radtke, G., Knop, K., & Kleinebudde, P. (2011). Suspension pellet layering using PVA-PEG graft copolymer as a new binder. *International Journal of Pharmaceutics*. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.061>
- Taylor, R. H., Acland, D. P., Attenborough, S., Cammue, B. P., Evans, I. J., Osborn, R. W., ... Broekaert, W. F. (1997). A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(39), 24480–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9305910>
- Tang, E. S. K., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2005). Coating of multiparticulates for sustained release. *American Journal of Drug Delivery*.
- Tantirungrotechai, J., Chotmongkolsap, P., & Pohmakotr, M. (2010). Synthesis, characterization, and activity in transesterification of mesoporous Mg–Al mixed-metal oxides. *Microporous and Mesoporous Materials*, 128(1-3), 41–47. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.08.001>
- Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, 51(2), 149–77. <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>
- Thevissen, K., François, I. E. J. a, Sijtsma, L., van Amerongen, A., Schaaper, W. M. M., Meloen, R., ... Cammue, B. P. a. (2005). Antifungal activity of synthetic peptides derived from *Impatiens balsamina* antimicrobial peptides Ib-AMP1 and Ib-AMP4. *Peptides*, 26(7), 1113–9. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.01.008>
- Thevissen, K., Ghazi, A., Samblanx, W. De, Brownlee, C., Rupert, W., & Broekaert, W. F. (1996). Fungal Membrane Responses Induced by Plant Defensins and Thionins. *The*

- Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 15018–15025.  
<http://doi.org/10.1074/jbc.271.25.15018>
- Vaara, M., & Nurminen, M. (1999). Outer Membrane Permeability Barrier in *Escherichia coli* Mutants That Are Defective in the Late Acyltransferases of Lipid A Biosynthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), 1459–1462. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89296/>
- Vallet-Regi, M., Rámila, A., del Real, R. P., & Pérez-Pariente, J. (2001). A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. *Chemistry of Materials*, 13(2), 308–311.  
<http://doi.org/10.1021/cm0011559>
- van der Kraan, M. I. a, van der Made, C., Nazmi, K., van't Hof, W., Groenink, J., Veerman, E. C. I., ... Nieuw Amerongen, A. V. (2005). Effect of amino acid substitutions on the candidacidal activity of LFampin 265-284. *Peptides*, 26(11), 2093–7.  
<http://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.03.056>
- van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., & Anderson, M. a. (2013). Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 70(19), 3545–70. <http://doi.org/10.1007/s00018-013-1260-1>
- Vásquez, L. E., Guzmán, F., Patarroyo, M. E., & Arango, R. (2009). IN VITRO EVALUATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES AGAINST *Mycosphaerella fijiensis* MORELET AND THEIR INTERACTION WITH SOME CHEMICAL FUNGICIDES. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*.
- Velandía, A., Santiago, J., Esteban, C., & Teresa, M. (2008). *Moniliophthora roreri* EN CACAO *Theobroma cacao* L ., 1–3.
- Wan, Y., & Zhao, D. (2007). On the controllable soft-templating approach to mesoporous silicates. *Chemical Reviews*, 107(7), 2821–60. <http://doi.org/10.1021/cr068020s>
- Wang, P., Bang, J.-K., Kim, H. J., Kim, J.-K., Kim, Y., & Shin, S. Y. (2009). Antimicrobial specificity and mechanism of action of disulfide-removed linear analogs of the plant-derived Cys-rich antimicrobial peptide Ib-AMP1. *Peptides*, 30(12), 2144–9.  
<http://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.09.020>
- Wang, S. (2009). Ordered mesoporous materials for drug delivery. *Microporous and Mesoporous Materials*, 117(1-2), 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.07.002>
- Wang, Y., Noguchi, M., Takahashi, Y., & Ohtsuka, Y. (2001). Synthesis of SBA-15 with different pore sizes and the utilization as supports of high loading of cobalt catalysts. *Catalysis Today*, 68(1-3), 3–9. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(01\)00317-0](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(01)00317-0)
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Xu, L., Song, H., & Chou, L. (2012). One-Pot Synthesis of Ordered Mesoporous NiO – CaO – Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Composite Oxides for Catalyzing CO<sub>2</sub> Reforming of CH<sub>4</sub>.
- Yau, W. M., Wimley, W. C., Gawrisch, K., & White, S. H. (1998). The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry*, 37(42), 14713–14718.
- Yiu, H. H. P., & Wright, P. a. (2005). Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic–organic hybrid. *Journal of Materials Chemistry*, 15(35-36), 3690. <http://doi.org/10.1039/b506090g>

- Yuan, Q., Yin, A.-X., Luo, C., Sun, L.-D., Zhang, Y.-W., Duan, W.-T., ... Yan, C.-H. (2008). Facile synthesis for ordered mesoporous gamma-aluminas with high thermal stability. *Journal of the American Chemical Society*, 130(11), 3465–3472. <http://doi.org/10.1021/ja0764308>
- Zhang, H., & Cooper, A. I. (2007). Aligned porous structures by directional freezing. *Advanced Materials*, 19(11), 1529–1533. <http://doi.org/10.1002/adma.200700154>
- 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. <http://doi.org/10.1074/jbc.M104925200>
- Zhang, Y., Chan, H. F., & Leong, K. W. (2013). Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 104–20. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.003>
- Zinieris, N., Leondiadis, L., & Ferderigos, N. (2005). Nalpha-Fmoc removal from resin-bound amino acids by 5% piperidine solution. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 7(1), 4–6. <http://doi.org/10.1021/cc049872d>

#### BIBLIOGRAFÍA CAPITULO 4

- Aapptec. (n.d.). *Practical synthesis guide to solid phase peptide chemistry*.
- Addorisio, V., Esposito, S., & Sannino, F. (2010). Sorption capacity of mesoporous metal oxides for the removal of MCPA from polluted waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5011–5016.
- Alves, M. H., Jensen, B. E. B., Smith, A. a a, & Zelikin, A. N. (2011). Poly(vinyl alcohol) physical hydrogels: New vista on a long serving biomaterial. *Macromolecular Bioscience*, 11(10), 1293–1313. <http://doi.org/10.1002/mabi.201100145>
- Amatani, T., Nakanishi, K., Hirao, K., & Kodaira, T. (2005). Monolithic Periodic Mesoporous Silica with Well-Defined Macropores Monolithic Periodic Mesoporous Silica with Well-Defined Macropores. *Chemistry of Materials*, 17(March), 2114–2119. <http://doi.org/10.1021/cm048091c>
- Antonio, P. P. (2013). *Silicatos y alúminosilicatos mesoporosos funcionalizados como catalizadores en reacciones de interés en química fina*. Universidad de Córdoba.
- Arbelaez, L. (2010). *Análisis de la diversidad intraespecie de Moniliophthora roreri por medio de marcadores morfológicos y genéticos*. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/1938/1/43276997.20101.pdf>
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., ... Stockinger, H. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. Retrieved from <http://www.expasy.org/>
- Ayala Benítez, M. F. (2008). *Manejo integrado de moniliasis (Moniliophthora roreri) en el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.) mediante el uso de fungicidas, combinado con labores culturales*. Escuela superior politecnica del litoral.
- Benoiton, N. L. (2006). *Chemistry of peptide synthesis*. Boca Raton.
- Beveridge, T. J. (1999). Structure of fram-negative cell walls and their derived mebrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, 181(16), 4725–4733.

- Bisht, G. S., Rawat, D. S., Kumar, A., Kumar, R., & Pasha, S. (2007). Antimicrobial activity of rationally designed amino terminal modified peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(15), 4343–6. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.05.015>
- Blanco-Labra, A., & Aguirre Mancilla, C. (2002). Proteínas Involucradas en los mecanismos de defensa de plantas. *Acta Universitaria*, 12(3), 31–43.
- Bolognini, M., Cavani, F., Scagliarini, D., Flego, C., Perego, C., & Saba, M. (2002). Heterogeneous basic catalysts as alternatives to homogeneous catalysts: reactivity of Mg/Al mixed oxides in the alkylation of m-cresol with methanol. *Catalysis Today*, 75(1-4), 103–111. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(02\)00050-0](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(02)00050-0)
- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28(8), 799–808. <http://doi.org/10.1002/bies.20441>
- Brogden, K. a. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 238–50. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Carlos Andres, R. V. (2011). *Síntesis y determinación estructural de péptidos derivados de Dermaseptina con actividad antileishmanial*. Universidad Nacional de Colombia-sede Medellín.
- Chacón Almeyda, A. V. (2014). *Evaluación In Vitro de la actividad antifúngica contra Moniliophthora roreri (Cif. y Par.) Evans Et al. de extratos obtenidos de Justicia secunda Vahl*. Universidad Industrial de Santander.
- Chan, W., & White, P. (2000). *Fmoc solid phase peptide synthesis*. New York: OXFORD University Press. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300043056>
- Chen, Y., Mant, C. T., Farmer, S. W., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2005). Rational Design of  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity / Therapeutic Index \*, 280(13), 12316–12329. <http://doi.org/10.1074/jbc>.
- Cho, S. H., Oh, S. H., & Lee, J. H. (2005). Fabrication and characterization of porous alginate/polyvinyl alcohol hybrid scaffolds for 3D cell culture. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 16(8), 933–947. <http://doi.org/10.1163/1568562054414658>
- Contreras, L. Y. S., & Riaño, A. L. R. (2013). Aislamiento de microorganismos para control biológico de moniliophthora roreri. *Acta Agronomica*, 62, 370–378.
- Das, S. K., Kapoor, S., Yamada, H., & Bhattacharyya, A. J. (2009). Effects of surface acidity and pore size of mesoporous alumina on degree of loading and controlled release of ibuprofen. *Microporous and Mesoporous Materials*, 118(1-3), 267–272. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.08.042>
- Davis, M. E. (2002). Ordered porous materials for Emerging Applications. *Nat*, 417(June), 813–821.
- De Queiroz, Á. a. a., Passos, E. D., De Brito Alves, S., Silva, G. S., Higa, O. Z., & Vítolo, M. (2006). Alginate–poly(vinyl alcohol) core–shell microspheres for lipase immobilization. *Journal of Applied Polymer Science*, 102(2), 1553–1560. <http://doi.org/10.1002/app.23444>
- Degim, I. T., & Celebi, N. (2007). Controlled delivery of peptides and proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 13(1), 99–117. Retrieved from

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17266590>
- Dongyuan, Z., Jianglin, F., Qisheng, H., Nicholas, M., Glenn H., F., Bradley F., C., & Galen D., S. (1998). Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science*, 279(5350), 548–552. <http://doi.org/10.1126/science.279.5350.548>
- Espinal G, C. F., Martínez C, H. J., & Peña M, Y. (2005). *La cadena del cacao en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de trabajo No. 92.*
- Everett, D. H. (1972). Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units, Appendix II: Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry. (D. H. Everett, Ed.) *Pure and Applied Chemistry*. London. <http://doi.org/10.1351/pac197231040577>
- Fogucri, L. R., & Singh, S. (2009). Smart polymers for controlled delivery of proteins and peptides: a review of patents. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 3(1), 40–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19149728>
- Garcia, M. I., & Le Bouguéneq, C. (1996). Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic Escherichia coli. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 94(3), 201–236. [http://doi.org/10.1016/S0020-2452\(97\)86017-4](http://doi.org/10.1016/S0020-2452(97)86017-4)
- Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents : mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 501–517.
- Glukhov, E., Stark, M., Burrows, L. L., & Deber, C. M. (2005). Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33960–33967. <http://doi.org/10.1074/jbc.M507042200>
- Green, R. J., Frazier, R. A., Shakesheff, K. M., Davies, M. C., Roberts, C. J., & Tendler, S. J. . (2000). Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials*, 21(18), 1823–1835. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00077-6](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00077-6)
- Guerrero, R. C. (2010). *Desarrollo de materiales porosos para la sorción de CO2*. Instituto Politécnico Nacional.
- Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., & Monte, F. (2008). Ice-Templated Materials : Sophisticated Structures Exhibiting Enhanced Functionalities Obtained after Unidirectional Freezing. *Chemical Materials*, 20(3), 634–648.
- Gutiérrez, M. C., García-Carvajal, Z. Y., Jobbágy, M., Rubio, F., Yuste, L., Rojo, F., ... del Monte, F. (2007). Poly(vinyl alcohol) Scaffolds with Tailored Morphologies for Drug Delivery and Controlled Release. *Advanced Functional Materials*, 17(17), 3505–3513. <http://doi.org/10.1002/adfm.200700093>
- Guzmán, F., Marshall, S., Ojeda, C., Albericio, F., & Carvajal-Rondanelli, P. (2013). Inhibitory effect of short cationic homopeptides against Gram-positive bacteria. *Journal of Peptide Science*, 19(October), 792–800. <http://doi.org/10.1002/psc.2578>
- Han, C., Li, H., Pu, H., Yu, H., Deng, L., Huang, S., & Luo, Y. (2013). Synthesis and characterization of mesoporous alumina and their performances for removing arsenic(V). *Chemical Engineering Journal*, 217, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2012.11.087>

- Hancock, R. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters*, 206(2), 143–149. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00480-3](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00480-3)
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.04.013>
- Haney, E. F., Petersen, A. P., Lau, C. K., Jing, W., Storey, D. G., & Vogel, H. J. (2013). Mechanism of action of puroindoline derived tryptophan-rich antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(8), 1802–1813. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.03.023>
- Helmerhorst, E. J., Reijnders, I. M., van 't Hof, W., Veerman, E. C., & Nieuw Amerongen, a V. (1999). A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Letters*, 449(2-3), 105–110. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10338113>
- Hicks, R. W., Castagnola, N. B., Zhang, Z., Pinnavaia, T. J., & Marshall, C. L. (2003). Lathlike mesostructured  $\gamma$ -alumina as a hydrodesulfurization catalyst support, 254, 311–317. [http://doi.org/10.1016/S0926-860X\(03\)00476-9](http://doi.org/10.1016/S0926-860X(03)00476-9)
- International journal of hydrogen energy, 1980. (1980). *International Journal of Hydrogen Energy*. [http://doi.org/10.1016/0360-3199\(80\)90035-X](http://doi.org/10.1016/0360-3199(80)90035-X)
- Jaimes Suárez, Y., & Aranzazu Hernández, F. (2010). *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L) en Colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora roreri)*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA.
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511. <http://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>
- Jiang, Z., Vasil, A. I., Hale, J. D., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2008). Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic  $\alpha$ -helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 90(3), 369–383. <http://doi.org/10.1002/bip.20911>
- Jofré, C., Guzmán, F., Cárdenas, C., Albericio, F., & Marshall, S. H. (2011). A natural peptide and its variants derived from the processing of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) displaying enhanced antimicrobial activity: A novel alternative for the control of bacterial diseases. *Peptides*, 32, 852–858. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.026>
- Johansson, E. M., Córdoba, J. M., & Odén, M. (2009). Synthesis and characterization of large mesoporous silica SBA-15 sheets with ordered accessible 18 nm pores. *Materials Letters*, 63(24-25), 2129–2131. <http://doi.org/10.1016/j.matlet.2009.07.013>
- Kapoor, S., Hegde, R., & Bhattacharyya, A. J. (2009). Influence of surface chemistry of mesoporous alumina with wide pore distribution on controlled drug release. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 140(1), 34–9. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.07.015>
- Kent, S. B. (1988). Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 57(1), 957–89. <http://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.004521>
- Kosmulski, M. (2009). Compilation of PZC and IEP of sparingly soluble metal oxides and hydroxides from literature. *Advances in Colloid and Interface Science*, 152(1-2), 14–25. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2009.08.003>

- Kresge, C. T., & Roth, W. J. (2013). The discovery of mesoporous molecular sieves from the twenty year perspective. *Chemical Society Reviews*, 42(9), 3663–70. <http://doi.org/10.1039/c3cs60016e>
- Krstic, V. (2005, October 26). Catalizadores de Rh-soportado y su aplicación en la hidrogenación de crotonaldehído. Universidad de Cantabria. Retrieved from <http://www.tdx.cat/handle/10803/10685>
- Lee, D., Shin, S., Kim, D., Seo, M., & Kang, J. (1999). Antifungal mechanism of a cysteine-rich antimicrobial peptide, Ib-AMP1, from *Impatiens balsamina* against *Candida albicans*. *Biotechnology ...*, 1047–1050. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1005636610512>
- Leofanti, G., Padovan, M., Tozzola, G., & Venturelli, B. (1998). Surface area and pore texture of catalysts. *Catalysis Today*, 41(1-3), 207–219. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(98\)00050-9](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(98)00050-9)
- Li, W., & Zhao, D. (2013). An overview of the synthesis of ordered mesoporous materials. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 49(10), 943–6. <http://doi.org/10.1039/c2cc36964h>
- Llop Hernández, A., Valdés-Dapena Vivanco, M. M., & Zuazo Silva, J. L. (2001). *Microbiología y parasitología médicas*. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
- Lloyd-Williams, P. (1997). *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. New directions in organic and biological chemistry CN - QP551 .L56 1997*. Boca Raton: CRC Press.
- Lozada, B. S., Herrera, L. V., Perea, J. A., Stashenko, E., & Escobar, P. (2012). Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 61(2), 102–110.
- Lu, J. R., Su, T. J., Thirtle, P. N., Thomas, R. K., Rennie, A. R., & Cubitt, R. (1998). The Denaturation of Lysozyme Layers Adsorbed at the Hydrophobic Solid/Liquid Surface Studied by Neutron Reflection. *Journal of Colloid and Interface Science*, 206(1), 212–223. <http://doi.org/10.1006/jcis.1998.5680>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., & Gacto Fernández, M. (2004). *Brock biología de los microorganismos*. México: Prentice Hall Hispanoamericana.
- Márquez-Alvarez, C., Žilková, N., Pérez-Pariente, J., & Čejka, J. (2008). Synthesis, Characterization and Catalytic Applications of Organized Mesoporous Aluminas. *Catalysis Reviews*, 50(2), 222–286. <http://doi.org/10.1080/01614940701804042>
- Marr, A. K., Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(5), 468–72. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.006>
- Matsuura, S., Ishii, R., Itoh, T., Hanaoka, T., Hamakawa, S., Tsunoda, T., & Mizukami, F. (2010). Direct visualization of hetero-enzyme co-encapsulated in mesoporous silicas. *Microporous and Mesoporous Materials*, 127(1-2), 61–66. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.06.029>
- Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1462(1-2), 1–10. [http://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00197-2](http://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00197-2)

- McGinity, J. W., & Felton, L. A. (2008). *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms*. (J. W. McGinity & L. A. Felton, Eds.) (Third edit). New York.
- Meincken, M., Holroyd, D. L., & Rautenbach, M. (2005). Atomic Force Microscopy Study of the Effect of Antimicrobial Peptides on the Cell Envelope of Escherichia coli. *Society*, 49(10), 4085–4092. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4085>
- Miyahara, M., Vinu, A., & Ariga, K. (2007). Adsorption myoglobin over mesoporous silica molecular sieves: Pore size effect and pore-filling model. *Materials Science and Engineering: C*, 27(2), 232–236. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.012>
- Muschert, S., Siepmann, F., Leclercq, B., Carlin, B., & Siepmann, J. (2009). Drug release mechanisms from ethylcellulose: PVA-PEG graft copolymer-coated pellets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.12.007>
- Navarre, W. W., & Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 63(1), 174–229. [http://doi.org/10.1092-2172/99/\\$04.00+0](http://doi.org/10.1092-2172/99/$04.00+0)Barnett, Timothy C.
- Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 464–472. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>
- Niesz, K., Yang, P., & Somorjai, G. a. (2005). Sol-gel synthesis of ordered mesoporous alumina. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, (15), 1986–1987. <http://doi.org/10.1039/b419249d>
- Oficial, G., & Divulga, I. (2005). El control de la moniliasis en el cacao, 23–26.
- Orth, D., Grif, K., Zimmerhackl, L. B., & Würzner, R. (2008). Prevention and treatment of enterohemorrhagic Escherichia coli infections in humans. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 6(1), 101–108. <http://doi.org/10.1586/14787210.6.1.101>
- Pennington, M. W., & Dunn, B. M. (1994). Peptide Synthesis Protocols (In: Methods Mol. Biol. 1994, 35). <http://doi.org/10.1385/0896032736>
- Perullini, A. (2009). *Síntesis de materiales inorgánicos con porosidad controlada para la inmovilización de células: aplicaciones en biorreactores*. Retrieved from [http://bldigital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_4413\\_Perullini.pdf](http://bldigital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4413_Perullini.pdf)
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78–82. [http://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70024-X](http://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70024-X)
- Postgate, J. R., Crumpton, J. E., & Hunter, J. R. (1961). The measurement of bacterial viabilities by slide culture. *Journal of General Microbiology*, 24(1954), 15–24. <http://doi.org/10.1099/00221287-24-1-15>
- Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J. A., & Piedrola-Angulo, G. (1987). *Microbiología y parasitología médica*. Barcelona: Salvat.
- Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(6), 536–47. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>
- Reyes, R. E., Ramírez Saad, H., Solís Galicia, C., Ortiz Herrera, M., & Coria Jiménez, R. (2009). Mecanismos involucrados en la variabilidad del antígeno O de bacterias

- Gram negativas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 52, 32–43.
- Rink, H. (1987). Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Letters*, 28(33), 3787–3790. [http://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)96384-6](http://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)96384-6)
- Robens, E., Dabrowski, A., & Kutarov, V. V. (2004). Comments on surface structure analysis by water and nitrogen adsorption. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 76(2), 647–657. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000221460800030
- Robinson, J. R. (1978). *Sustained and controlled release drug delivery systems* (Vol. 6). M. Dekker.
- Rodríguez, E. (2006). Técnica de reducción de inóculo para controlar la Moniliasis del cacao en Santander. *Revista Corpoica*, 4(4), 68–78. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Técnica+de+reducción+de+inoculo+para+controlar+la+Moniliasis+del+cacao+en+Santander#0>
- Saldarriaga, Y., & Pineda, F. (2001). *Aislamiento de hongos fitopatógenos. Manual de micología aplicada*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Schlossbauer, A., Schaffert, D., Kecht, J., Wagner, E., & Bein, T. (2008). Click Chemistry for High-Density Biofunctionalization of Mesoporous Silica. *Journal of the American Chemical Society*, 130(38), 12558–12559. <http://doi.org/10.1021/ja803018w>
- Slowing, I. I., Trewyn, B. G., & Lin, V. S.-Y. (2007). Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Delivery of Membrane-Impermeable Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 129(28), 8845–8849. <http://doi.org/10.1021/ja0719780>
- Soler-Illia, G. J. D. a a, Sanchez, C., Lebeau, B., & Patarin, J. (2002). Chemical strategies to design textured materials: From microporous and mesoporous oxides to nanonetworks and hierarchical structures. *Chemical Reviews*, 102(11), 4093–4138. <http://doi.org/10.1021/cr0200062>
- Suhrenbrock, L., Radtke, G., Knop, K., & Kleinebudde, P. (2011). Suspension pellet layering using PVA-PEG graft copolymer as a new binder. *International Journal of Pharmaceutics*. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.061>
- Taylor, R. H., Acland, D. P., Attenborough, S., Cammue, B. P., Evans, I. J., Osborn, R. W., ... Broekaert, W. F. (1997). A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(39), 24480–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9305910>
- Tang, E. S. K., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2005). Coating of multiparticulates for sustained release. *American Journal of Drug Delivery*.
- Tantirungrotechai, J., Chotmongkolsap, P., & Pohmakotr, M. (2010). Synthesis, characterization, and activity in transesterification of mesoporous Mg–Al mixed-metal oxides. *Microporous and Mesoporous Materials*, 128(1-3), 41–47. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.08.001>
- Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, 51(2), 149–77. <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>
- Thevissen, K., François, I. E. J. a, Sijtsma, L., van Amerongen, A., Schaaper, W. M. M., Meloen, R., ... Cammue, B. P. a. (2005). Antifungal activity of synthetic peptides derived from *Impatiens balsamina* antimicrobial peptides Ib-AMP1 and Ib-AMP4.

- Peptides*, 26(7), 1113–9. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.01.008>
- Thevissen, K., Ghazi, A., Samblanx, W. De, Brownlee, C., Rupert, W., & Broekaert, W. F. (1996). Fungal Membrane Responses Induced by Plant Defensins and Thionins. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 15018–15025. <http://doi.org/10.1074/jbc.271.25.15018>
- Vaara, M., & Nurminen, M. (1999). Outer Membrane Permeability Barrier in Escherichia coli Mutants That Are Defective in the Late Acyltransferases of Lipid A Biosynthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), 1459–1462. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89296/>
- Vallet-Regi, M., Rámila, A., del Real, R. P., & Pérez-Pariente, J. (2001). A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. *Chemistry of Materials*, 13(2), 308–311. <http://doi.org/10.1021/cm0011559>
- van der Kraan, M. I. a, van der Made, C., Nazmi, K., van't Hof, W., Groenink, J., Veerman, E. C. I., ... Nieuw Amerongen, A. V. (2005). Effect of amino acid substitutions on the candidacidal activity of LFampin 265-284. *Peptides*, 26(11), 2093–7. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.03.056>
- van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., & Anderson, M. a. (2013). Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 70(19), 3545–70. <http://doi.org/10.1007/s00018-013-1260-1>
- Vásquez, L. E., Guzmán, F., Patarroyo, M. E., & Arango, R. (2009). IN VITRO EVALUATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES AGAINST Mycosphaerella fijiensis MORELET AND THEIR INTERACTION WITH SOME CHEMICAL FUNGICIDES. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*.
- Velandía, A., Santiago, J., Esteban, C., & Teresa, M. (2008). Moniliophthora roreri EN CACAO Teobroma cacao L., 1–3.
- Wan, Y., & Zhao, D. (2007). On the controllable soft-templating approach to mesoporous silicates. *Chemical Reviews*, 107(7), 2821–60. <http://doi.org/10.1021/cr068020s>
- Wang, P., Bang, J.-K., Kim, H. J., Kim, J.-K., Kim, Y., & Shin, S. Y. (2009). Antimicrobial specificity and mechanism of action of disulfide-removed linear analogs of the plant-derived Cys-rich antimicrobial peptide Ib-AMP1. *Peptides*, 30(12), 2144–9. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.09.020>
- Wang, S. (2009). Ordered mesoporous materials for drug delivery. *Microporous and Mesoporous Materials*, 117(1-2), 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.07.002>
- Wang, Y., Noguchi, M., Takahashi, Y., & Ohtsuka, Y. (2001). Synthesis of SBA-15 with different pore sizes and the utilization as supports of high loading of cobalt catalysts. *Catalysis Today*, 68(1-3), 3–9. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(01\)00317-0](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(01)00317-0)
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Xu, L., Song, H., & Chou, L. (2012). One-Pot Synthesis of Ordered Mesoporous NiO – CaO – Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Composite Oxides for Catalyzing CO<sub>2</sub> Reforming of CH<sub>4</sub>.
- Yau, W. M., Wimley, W. C., Gawrisch, K., & White, S. H. (1998). The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry*, 37(42), 14713–14718.

- Yiu, H. H. P., & Wright, P. a. (2005). Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic–organic hybrid. *Journal of Materials Chemistry*, 15(35-36), 3690. <http://doi.org/10.1039/b506090g>
- Yuan, Q., Yin, A.-X., Luo, C., Sun, L.-D., Zhang, Y.-W., Duan, W.-T., ... Yan, C.-H. (2008). Facile synthesis for ordered mesoporous gamma-aluminas with high thermal stability. *Journal of the American Chemical Society*, 130(11), 3465–3472. <http://doi.org/10.1021/ja0764308>
- Zhang, H., & Cooper, A. I. (2007). Aligned porous structures by directional freezing. *Advanced Materials*, 19(11), 1529–1533. <http://doi.org/10.1002/adma.200700154>
- 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. <http://doi.org/10.1074/jbc.M104925200>
- Zhang, Y., Chan, H. F., & Leong, K. W. (2013). Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 104–20. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.003>
- Zinieris, N., Leondiadis, L., & Ferderigos, N. (2005). Nalpha-Fmoc removal from resin-bound amino acids by 5% piperidine solution. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 7(1), 4–6. <http://doi.org/10.1021/cc049872d>

**ANEXO A.**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO: TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE**

**CONSENTIMIENTO**

Tras haber recibido información verbal clara y sencilla sobre la toma de muestras de sangre, he podido realizar preguntas y aclarar dudas sobre qué es, cómo se hace y para que serán utilizadas las muestras.

Así tras haber comprendido la información recibida, doy libremente mi consentimiento para la toma de la muestra de sangre.

Bucaramanga, Junio 15 de 2013.

*Jose Luis Ropero*

Jose Luis Ropero Vega

Voluntario

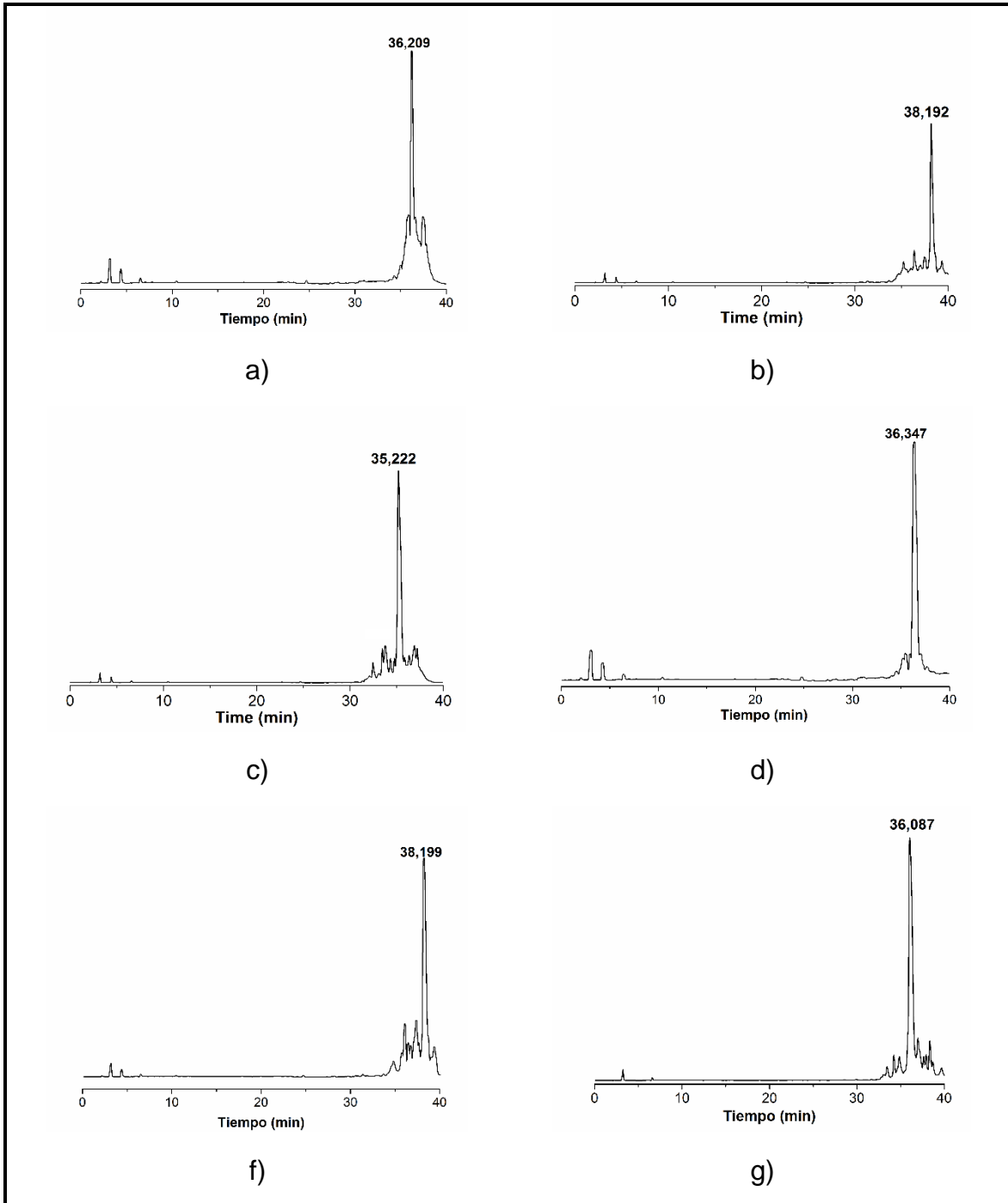
*Johanna M. Flórez C.*

Johanna Marcela Flórez Castillo

Investigadora

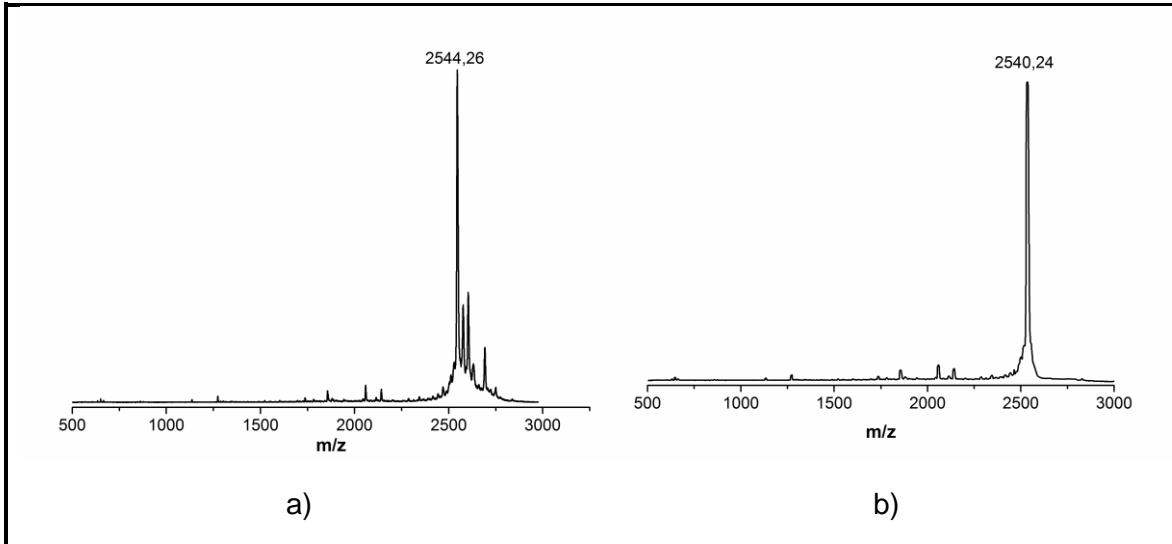
ANEXO B.

Figura B. Perfiles cromatográficos de los péptidos a) Ib-A1, b) Ib-A2, c) Ib-A3, d) Ib-A4, e) Ib-A5 y f) Ib-A6.



**ANEXO C.**

**Figura C.1.** Espectro de masas para el péptido Ib-AMP4 a) sin oxidar y b) oxidado



**Anexo C.** Espectros de masas MALDI-TOF del péptido Ib-AMP4 y sus análogos sintéticos.

**Figura C.2.** Espectros de masas obtenidos para los péptidos a) Ib-A1, b) Ib-A2, c) Ib-A3, d) Ib-A4, e) Ib-A5 y f) Ib-A6

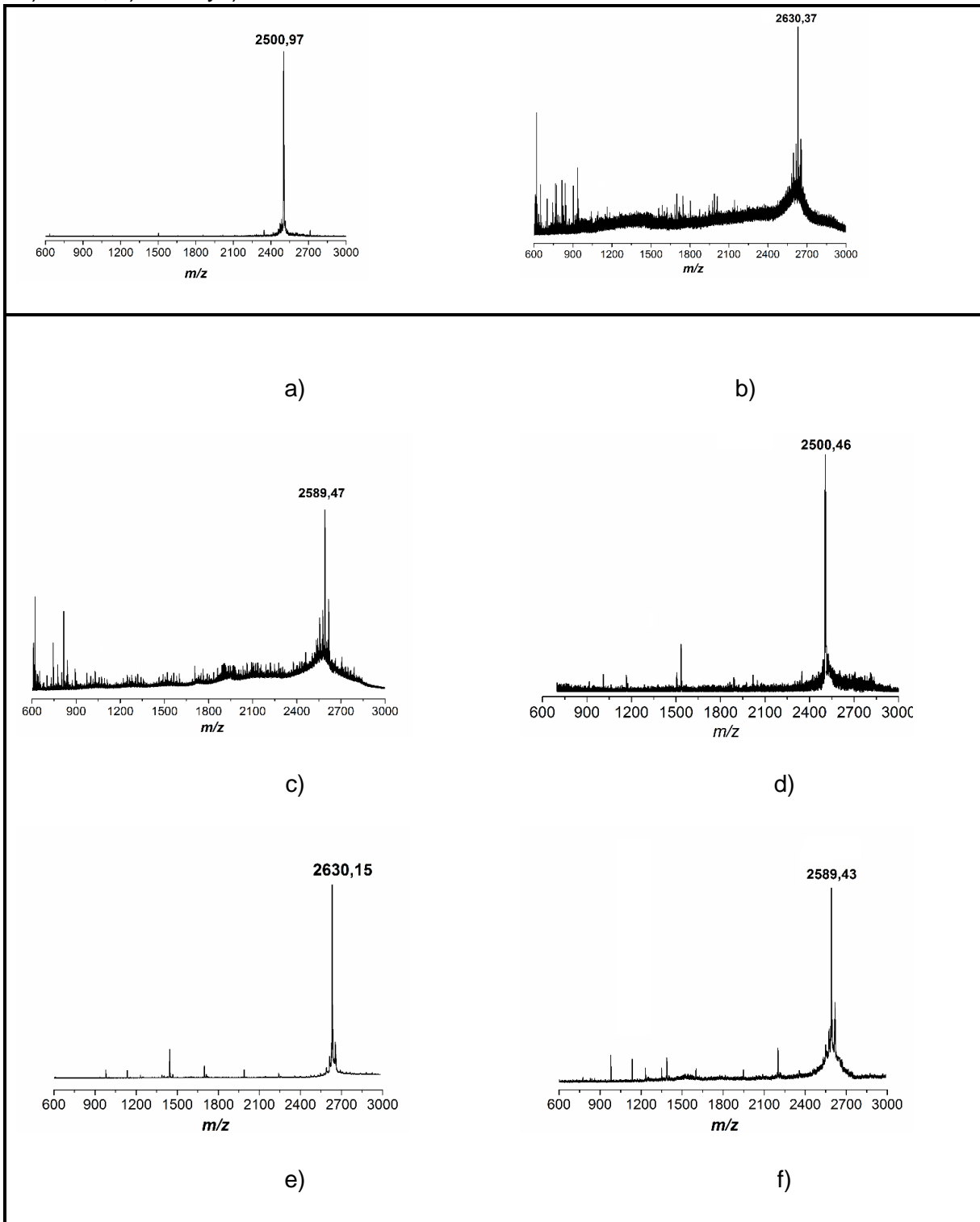
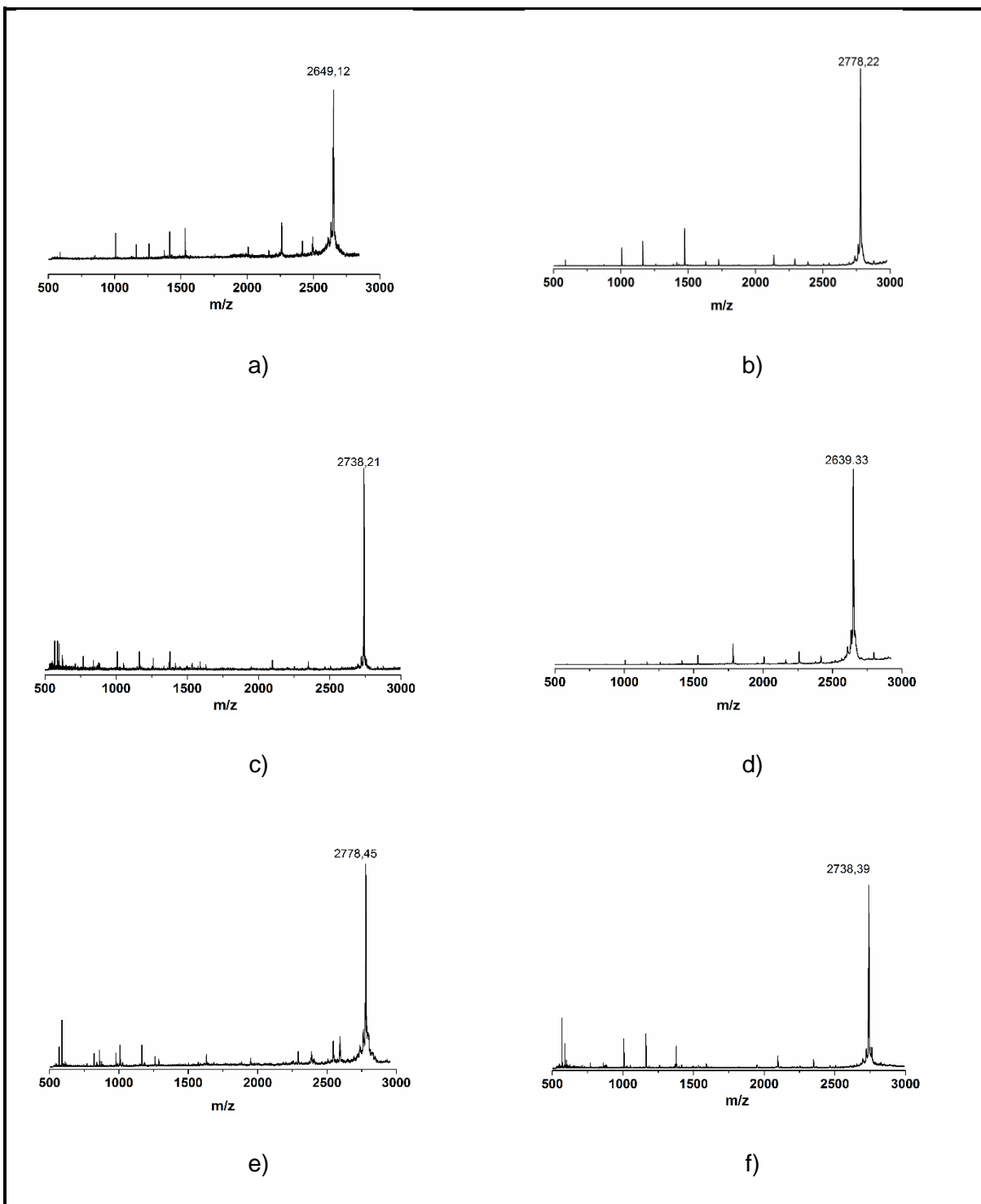


Figura C.3. Espectros de masas obtenidos para los péptidos a) Ib-M1, b) Ib-M2, c) Ib-M3, d) Ib-M4, e) Ib-M5 y f) Ib-M6



ANEXO D.

Figura D. Porcentaje de impregnación del péptido a) Ib-M6 e b) Ib-A4 en los óxidos mesoporosos de Al(III)-Mg(II) a pH de 10 después de 240 minutos de agitación

