

Inmovilización del péptido antimicrobiano Ib-M2 sobre nanopartículas de óxido de hierro y evaluación de su actividad contra *E. coli* O157:H7.

Nathalia Ardila Rosas

Trabajo de Grado para optar por el título de Química

Director

Jose Luis Roperro Vega

Doctor en Química

Codirectores

Hermínsul de Jesús Cano Calle

Doctor en Química

Universidad Industrial De Santander

Facultad De Ciencias

Escuela De Química

Bucaramanga

2019

### **Dedicatoria**

*A Dios que me ha permitido adquirir sabiduría para alcanzar los logros que coinciden  
con su voluntad mediante su guía diaria.*

*A mis padres Ernesto y Maribel, quienes diariamente lo dan todo por mi bienestar*

*A Nicolás, mi hermano, mi motor.*

### **Agradecimientos**

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

#### **COLCIENCIAS**

*Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a:*

Dr. Hermínsul Cano por aceptar la Co-dirección de este trabajo.

Dr. Jose Luis y Dra. Johanna Flórez por su colaboración durante todo el proceso de investigación en la Universidad de Santander. Sin ustedes este trabajo no hubiese podido ser realidad.

A la profesora Indira Hernández de la Universidad de Santander quien fue un apoyo valioso durante la evaluación de la actividad antimicrobiana del bioconjugado además de su paciencia en el proceso de la investigación.

Dr. Jose Antonio Henao y al equipo de trabajo del Laboratorio de difracción de Rayos X del Parque Tecnológico Guatiguará, por su apoyo en la obtención de los difractogramas presentados en este trabajo.

A mis amigos Aracely, Liz, Alejandra, Yulieth, Sergio, Daniela León, Sebastián, Alejandra, Andrea, Julián, Wilmary, Camila, María Camila, Angie, por su excelente compañía y momentos de calidad.

## Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción.....	12
Planteamiento del Problema .....	14
Justificación .....	16
Pregunta de investigación e hipótesis .....	16
1. Objetivos.....	18
1.1 Objetivo General.....	18
1.2 Objetivos Específicos .....	18
2. Marco teórico.....	18
2.1. Nanotecnología .....	18
2.2. Nano partículas de óxido de hierro y sus propiedades. ....	19
2.3. Métodos de síntesis de nanopartículas: Co-precipitación.....	20
2.4. Recubrimiento de nanopartículas .....	23
2.5. Uso de las NPs como transporte de fármacos.....	25
2.7. Toxicidad de las NPs contra microorganismos .....	27
2.8. <i>Escherichia coli</i> O157:H7 .....	27
2.9. Péptidos Antimicrobianos.....	29
2.10. Mecanismos de acción frente a patógenos de los péptidos antimicrobianos.....	31
2.11. Actividad antimicrobiana del péptido Ib-M2 .....	32
2.12. Inmovilización de péptidos.....	33
3. Materiales y métodos.....	36
3.1. Materiales .....	36
3.2. Preparación de Nanopartículas .....	37
3.3. Preparación Bioconjugado.....	38
3.4. Caracterización Estructural NPs Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> y Bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi .....	39
3.4.1. Espectroscopia IR .....	39
3.4.2. Dispersión de Luz Dinámica o DLS .....	39
3.4.3. Difracción de Rayos X .....	39
3.4.4. Espectroscopia foto electrónica de Rayos X (XPS) .....	40

3.4.5. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....	40
3.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana del bioconjugado contra cepa <i>E. coli</i> O157:H7 .....	40
3.5.1. Preparación de subcultivo de <i>E. coli</i> .....	40
3.5.2. Determinación de la Cinética de crecimiento bacteria <i>E. coli</i> O157:H7 .....	41
3.6. Estabilidad del bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi .....	41
3.6.1. Espectrometría de masas MALDI TOF .....	43
4. Resultados.....	44
4.1. Preparación de Nanopartículas. ....	44
4.2. Caracterización Nanopartículas de óxido de hierro.....	45
4.2.1. Espectroscopia IR .....	46
4.2.2. Dispersión de Luz Dinámica o DLS .....	48
4.2.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....	49
4.2.4. Difracción de Rayos X .....	50
4.2.5. Espectroscopia foto electrónica de Rayos X (XPS) .....	51
4.3. Preparación Bioconjugado.....	53
4.4. Caracterización estructural del Bioconjugado.....	55
4.4.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....	55
4.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana del bioconjugado contra cepa <i>E. coli</i> O157:H7 .....	56
4.6. Prueba de estabilidad del bioconjugado .....	59
4.6.1. Espectrometría de masas MALDI TOF .....	61
5. Conclusiones.....	64
6. Recomendaciones .....	65
Referencias Bibliográficas.....	66

**Lista de Tablas**

	Pág
Tabla 1. <i>Actividad antimicrobiana del péptido antimicrobiano Ib-AMP4 y su variante Ib-M2 contra Escherichia coli K-12 en medio Mueller Hinton (Flórez-Castillo, Perullini, Jobbágy, &amp; De Jesús Cano Calle, 2014).</i> .....	33
Tabla 2. <i>Condiciones de almacenamiento del péptido Ib-M2 libre y del bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi a 6.25 μM para la evaluación de la estabilidad durante 20 días.</i> .....	42

## Lista de Figuras

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Síntesis de nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> por el método de co-precipitación. El color de la solución de hierro cambia durante el proceso de síntesis de amarillo a café, finalmente a negro. Adaptado de (Wulandari, Santjojo, Shobirin, & Sabarudin, 2017).....	22
<b>Figura 2.</b> a) Estructura cristalina espinela cúbica centrada en las caras de la magnetita Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> . b) Magnificación de un tetraedro y un octaedro adyacentes compartiendo un átomo de oxígeno. Las esferas Fe <sup>tet</sup> y Fe <sup>oct</sup> representan los átomos de hierro coordinados en la posición tetraédrica y octaédrica respectivamente. (Friák, Schindlmayr, & Scheffler, 2007) .....	23
<b>Figura 3.</b> Segmento del lipopolisacárido (LPS) de la cobertura celular gramnegativa. Cada molécula de LPS posee un lípido A, una región central del polisacárido y numerosas unidades de antígeno O. Tomado de (Murray et al., 2009) .....	28
<b>Figura 4.</b> Enlace peptídico entre aminoácidos.....	29
<b>Figura 5.</b> Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos (AMPs). a) Modelo alfombra, b) barril y c) toroide. ....	32
<b>Figura 6.</b> Esquema del recubrimiento de las nanopartículas de óxido de hierro con quitosano (Reddy & Lee, 2013).....	35
<b>Figura 7.</b> Estructura del o-(benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3- tetrametiluroniotetrafluoroburato (TBTU).....	36
<b>Figura 8.</b> Solución de nanopartículas de óxido de hierro. a) Nps-NH, b) Nps-Et.....	44
<b>Figura 9.</b> Curva de titulación pH vs Relación molar de las sales de hierro en presencia de a) NH <sub>4</sub> OH/Fe <sub>total</sub> y b)Etilendiamina /Fe <sub>total</sub> .....	45
<b>Figura 10.</b> Espectro IR de a) Nps-NH, b) Nps-Et 2.5 M. ....	46
<b>Figura 11.</b> Espectro de dispersión de luz dinámica (DLS) de: a) Nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> preparadas con NH <sub>4</sub> OH (Nps-NH), b) Nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> preparadas con Etilendiamina (Nps-Et). ....	48
<b>Figura 12.</b> Imágenes del microscopio electrónico de barrido (SEM) que muestran el tamaño de partícula para a) NPs-NH y b) Nps-Et 2.5 M. ....	49
<b>Figura 13.</b> Patrón de difracción de Rayos X de los cristales de nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ....	50
<b>Figura 14.</b> Espectro XPS a) General de las NPs Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> preparadas con NH <sub>4</sub> OH, b) Fe (2p), c) N (1s) y finalmente de d) O (1s).....	51

- Figura 15.** Espectro XPS a) General de las NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> preparadas con Etilendiamina, b) Fe (2p), c) N (1s) y finalmente de d) O (1s). .....53
- Figura 16.** Inmovilización del péptido en NPs recubiertas con quitosan.a) NPs@Chi-Nh y b) NPs@Chi-Et .....54
- Figura 17.** Imágenes del microscopio electrónico de barrido (SEM) que muestran el tamaño de partícula para a) Ib-M2/NPs@Chi NH<sub>4</sub>OH y b) Ib-M2/NPs@Chi Etilendiamina 2.5M. ..55
- Figura 18.** Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) evaluada a 625 nm cada dos horas. Los resultados son expresados en término del promedio aritmético ± desviación estándar. Control: Medio + *E. coli*. .....57
- Figura 19.** Cinética de crecimiento de *E.coli* O157:H7 en presencia de bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi, nanopartículas recubiertas NPs@Chi y nanopartículas solas NPs a diferentes concentraciones. Los resultados son expresados en término del promedio aritmético ± desviación estándar. Control: Medio + *E. coli* .....58
- Figura 20.** Cinética de crecimiento de *E.coli* O157:H7 en presencia de péptido Ib-M2 a diferentes concentraciones. Los resultados son expresados en término del promedio aritmético ± desviación estándar. Control: Medio + *E. coli*. .....60
- Figura 21.** Espectros de Masas del péptido Ib-M2 6.25 mM .....61
- Figura 22.** Espectros de Masas del bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi 6.25 μM .....63

**RESUMEN**

**TÍTULO:** INMOVILIZACIÓN DEL PÉPTIDO ANTIMICROBIANO Ib-M2 SOBRE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD CONTRA *E. coli* O157:H7\*.

**AUTOR:** NATHALIA ARDILA ROSAS\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Nanopartículas magnéticas, óxido de hierro, actividad antimicrobiana.

**DESCRIPCIÓN:** *Escherichia coli* es una de las bacterias que están relacionadas con enfermedades gastrointestinales en la mayoría de la población mundial. Durante los últimos años, las bacterias han generado resistencia a los antibióticos convencionales usados para contrarrestar su efecto. Los péptidos antimicrobianos (AMPs) han resultado una novedosa alternativa por su alto potencial farmacológico. No obstante, este tipo de compuestos son susceptibles a la degradación por proteasas. Por ello, existe un interés creciente en alternativas que permitan a los péptidos antimicrobianos ser inmovilizados en superficies biocompatibles, siendo las nanopartículas de óxido de hierro una de ellas. El objetivo principal de este trabajo fue la inmovilización del péptido Ib-M2 en nanopartículas de óxido de hierro (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) preparadas por el método de co-precipitación a partir de sales de hierro (II) y (III) en solución acuosa y la evaluación de su actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7. Se prepararon nanopartículas de óxido de hierro Nps-NH y Nps-Et por el método de co-precipitación de sales de hierro Fe (II) y Fe (III) con una base, seguido de un recubrimiento con quitosano. Las nanopartículas modificadas fueron caracterizadas por difracción de Rayos X (XRD), microscopía de barrido electrónico (SEM), espectroscopia foto electrónica de rayos X (XPS), dispersión de luz dinámica (DLS) e infrarrojo (FTIR). Los espectros XRD, XPS y FTIR mostraron que las partículas eran de fases cristalinas diferentes: magnetita y maghemita. DLS y las imágenes de SEM indicaron que el tamaño de partícula fue de  $13.05 \pm 1.47$  nm para Nps-NH y  $13.69 \pm 1.65$  nm para Nps-Et. Se preparó un bioconjugado con las nanopartículas por enlace covalente entre el quitosano y el terminal carboxilo del péptido antimicrobiano Ib-M2. Posteriormente se evaluó su actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7 mostrando un aumento del 50% en la inhibición del crecimiento del microorganismo a la concentración de la MIC

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Jose Luis Roperro Vega, Ph. D. Codirector: Hermínsul de Jesús Cano Calle Ph. D.

**ABSTRACT**

**TITLE:** IMMOBILIZATION OF Ib-M2 ANTIMICROBIAL PEPTIDE ONTO IRON OXIDE NANOPARTICLES AND THE EVALUATION OF ITS ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST *E. coli* O157:H7\*

**AUTHOR:** NATHALIA ARDILA ROSAS\*\*

**KEY WORDS:** Magnetic nanoparticles, iron oxide, antimicrobial activity.

**DESCRIPTION:** *Escherichia coli* is one of the bacteria related to gastrointestinal diseases in most of the world's population increasing the mortality rate due to this issue. During recent years, bacteria have generated resistance to conventional antibiotics used to counteract their effects. Antimicrobial peptides (AMPs) are a novel and effective alternative because of their high pharmacological potential. However, this type of compounds are susceptible to degradation by proteases. Therefore, there is a growing interest in developing alternatives that allow antimicrobial peptides to be immobilized on biocompatible surfaces such as iron oxide. The main objective of this work was the immobilization of the Ib-M2 peptide in iron oxide nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) prepared by the co-precipitation method from Fe(II) and Fe(III) salts in aqueous solution and the evaluation of its antimicrobial activity against *E. coli* O157:H7. Iron oxide nanoparticles Nps-NH, Nps-Et were prepared by the co-precipitation method of Fe (II) and Fe (III) iron salts with a solution of ammonium hydroxide and ethylenediamine, respectively, followed by a chitosan coating. The modified nanoparticles were characterized by X-Ray diffraction (XRD), electronic scanning microscopy (SEM), X-Ray electronic spectroscopy (XPS), dynamic light scattering (DLS) and Fourier Transform Infrared (FTIR). The XRD, XPS and FTIR spectra showed nanoparticles of two different crystalline phases: magnetite and maghemite. DLS and SEM images indicated that the particle size was  $13.05 \pm 1.47$  nm for Nps-NH and  $13.69 \pm 1.65$  nm for Nps-Et. A bioconjugate was prepared with the nanoparticles by covalent bonding between the chitosan and the carboxyl terminal of the antimicrobial peptide Ib-M2. Subsequently, its antimicrobial activity was evaluated against a reference strain of *E. coli* O157:H7 showing a 50% increase in the inhibition of the growth of the microorganism at the MIC concentration.

---

\* Bachelor Thesis

\*\* Science Faculty, Chemistry Department. Director: Jose Luiz Ropero Vega, *Ph. D.* Co-director: Herminul de Jesús Cano Calle, *Ph. D.*

## Introducción

*Escherichia coli* es un patógeno complejo presente en los seres humanos que ha despertado interés investigativo dado que está relacionado con infecciones gastrointestinales y con otras enfermedades (Franco Anaya, Ramírez Medina, Orozco Ugarriza, & López Gutierrez, 2013). En los últimos años, esta bacteria ha mostrado resistencia a ciertos antibióticos debido al desarrollo de ciertos mecanismos, a saber: la inactivación enzimática como la que generan las  $\beta$ -lactamasas que destruyen el agente antimicrobiano antes de que pueda tener un efecto (Tenover, 2006), expulsión del agente antimicrobiano a través de bombas de eflujo (Mosquito *et al.*, 2011), alteraciones en la pared celular de la bacteria de tal manera que no contiene el sitio de unión del agente antimicrobiano mediante mecanismos de intercambio genético de plásmidos que contienen genes de resistencia (Kong, Schneper, & Mathee, 2010) y alteraciones de la permeabilidad. (Vila *et al.*, 2016). En este sentido, se han desarrollado nuevos mecanismos usando péptidos antimicrobianos para tratar este tipo de bacterias, los cuales consisten en moléculas sintéticas que asemejan estructuralmente metabolitos secundarios producidos en tejidos de diversos animales y plantas, y que son usadas en su defensa contra diversos microorganismos dada su fuerte actividad antimicrobiana (Aoki & Ueda, 2013). No obstante, el uso de biomoléculas ha requerido de un medio de transporte para su distribución selectiva en el cuerpo, hacia los tejidos diana un objetivos moleculares específicos (Brogden, 2005).

La nanotecnología se ha presentado como una solución al problema del transporte de biomoléculas a través del uso de nano partículas con propiedades magnéticas (Di Corato *et al.*, 2018). A este campo de la ciencia se le atribuyen el desarrollo de diversos materiales para ser aplicados en diferentes áreas del conocimiento, entre ellos las nano partículas de óxido de hierro para detección de cáncer (Finas Dominique and Baumann, 2012).

Desde hace más de una década, la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro súper paramagnéticas ha sido estudiada por las propiedades magnéticas que poseen y que les permiten ser usadas como herramientas de reparación de tejidos (Guptaa & Gupta, 2005), liberación de fármacos (Lee *et al.*, 2007) e incluso para el mejoramiento de la resolución en resonancia magnética de imágenes (Di Corato *et al.*, 2018).

En general, en el campo de la liberación de fármacos relacionado con el tratamiento de enfermedades, las nanopartículas de óxido de hierro cumplen un papel importante en tanto que se han usado como medios de transporte de los fármacos aprovechando sus propiedades magnéticas al ser aplicado un campo magnético externo (Sophie Laurent *et al.*, 2008). En este sentido, el uso de un campo magnético externo puede generar el movimiento de las partículas dirigiéndolas a un tejido diana que posea un daño y requiera de tratamiento.

De este modo, las condiciones de preparación de las nanopartículas se han modificado de acuerdo con las aplicaciones para las cuales han sido desarrolladas (Di Corato *et al.*, 2018). Es por esto que se han probado una serie de posibles recubrimientos de las nanopartículas que sean compatibles con su estructura, así como con las biomoléculas que les serán adheridas y que, además, mejoren condiciones de liberación, movilidad, efectividad en un medio (Sophie Laurent *et al.*, 2008). Si bien se ha observado el uso de nanopartículas de óxido de hierro para tratamiento de enfermedades y han sido exitosos, hay muchas variables por investigar para optimizar los resultados. De este modo, en el presente trabajo de investigación se busca obtener nano partículas de óxido de hierro y estudiar diferentes tipos de recubrimientos posibles para la generación de un bioconjugado formado con el péptido Ib-M2 y posteriormente evaluar su actividad antimicrobiana contra una cepa de referencia *E. coli* O157:H7, tomando ventaja de sus propiedades, estudiando su viabilidad y estabilidad biológica. Se plantea para posteriores estudios la posibilidad de usar este sistema de bioconjugado de nanopartículas de óxido de hierro - péptido Ib-M2 en la distribución de biomoléculas de forma controlada en dianas o

tejidos específicos para contrarrestar los efectos secundarios que se generan en la administración de los mismos actualmente.

### **Planteamiento del Problema**

*Escherichia coli* es una bacteria patógena intestinal perteneciente a la familia Enterobacteriaceae que predomina en la microbiota de los mamíferos (Rédei, 2008). Esta bacteria crece rápidamente en un medio de cultivo simple con la cantidad mínima de nutrientes por lo que es comúnmente encontrada en medios como agua y suelo, como consecuencia de una contaminación fecal. Algunas infecciones gastrointestinales se deben a la presencia de este tipo de bacterias en el organismo (Pitout, 2017). Cepas de *E. coli* como las enterohemorrágicas. (EHEC por sus siglas en inglés) son la causa de enfermedades que van desde la enfermedad diarreica aguda, EDA (Gómez, 2014) hasta el síndrome urémico hemolítico (SHU) e incluso la muerte (Barkocy-Gallagher *et al.*, 2001)

En el 2015, un reporte realizado por la UNICEF arrojó que una de cada diez muertes en niños se debe a diarrea. El mayor porcentaje de muertes (10 -15%) se presenta en África, y al sur de Asia (United Nations Children's Fund, 2017). No obstante, las enfermedades patógenas intestinales no solo afectan las poblaciones marginadas de África y Asia sino de Latinoamérica. En Colombia, no se conoce aún la prevalencia de la bacteria sin embargo se han hecho estudios de la población que ha contraído diarrea infecciosa debido a la presencia de *E. coli* O157:H7 (Mattar S & Vásquez E., 1998)

El uso de antibióticos es el mecanismo actual para contrarrestar la acción de la bacteria *E. coli* en el cuerpo humano debido a que actúan como inhibidores del crecimiento de las bacterias (Pitout, 2012). No obstante, se ha observado la resistencia desde hace más de una década de estos agentes patógenos asociada a un desarrollo de mecanismos para compensar

cualquier retraso del crecimiento bacteriano (Foxman, 2010). De acuerdo con lo mencionado anteriormente, se ha reconocido la necesidad de encontrar alternativas de tratamiento para este tipo de patógenos.

Alrededor del mundo y específicamente en Colombia, se han desarrollado rutas alternativas para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la presencia de *E. coli* mediante el uso de péptidos antimicrobianos como alternativa respecto a los antibióticos (Téllez & Castaño, 2010). En este sentido, se ha encontrado que los péptidos liberados por las plantas y animales como respuesta a un ataque externo, son efectivos en su defensa contra diferentes patógenos (Aoki & Ueda, 2013), mediante su interacción con la bacteria a través de la afectación de su membrana y ADN (inserción y adhesión) (Broden, 2005), así como la alteración de las enzimas que promueven la síntesis de proteínas, proceso fundamental para el transporte celular.

A pesar de su efectividad, los péptidos antimicrobianos al ser degradados enzimáticamente contribuyen a una baja biodisponibilidad de manera tal que no pueden atravesar la membrana celular (Mojsoska B, Carretero G, Larsen S, Mateiu R, & Jenssen H, 2017). Estos péptidos pierden estabilidad si no son llevados a los tejidos diana para lo cual fueron hechos, por esta razón la nanotecnología ha sido un complemento para modificar su actividad antimicrobiana (Hu, Li, Wang, Gu, & Fan, n.d.). Las partículas a escala nanométrica tales como de oro, plata, óxido de hierro, entre otras, le confieren a los péptidos protección contra la degradación, estabilidad y capacidad de penetrar las barreras tales como tejidos y membranas celulares (Hu *et al.*, n.d.). De forma más específica, las IONPs (Iron Oxide Nanoparticles) podrían generar una solución en cuanto al transporte del bioconjugado aprovechando sus propiedades magnéticas en tanto que podrían ser movilizadas mediante el uso de un campo magnético externo (Auffan *et al.*, 2008a).

Teniendo en cuenta lo anterior, sería pertinente el uso de nanopartículas de óxido de hierro y el estudio de diferentes tipos de recubrimientos posibles para así generar un bioconjugado con un péptido cuya actividad ya ha sido determinada y posteriormente evaluar la actividad antimicrobiana contra una cepa de referencia *E. coli* O157:H7.

### **Justificación**

La Organización Mundial de la Salud ha publicado recientemente la creciente resistencia de las bacterias contra antibióticos, dentro de las cuales están las cepas de *E. coli*, no solo en América sino en todo el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2018). Con base en lo anterior, se requiere del estudio de la actividad de biomoléculas tales como los péptidos antimicrobianos mediante el uso de nanopartículas. En este sentido, dado que la actividad antimicrobiana de una familia de péptidos derivados del péptido Ib-AMP4 contra una cepa de *E. coli* K12 fue comprobada mediante la remoción de puentes disulfuro introduciendo residuos de Arg y Trp (Flórez, Perullini, Jobbagy, & de Jesus Cano Calle, 2014), se espera que uno de esos péptidos derivados como el Ib-M2, demuestre actividad contra una cepa de *E. coli* O157:H7 inmovilizándolo en nanopartículas de óxido de hierro tomando ventaja de sus propiedades y estudiando su viabilidad y estabilidad biológica. Se plantea para posteriores estudios la posibilidad de usar estos bioconjugados de nanopartículas de óxido de hierro - péptido Ib-M2 en la distribución y liberación de biomoléculas de forma controlada en dianas o tejidos específicos para contrarrestar los efectos secundarios que se generan en la administración de fármacos actualmente.

### **Pregunta de investigación e hipótesis**

**Pregunta de investigación:** ¿La inmovilización del péptido Ib-M2 sobre las nanopartículas de óxido de hierro presentará actividad contra cepa de *E. coli* O157:H7?

**Hipótesis:** El péptido Ib- M2 inmovilizado sobre las nanopartículas de óxido de hierro de acuerdo a la variación de las condiciones de preparación de las nanopartículas tales como tipo de recubrimiento y relaciones molares mostrará actividad antimicrobiana al tener mejor estabilidad.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo General

- Inmovilizar el péptido antimicrobiano Ib-M2 sobre nanopartículas de óxido de hierro y evaluar su actividad contra *E. Coli* O157:H7.

### 1.2 Objetivos Específicos

- Preparar nanopartículas de óxido de hierro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) por el método de co-precipitación.
- Obtener un bioconjugado a partir de la inmovilización del péptido Ib-M2 en nanopartículas de óxido de hierro.
- Evaluar la actividad antibacteriana del bioconjugado obtenido de la inmovilización del péptido contra cepa de referencia de *Escherichia coli* O157:H7.

## 2. Marco teórico

### 2.1. Nanotecnología

La nanotecnología hace referencia al campo de investigación en el que se usa la tecnología para el diseño, fabricación y aplicación de nanoestructuras en diferentes áreas del conocimiento (G. Cao, 2004). El consenso general establece que las nanopartículas deben definir su tamaño en un rango de 1-100 nm. El tamaño de una nanopartícula depende en gran medida del proceso de síntesis. A medida que el diámetro de las partículas disminuye, la relación entre el área superficial y el volumen de la partícula aumenta. Esto significa que el porcentaje de átomos en la superficie por unidad de volumen es mayor. Esta relación está intrínsecamente asociada con propiedades fisicoquímicas ajustables propias de este tipo de materiales tales como el punto de fusión, la conductividad eléctrica y térmica, actividad

catalítica, aumento de la energía superficial y la dispersión en diferentes medios. (Jeevanandam, Barhoum, Chan, Dufresne, & Danquah, 2018). La variación en el punto de fusión está relacionado con el cambio de los valores de las constantes de celda y aumento de la energía superficial, jugando un papel importante en la estabilidad térmica de los materiales. Por ejemplo, estructuras cristalinas estables a altas temperaturas, lo seguirán siendo incluso más, a escalas más pequeñas (G. Cao, 2004). Así mismo, a todo esto se suman las propiedades magnéticas que pueden tener algunas nanopartículas debido a la presencia de compuestos metálicos en el proceso de síntesis (Issa, Obaidat, Albiss, & Haik, 2013). Los óxidos de hierro son los materiales más usados en biomedicina actualmente por su potencial uso en presencia de campos magnéticos como en la técnica de imágenes por resonancia magnética (Gupta & Gupta, 2005).

## **2.2. Nano partículas de óxido de hierro y sus propiedades.**

En su mayoría, las propiedades magnéticas de las partículas vienen dadas por la orientación y el número de espines electrónicos así como su comportamiento en presencia de un campo magnético externo (S. Laurent, Boutry, & Muller, 2017). Respecto a la respuesta de los espines a este campo magnético externo, los materiales con núcleos magnéticos pueden clasificarse como diamagnéticos, paramagnéticos, antiferromagnéticos, ferrimagnéticos y superparamagnéticos. (S. Laurent *et al.*, 2017). El diamagnetismo es una propiedad que se da cuando la suma de los espines es cero y débilmente repelen a un campo magnético aplicado (Abolfazl, Samiei, & Soodabeh, 2012). Cuando los momentos magnéticos atómicos están desapareados quedando disponibles para su alineación con un campo magnético de forma paralela, se presenta el paramagnetismo. Si los momentos magnéticos están acoplados entre sí, el paramagnetismo empieza a ser ferrimagnetismo, en donde la alineación de los momentos

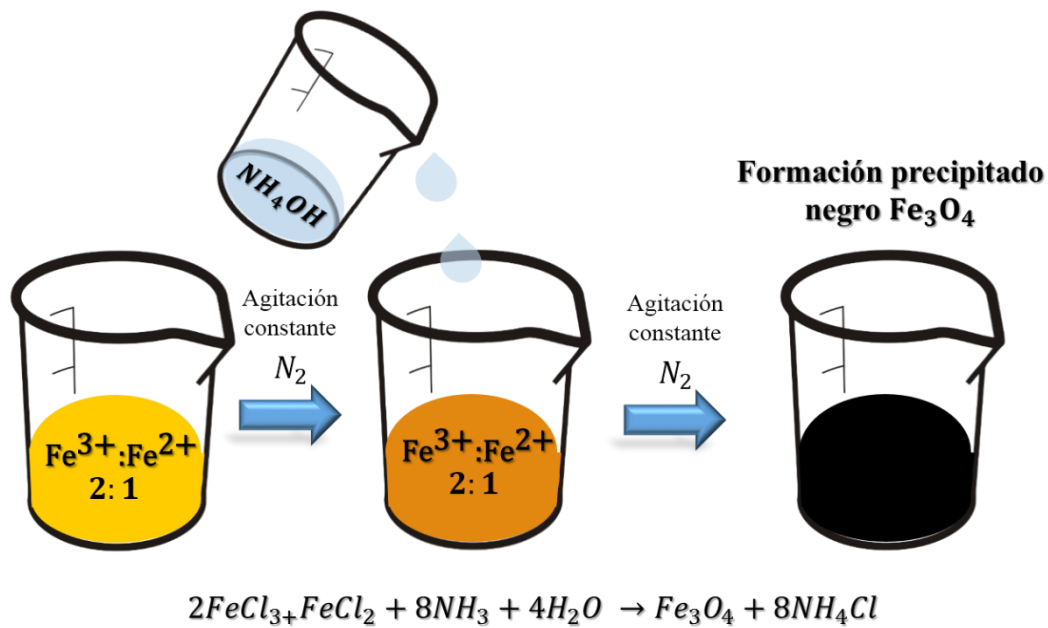
magnéticos de igual magnitud presenta una magnetización en presencia de un campo magnético y la mantienen en ausencia del mismo. Contrario a esta última forma de magnetismo, se encuentra el antiferromagnetismo donde los momentos magnéticos atómicos tienen la misma magnitud pero están ubicados antiparalelamente, siendo así el valor de magnetización igual a cero (Sophie Laurent *et al.*, 2008). Finalmente, el superparamagnetismo hace referencia a la alta susceptibilidad magnética de los materiales lo que significa la magnetización de las partículas puede variar aleatoriamente con el fin de mantener un equilibrio termodinámico (Abolfazl *et al.*, 2012).

Los óxidos de hierro constituyen el material de mayor interés dada la cantidad de polimorfos que puede generar y los diferentes comportamientos magnéticos que exhiben cada uno de ellos. Materiales como la Maghemita  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  y magnetita  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  son los más usados actualmente en aplicaciones biomédicas (Abolfazl *et al.*, 2012; Issa *et al.*, 2013). Debido a las propiedades magnéticas como ferrimagnetismo ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) y superparamagnetismo ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), se ha demostrado que tienen la capacidad de ser usadas como distribuidores de biomoléculas en organismos vivos (Torchilin, 2012). Las partículas con un núcleo magnético pueden ser transportadas dentro del organismo por medio de la aplicación de un campo magnético externo (Sophie Laurent *et al.*, 2008). En ese sentido, teniendo en cuenta que pueden ser movilizadas en un fluido a través del uso de un campo magnético, se puede usar como transporte de biomoléculas. Además, para prevenir la oxidación de las partículas, estas se deben proteger con un recubrimiento preferiblemente polimérico (Guptaa & Gupta, 2005).

### **2.3. Métodos de síntesis de nanopartículas: Co-precipitación**

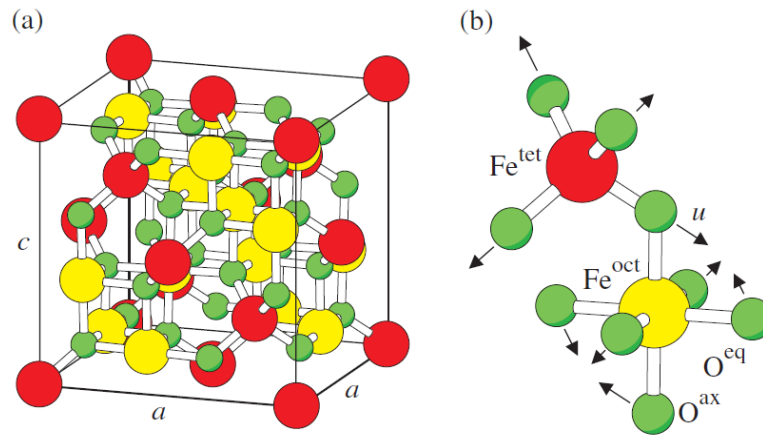
Los tipos de síntesis de nanopartículas incluyen métodos químicos de precipitación, sol-gel e hidrólisis forzada, hidrotérmica o síntesis mediada por surfactante (Behera, Patra, Pramanik,

Panda, & Thatoi, 2012). El proceso de sol-gel está basado en las reacciones de hidroxilación y condensación de precursores moleculares como alcóxidos metálicos o sales metálicas en solución para la formación de una red metal-oxo-polímero. Esta técnica requiere de un control de condiciones como temperatura, naturaleza del solvente, pH del medio y la reactividad de los alcóxidos (Sophie Laurent *et al.*, 2008; Wang & Ying, 1999). Por su parte, el método de síntesis hidrotérmica de nanopartículas de óxido de hierro requiere de reactores o autoclaves con presiones mayores de 2000 psi y temperaturas alrededor de 200 °C para llevar a cabo las reacciones de hidrólisis y oxidación o neutralización de hidróxidos metálicos mezclados en medio acuoso (Sophie Laurent *et al.*, 2008). Es importante mantener unas condiciones de temperatura, presión y tiempo ya que esto influye en los productos que se obtengan. Finalmente, la técnica de co-precipitación constituye un proceso simple y eficiente en tanto que se requiere de una mezcla estequiométrica de sales de hierro en medio acuoso que posteriormente reacciona con una base manteniendo un pH entre 8 y 14 en un ambiente no oxidante (Figura 1) (Behera *et al.*, 2012; Yao, Peng, & Fan, 2009).



**Figura 1.** Síntesis de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> por el método de co-precipitación. El color de la solución de hierro cambia durante el proceso de síntesis de amarillo a café, finalmente a negro. Adaptado de (Wulandari, Santjojo, Shobirin, & Sabarudin, 2017).

El método de co-precipitación requiere de un flujo constante de nitrógeno gaseoso, N<sub>2</sub> en el proceso de adición de la base para evitar la oxidación del óxido de hierro (Behera *et al.*, 2012). A través de este método, el óxido de hierro que se obtiene está en su forma de magnetita Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Predoi, 2007). La magnetita tiene una estructura espinela inversa cuyos iones de hierro están distribuidos en los sitios intersticiales tetraédricos (Td) y octaédricos (Oh) caracterizándose por su intercambio electrónico en estos espacios, con oxígenos formando una celda unidad centrada en las caras (Figura 2). En ese sentido su fórmula es ([Fe<sup>3+</sup>]<sub>Td</sub>[Fe<sup>3+</sup>Fe<sup>2+</sup>]<sub>Oh</sub>O<sub>4</sub>) (Fleet, 2002).



**Figura 2.** a) Estructura cristalina espinela cúbica centrada en las caras de la magnetita  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . b) Magnificación de un tetraedro y un octaedro adyacentes compartiendo un átomo de oxígeno. Las esferas  $\text{Fe}^{\text{tet}}$  y  $\text{Fe}^{\text{oct}}$  representan los átomos de hierro coordinados en la posición tetraédrica y octaédrica respectivamente. (Friák, Schindlmayr, & Scheffler, 2007)

El flujo de nitrógeno gaseoso favorece el desplazamiento del oxígeno para evitar la oxidación de la magnetita  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ; ( $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{Td}} [\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{2+}]_{\text{OhO4}}$ ) a la Maghemita  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  ( $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{Td}} [\text{Fe}^{3+}_{5/3}\text{V}_{1/3}]_{\text{OhO4}}$ ). Si bien la magnetita se produce en gran medida a temperatura ambiente, se requiere de una concentración ligeramente alta de cationes  $\text{Fe}^{2+}$  en solución para oxidarla a Maghemita. Además, el aumento en el valor de relación entre el área superficial y el volumen de las nanopartículas, debido a su tamaño pequeño incrementa la reactividad superficial de las mismas.

#### 2.4. Recubrimiento de nanopartículas

Con objeto de incrementar la capacidad de las nanopartículas de retener fármacos y mantener estables estos acoplamientos, se recurre a la funcionalización de las mismas. El proceso consiste en alterar las propiedades de la superficie de la nanopartícula usando compuestos con grupos amino, sílice, polímeros, varios surfactantes, entre otros compuestos orgánicos (Shagholani, Ghoreishi, & Mousazadeh, 2015). Generalmente las células donde se espera que lleguen las nanopartículas están cargadas negativamente, por este motivo, la mayoría de NPs

magnéticas deber ser modificadas con materiales catiónicos de manera tal que sus grupos funcionales se puedan conjugar con las biomoléculas a usar.

El quitosano es de los compuestos más usados como recubrimiento de nano partículas. Al ser derivado de la quitina, el quitosano es un biopolímero que cuenta con la presencia de un grupo funcional amino e hidroxilo en su estructura (Assa *et al.*, 2016; Ghaz-Jahanian, Abbaspour-Aghdam, Anarjan, Berenjian, & Jafarizadeh-Malmiri, 2015; Shagholani *et al.*, 2015). Los grupos amino se encuentran entonces disponibles para un posible entrecruzamiento iónico por su naturaleza catiónica. Por otro lado, se ha comprobado que el quitosano posee propiedades antimicrobianas influenciadas por el tipo de quitosano, el grado de polimerización, peso molecular y solvente; antifúngicas, así como la posibilidad de adherirse a las mucosas para el transporte de moléculas (Assa *et al.*, 2016; Qi, Xu, Jiang, Hu, & Zou, 2004). La actividad antimicrobiana del quitosano se observa solo en medio ácido debido a su baja solubilidad a pH >6.5 (Honary, Ebrahimi, Rad, & Asgari, 2013; Qi *et al.*, 2004). Además, el quitosano es biocompatible al ser un biopolímero que se obtiene por deacetilación de la quitina que es extraída naturalmente del caparazón de crustáceos (Chen, Yang, Ma, & Wu, 2011), es soluble en soluciones ácidas por lo que no requiere de solventes orgánicos reduciendo el impacto ambiental y biodegradable por la acción de la enzima quitinasa presente en la naturaleza (Elieh-Ali-Komi & Hamblin, 2017).

Las nanopartículas recubiertas con una matriz de quitosano funcionan como transportadoras de biomoléculas por la disponibilidad de los grupos amino e hidroxilo de la estructura de quitosano. Shagholani *et al.*, 2015 comprobaron la interacción de alcohol polivinílico (PVA) y quitosán en nanopartículas magnéticas para la adsorción de albúmina de suero bovino (BSA), una proteína de 583 residuos que se asemeja a la albúmina humana presente en el plasma sanguíneo, con el fin de aplicarlo a la liberación de fármacos. La interacción se debe a la unión a hidrógenos y entrecruzamiento de los grupos amino del quitosano e hidroxilo del PVA. La

adsorción se debe a las interacciones electrostáticas debido a las cargas de la proteína y PVA-quitosano a pH fisiológico. De igual forma, se ha reportado que nanopartículas compuestas quitosano e insulina pueden reducir el nivel de glucosa en la sangre en un modelo de diabetes en ratas (Lin *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2004)

## 2.5. Uso de las NPs como transporte de fármacos

En la biomedicina se están implementando partículas magnéticas *in vivo* e *in vitro*. En las aplicaciones *in vivo*, las NPs magnéticas recubiertas se observan en el tratamiento de hipertermia, liberación de fármacos específica y en diagnósticos en los que se use la resonancia magnética de imágenes MRI (Wilczewska, Niemirowicz, Markiewicz, & Car, 2012). De acuerdo con lo anterior existe restricción en el tamaño para que pueda ser transportado en óptimas condiciones.

*In vitro* las nanopartículas son útiles en la separación y selección celular así como para procesos como la magnetorelaxometría, por lo tanto no se requiere estrictamente de un tamaño específico (Q. Cao, Han, & Li, 2011).

Existen actualmente diversos medios de distribución de fármacos o compuestos terapéuticos para el tratamiento de ciertas enfermedades. El propósito de estos compuestos es actuar o eliminar un patógeno, llegando al sitio específico donde este se hospeda. No obstante, este tipo de sistemas de distribución desencadenan una serie de efectos secundarios en el organismo así como la disminución de la efectividad, selectividad e incluso la desintegración del compuesto. Durante las últimas décadas, estos efectos alternos han sido de gran motivación para la aplicación de varias disciplinas para generar herramientas que optimicen la llegada de los fármacos a sitios específicos tales como: farmacéutica, química analítica, biología molécula (Mahmoudi, Sant, Wang, Laurent, & Sen, 2011). En este sentido, se introducen los sistemas

de liberación controlada de compuestos como una herramienta de liberación específica y controlada de agentes terapéuticos que reducirían las posibilidades de perder compuesto y garantizarían la llegada de los mismos al lugar de acción sin generar efectos secundarios.

Los métodos de liberación estudiados hasta ahora se clasifican en dos categorías de acuerdo a (Zhang *et al.*, 2014), liberación sostenida y por sensibilidad a estímulos. La primera categoría hace alusión a la distribución de un compuesto terapéutico a una tasa predeterminada durante un período de tiempo establecido. En esta categoría se encuentran aquellas sustancias que son rápidamente metabolizadas y por consiguiente eliminadas del cuerpo.

Por otro lado, la segunda categoría responde a los tratamientos en los que se requiere una liberación continua así como de un control concienzudo del suministro de fármacos. En virtud de ello, se consideran los perfiles en respuesta a condiciones fisiológicas *in vivo* o estímulos externos. La variación de pH, la concentración de iones, e incluso la presencia de enzimas constituyen el sistema de liberación interna, en tanto que, la luz, campos magnéticos, eléctricos, calor, entre otros estímulos físicos constituyen el sistema de liberación externa.

Dentro de los sistemas de liberación, se encuentran los sistemas magnéticos. Estas partículas tienen la característica de poseer un tamaño en escalas nano y microscópico. Su estructura está basada en un núcleo magnético y una superficie que puede ser cubierta por una matriz polimérica ya que por sí solas, las partículas debido a su tamaño, no son estables en solución acuosa.

Como consecuencia de sus propiedades magnéticas (Issa *et al.*, 2013), las partículas con estas características podrían ser controladas siguiendo un recorrido específico establecido por un campo magnético externo llevándolas al lugar requerido, evitando la pérdida de fármaco en cualquier parte del cuerpo.

## 2.7. Toxicidad de las NPs contra microorganismos

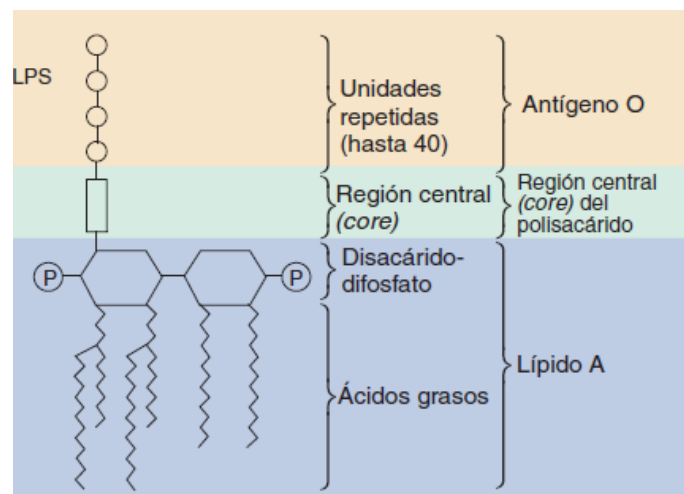
Las características físico-químicas de la superficie de las nanopartículas de óxido de hierro intervienen en los procesos biológicos de las células, alterando su funcionamiento normal (Gupta & Gupta, 2005). Uno de los modos de uso de las nanopartículas es la bioconjugación entre ellas y anticuerpos específicos con el fin de atacar selectivamente a los receptores relacionados con el crecimiento de bacterias o incluso de células cancerígenas. En otros casos, las nanopartículas por sí solas, dependiendo de su composición química superficial, pueden estar asociadas a procesos de estrés oxidativo mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés). Las ROS y la presencia de radicales hidroxilo, producto de la interacción de las partículas con fluidos biológicos, dañan el ADN de las bacterias (Cohn *et al.*, 2006).

La citotoxicidad de las nanopartículas puede verse afectada por la naturaleza del recubrimiento, variando su comportamiento frente a una célula en tanto que, modificaría la eficiencia de internalización (en caso de que llegare a entrar al citoplasma), los efectos citotóxicos y la adhesión celular.

## 2.8. *Escherichia coli* O157:H7

La *Escherichia coli* es una de las bacterias Gram-negativas presente en la flora intestinal de los animales e incluso del ser humano por lo que ha sido de gran interés en el estudio de los mecanismos antibacterianos durante mucho tiempo. *E. coli* pertenece a la familia Enterobacteriaceae (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2009), un grupo de microorganismos que tienen la capacidad de producir variedad de enfermedades en el ser humano; la mayoría están asociadas con infecciones en el aparato urinario.

La estructura de la pared celular distingue a este tipo de bacterias de las demás. La pared celular de *Escherichia coli* tiene un lipopolisacárido formado por tres partes (Figura 3): la primera corresponde al polisacárido O somático importante para la clasificación epidemiológica de las cepas en una misma especie, la segunda al polisacárido central, y la tercera es el lípido A que tiene relación con la actividad de la endotoxina (Bishop, 2019), la bacteria puede modificar la estructura de este último para evitar su detección por parte del sistema inmune del huésped.



**Figura 3.** Segmento del lipopolisacárido (LPS) de la cobertura celular Gram-negativa. Cada molécula de LPS posee un lípido A, una región central del polisacárido y numerosas unidades de antígeno O. Tomado de (Murray et al., 2009)

El serotipo de *E. coli* O157:H7 se emplea para la identificación de cepas que producen enfermedades gastrointestinales, específicamente síndrome hemolítico urémico. Las cepas de *E. coli* generalmente se subdividen en cinco grupos dependiendo del tipo de enfermedad. Las que generan diarrea afectando el intestino delgado pueden ser *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotoxígena (ECET), *E. coli* Enterohemorrágica (ECEH). Las cepas de bacterias que afectan el intestino grueso son posibles la *E. coli* enteroinvasiva (ECEI) y *E. coli* enteroagregativa (ECEA). (Lim, Yoon, & Hovde, 2010).

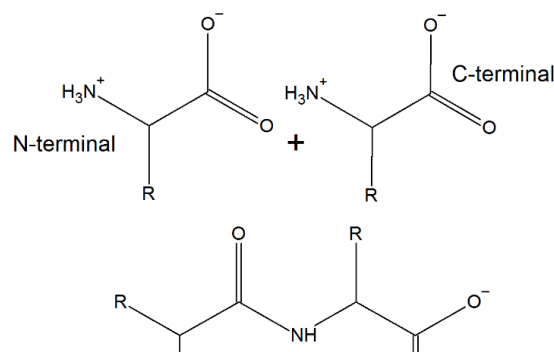
Las cepas de *E. coli* enterohemorrágica causan anualmente gran cantidad de enfermedades en países desarrollados. La ingesta de alimentos cárnicos sin un buen tratamiento térmico,

alimentos contaminados por heces de animales o humanos e incluso verduras crudas pueden causar desde una diarrea hasta una colitis hemorrágica y en el peor de los casos, la muerte. La cepa O157:H7 ha adquirido la toxina Shiga, a saber: Stx-1, Stx-2 o las dos (H, Uhlich, Reichenberger, Cottrell, & Fratamico, n.d.). Estas toxinas poseen una subunidad A y cinco subunidades B que se unen a un glucolípido específico de la célula receptora. Al insertarse la subunidad, la toxina se divide en dos moléculas. Una de esas moléculas inhibe la síntesis de proteínas (Murray *et al.*, 2009). Así mismo, las toxinas Shiga favorecen la expresión de citotoxinas inflamatorias.

Para estudios en el laboratorio existen las cepas de referencia de *E. coli* O157:H7 provistas por la American Type Culture Collection (ATCC), disponible al público como cepa ATCC 43888 la cual no produce la toxina Stx-1 o Stx-2 de acuerdo a la normas de bioseguridad, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) (Collection, n.d.) establecidas por el Departamento de Salud y Servicios Humanos, Servicio Público De Salud, Centro para el Control y Prevención de Enfermedades y el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos.

## 2.9. Péptidos Antimicrobianos

Los péptidos en general son moléculas que están constituidas por aminoácidos que a su vez se encuentran unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Se diferencian de las proteínas en tanto



**Figura 4.** Enlace peptídico entre aminoácidos (Kent, 1988).

que la cantidad de aminoácidos que constituyen un péptido es mucho menor que la de una proteína (Bodanszky, 1993). La secuencia de los aminoácidos forma una estructura primaria y su organización depende del orden en el cual los aminoácidos son adicionados durante el proceso de síntesis.

En general, la secuencia de la estructura primaria tiene dos terminales (Figura 4): uno inicial denominado amino o N-terminal y uno final carboxilo o C-terminal (Kent, 1988).

Los péptidos antimicrobianos, AMPs son moléculas que contribuyen a la acción del sistema inmune innato presentes en gran variedad de organismos multicelulares. Por sus características estructurales y modo de acción, los AMPs pueden interaccionar con la membrana de patógenos y causar daños en el proceso de síntesis de proteínas y de replicación de ADN (Téllez & Castaño, 2010). Además, este tipo de péptidos tiene actividad con amplio espectro debido a que pueden tener actividad antiviral, antifúngica, antibacteriana e incluso antitumoral.

Los péptidos así como las proteínas están constituidos por aminoácidos que al unirse generan una estructura específica secundaria por tanto pueden ser clasificados como lineales, de  $\alpha$ -hélice, de puentes disulfuro y fragmentos de proteínas (Brogden, 2005). Estas moléculas adoptan una estructura anfipática para la interacción con las membranas de los patógenos.

En general, la mayoría de péptidos antimicrobianos poseen una carga positiva a pH fisiológico debido a la presencia de los residuos de Arginina y Lisina por tanto se denominan catiónicos. Adicionalmente, otros tipos de péptidos son los péptidos catiónicos lineales, aniónicos, catiónicos enriquecidos con aminoácidos específicos y péptidos aniónicos y catiónicos con fragmentos de proteína más grande. Los péptidos catiónicos lineales son aquellos que no poseen más de 40 residuos de aminoácidos y que tienen una estructura desordenada en presencia de solventes orgánicos retornando a una estructura de tipo  $\alpha$ -hélice. Los péptidos aniónicos tienen un peso aproximado de 721-823 Da y requieren a Zn como cofactor para aumentar la actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram

negativas. Los péptidos catiónicos con aminoácidos específicos no poseen residuos de cisteína, son lineales y pueden formar péptidos más largos (Brogden, 2005). Finalmente, los péptidos aniónicos y catiónicos con fragmentos de proteína más grande tienen actividad antimicrobiana y son similares entre sí en composición y estructura.

## **2.10. Mecanismos de acción frente a patógenos de los péptidos antimicrobianos**

Por su carácter anfipático, los péptidos catiónicos tienen mayor facilidad de inserción por atracción electrostática en superficies polianiónicas de las paredes celulares y membranas fosfolípídicas de los microorganismos (Hale & Hancock, 2007). La muerte celular mediada por los péptidos antimicrobianos puede darse de diversas formas con diferentes mecanismos de acción entre los que se encuentran la atracción, acoplamiento, inserción y permeabilidad de membrana, y, finalmente, la muerte intracelular.

La atracción es uno de los métodos más sencillos consistiendo en la atracción de los péptidos hacia la superficie de la bacteria mediante un enlace electrostático entre ellos. El acoplamiento se da cuando los péptidos están en la superficie microbiana y deben atravesar algunos polisacáridos antes de actuar con la membrana dependiendo del tipo de bacteria; Gram positiva o Gram negativa. Por otro lado, se encuentran la inserción de péptidos y permeabilidad en la membrana. En este método existen tres tipos de interacción péptido-membrana (Figura 5): modelo alfombra, modelo barril y toroide (Brogden, 2005). En el modelo alfombra, los péptidos se acumulan en la superficie bi-lipídica orientándose en forma paralela a la membrana como consecuencia de la atracción a las cabezas fosfolípídicas en numerosos sitios, cubriendo la superficie. Posterior a ello se generan micelas, desintegrando eventualmente la membrana. El modelo de barril se caracteriza por la unión de péptidos a la membrana bilipídica en forma de “barril” en donde la parte hidrofóbica del péptido se une con la región del núcleo del lípido

y la parte hidrofílica constituye la región interna del poro. Adicionalmente, el modelo toroide está constituido por la inserción de una unión de péptidos en las monocapas de lípidos generando un poro que contribuye a una lisis bacteriana (Hale & Hancock, 2007). El mecanismo de acción por muerte intracelular consiste en la inserción de los péptidos en la membrana hasta su traslado al citoplasma y su posterior acumulación. Esto causa la inhibición de la síntesis de la pared celular, de ácidos nucleicos, de proteínas y actividad enzimática.

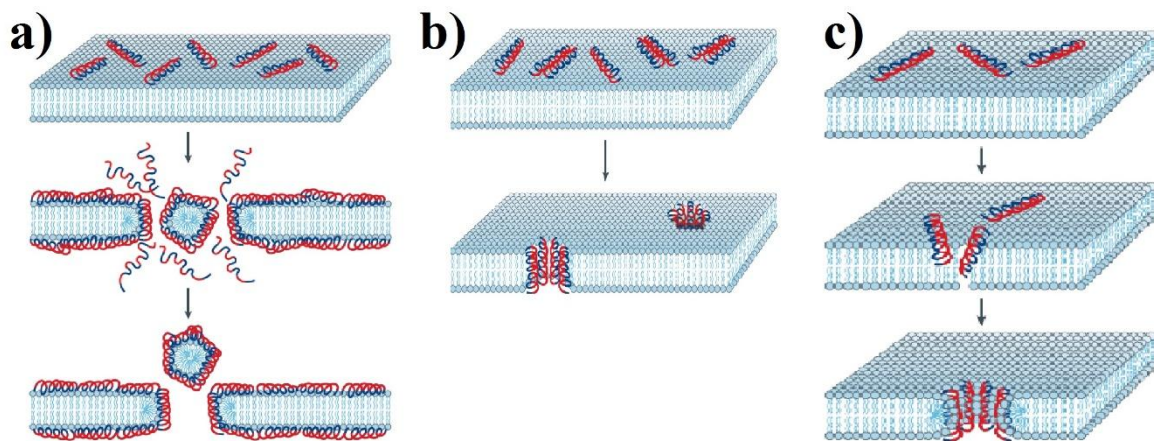


Figura 5. Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos (AMPs). a) Modelo alfombra, b) barril y c) toroide (Brogden, 2005).

### 2.11. Actividad antimicrobiana del péptido Ib-M2

La familia de péptidos antimicrobianos obtenidos a partir de las semillas de *Impatiens balsamina* Ib-AMPs fueron obtenidos por (Tailor *et al.*, 1997). Su estructura se compone de 20 aminoácidos de los cuales cuatro residuos son de cisteína formando dos puentes disulfuro intramolecular. Los péptidos mostraron tener actividad inhibitoria del crecimiento de un amplio rango de bacterias y hongos, no obstante, no mostraron actividad citotóxica en el cultivo de células humanas. La concentración mínima requerida para la inhibición del 50% de las bacterias en *Escherichia coli* de los péptidos Ib-AMP1 e Ib-AMP4 fue de 500µg/mL (Tailor *et al.*, 1997).

El péptido Ib-AMP4 fue modificado en su estructura para generar una nueva familia de péptidos análogos dentro de la que se encuentra el péptido Ib-M2. En primer lugar la carga neta se modificó así como la hidrofobicidad del C-terminal reemplazando residuos acídicos por arginina y triptófano (Flórez et al., 2014). De igual forma, la cantidad de subproductos de la síntesis de los péptidos fueron reducidos mediante el reemplazo de los residuos de cisteína por metionina, eliminando los puentes disulfuro.

La secuencia del péptido Ib-AMP4 e Ib-M2 se muestra en la tabla 1. Para mantener la cantidad de átomos de azufre en la estructura los residuos de Tyr15, Cys6, Cys7 y Cys 16 fueron reemplazados en el proceso de síntesis por residuos de Metionina. Adicionalmente, el residuo Cys-20 y Arg-18 fueron reemplazados por Arg y Trp respectivamente (Flórez et al., 2014).

Tabla 1.

*Actividad antimicrobiana del péptido antimicrobiano Ib-AMP4 y su variante Ib-M2 contra Escherichia coli K-12 en medio Müller Hinton (Flórez-Castillo, Perullini, Jobbágy, & De Jesús Cano Calle, 2014).*

Péptidos	Secuencia de aminoácidos	Carga	IC <sub>50</sub> (µM)	Masa Molecular	
				Calculada	Medida
Ib- AMP4	EWGRRCCGWGPGR YCRRWC-NH <sub>2</sub>	+5	> 100	2538.94	2538.87
Ib-M2	EWGRRMMGWRPGR RMMRWWR-NH <sub>2</sub>	+6	50	2778.40	2778.22

## 2.12. Inmovilización de péptidos

Los péptidos antimicrobianos han mostrado actividad frente a un amplio espectro de patógenos y hongos, por lo que ha llamado la atención de la comunidad científica. No obstante, la degradación por proteasas hace que el tiempo de vida del mismo se vea limitado (Téllez & Castaño, 2010). Una alternativa para evitar la degradación de los péptidos y su funcionamiento, es la inmovilización en soportes sólidos de los mismos (Bodanszky, 1993). La inmovilización

de péptidos sobre superficies puede darse a través de diversas estrategias. En general, el objetivo de la inmovilización es la unión covalente del péptido con la superficie.

Como estrategias de inmovilización se pueden encontrar aquellas que se relacionan con el uso de soportes sólidos, acoplamiento químico, densidad superficial, entre otros (Kent, 1988). En lo concerniente a las estrategias de acoplamiento químico y uso de soportes sólidos se puede observar ciertas condiciones. Dependiendo de la orientación del péptido se favorece la formación de enlaces tipo amida entre los grupos amino de los péptidos y los grupos carboxilo de la superficie o viceversa.

De igual forma, la inmovilización de péptidos puede ser controlada a través de la construcción de la superficie mediante la formación química selectiva mediante un enlace covalente. Si no se controla el proceso de inmovilización y sus condiciones, los grupos amino de la cadena lateral del péptido, en su mayoría catiónicos, serán interferencia para el propósito deseado debido a la presencia de estos grupos en la mayoría de sus aminoácidos.

Una de las formas más efectivas para garantizar la unión covalente del péptido con la superficie es la síntesis del péptido sobre un soporte sólido o fase sólida. En este proceso, la síntesis se da en un soporte sólido. La formación de cadenas peptídicas se da por medio de la unión de C-terminal del aminoácido a un soporte sólido y subsecuentemente se adicionan aminoácidos paso a paso. El soporte generalmente está hecho de materiales insolubles siendo más común la resina polimérica entrecruzada (estireno-co-divinilbenceno en suspensión).

La unión a un soporte sólido favorece la purificación de intermediarios y supera el inconveniente de la baja solubilidad de las especies peptídicas protegidas. El proceso consiste en la unión covalente de un péptido a un soporte sólido por medio de una esterificación o amidación de la cadena mediante N-protecciones, N-desprotecciones y reacciones de acoplamiento de aminoácidos.

La inmovilización de péptidos en superficies de nanopartículas de óxido de hierro requiere del uso de la funcionalización de las mismas por medio del recubrimiento de la superficie de óxido de hierro, específicamente partículas del tipo magnetita  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , con polímeros que permitan el acoplamiento por enlace covalente. El quitosano es uno de los polisacáridos usados para el recubrimiento de partículas. Su estructura  $\beta$  (1-4) –N-acetil-D-glucosamina está basada en la unión de varias unidades monoméricas por medio de enlaces tipo  $\beta$ , caracterizados por estar rotados  $180^\circ$  una respecto a la otra (Elieh-Ali-Komi & Hamblin, 2017). Los grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ) e hidroxilo (OH) del quitosano pueden interactuar fácilmente con los iones Fe en solución acuosa mediante intercambio iónico y reacciones de complejación (Reddy & Lee, 2013). En ese sentido, los grupos OH del quitosano al estar cargados negativamente (Figura 6), interactúan con los de Fe de la superficie de la magnetita (Assa *et al.*, 2016). Los péptidos antimicrobianos catiónicos tienen la posibilidad de ser insertados en la matriz nanopartícula-quitosano mediante distintas reacciones. Si bien la mayoría de péptidos antimicrobianos catiónicos poseen grupos amino laterales, se debe favorecer la protección de ellos y la unión del péptido por el lado del C-terminal con el polisacárido mediante un enlace peptídico con el grupo amino del quitosano.

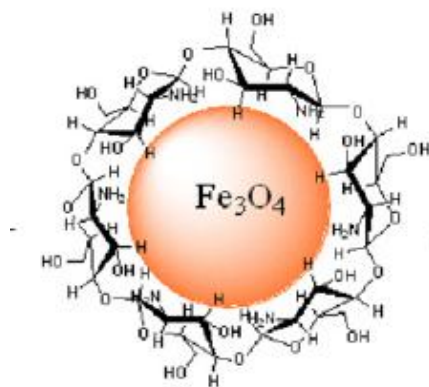


Figura 6. Esquema del recubrimiento de las nanopartículas de óxido de hierro con quitosano (Reddy & Lee, 2013)

Algunas moléculas son usadas como agentes acoplantes. Uno de los que ha sido usados es el ciclohexilcarbodiimida mediante procesos de activación del grupo carboxilo “in situ” en presencia de un componente amino o de formación de un éster activo (Lloyd-Williams, Albericio, & Giralt, 1997). Las reacciones de acoplamiento se llevan a cabo en solventes polares que mejoran eventualmente los rendimientos de las mismas.

El o-(benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluroniotetrafluoroburato, conocido como TBTU (Figura 7), TBTU es una sal de uronio utilizado desde 1978 como agente acoplante en síntesis de péptidos en fase sólida que puede reaccionar con el N-terminal que se encuentra desprotegido en el péptido formando una guanilidina que bloquea la elongación del péptido de forma espontánea favoreciendo los enlaces por el C-terminal (Lloyd-Williams *et al.*, 1997).

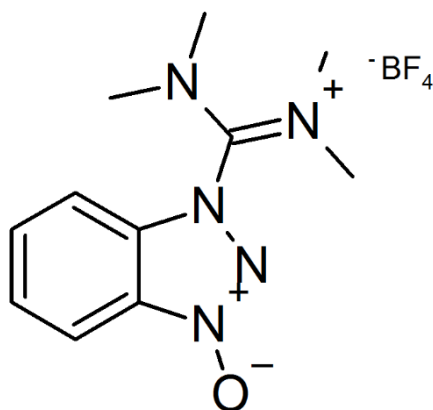


Figura 7. Estructura del o-(benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluroniotetrafluoroburato (TBTU)

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Materiales

Todos los reactivos y sustancias químicas usadas en este experimento fueron de grado analítico obtenidos de diferentes casas comerciales. El agua tipo 1 obtenida del Sistema de purificación

de agua Thermo Scientific™ Barnstead™ Smart2Pure™ todo en uno, nitrógeno gaseoso (N<sub>2</sub>, grado comercial, Praxair), sales de hierro: Cloruro de Hierro (II) tetrahidratado (FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, ≥99.0% (RT), Sigma Aldrich), Cloruro de Hierro (III) hexahidratado (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, ACS, Reag. Ph Eur, Merck), hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH, pureza, marca). El péptido Ib-M2 (EWGRRMMGWPRGRRMMRWWR-NH<sub>2</sub>) fue sintetizado por la casa comercial Biomatik®. Así mismo se usó quitosano (peso molecular medio 190.000-310.000 Da, Sigma Aldrich), ácido acético glacial (CH<sub>3</sub>COOH, 100 %, Merck), (etilendiamina (H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, ≥ 99.0% (a/a), Merck), N,N-Diisopropiletilamina ([ (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH]<sub>2</sub>NC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, ≥99% , Sigma Aldrich), 2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio tetrafluoroborato (C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>BF<sub>4</sub>N<sub>5</sub>O, ≥98.0 % (a/a), Sigma Aldrich).

Adicionalmente se utilizó Caldo Müeller Hinton (Scharlau), Caldo Luria-Bertani (Conda), Agar Müeller Hinton (Merck), cloruro de sodio (NaCl, ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Merck), todo debidamente esterilizado. Así como la cepa *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC® 43888™)

### 3.2. Preparación de Nanopartículas

Las nanopartículas de óxido de hierro fueron sintetizadas mediante el método de co-precipitación (Predoi, 2007) para esto se utilizaron 25 mL una solución 0,2 M hierro total, en proporción [1:2] de los iones Fe<sup>2+</sup>: Fe<sup>3+</sup> Para la formación de las nanopartículas se aumentó el pH de la solución de los precursores de hierro utilizando; por un lado, una solución de NH<sub>4</sub>OH 1M (Nps-NH) hasta obtener un pH de 10 y por otro, una solución de etilendiamina 2.5M (Nps-Et) hasta un pH de 9.4. Esto fue llevado a cabo en una atmósfera de nitrógeno gaseoso y en agitación constante a 1500 rpm a temperatura ambiente, obteniéndose un precipitado negro o marrón, dependiendo de la base empleada. Seguidamente se hicieron tres lavados con agua

tipo 1 a 15000 rpm durante 1 hora a 4 °C, obteniéndose una concentración de nanopartículas de 7 mg/mL y 8 mg/mL.

### 3.3. Preparación Bioconjugado

Se preparó una suspensión de nanopartículas (NPs) de óxido de hierro con una concentración de 800 µg/mL. A 1 mL de esta solución se adicionaron 160 µL de quitosano (0,5 % m/v en Ácido Acético 2 % v/v); esta mezcla se mantuvo en agitación constante durante dos horas a una velocidad de 2000 rpm. Posteriormente, las nanopartículas recubiertas (NPs@Chi) fueron lavadas nuevamente tres veces con agua tipo 1 a 15000 rpm durante una hora a 4 °C.

Para llevar a cabo el proceso de inmovilización del péptido Ib-M2 se realizó la formación de un enlace peptídico entre el grupo carboxilo del péptido y el grupo amino del quitosano. Para esto, se tomaron 70 µL de péptido Ib-M2 de concentración 2000 µM y se adicionaron 44,9 mg de TBTU, 24,2 µL de DIPEA permitiendo la activación del grupo carboxilo del péptido durante 20 minutos de manera similar a la síntesis de péptidos en fase sólida (Kent, 1988; Lloyd-Williams *et al.*, 1997). Posteriormente, se adicionó el péptido activo a la suspensión de nanopartículas recubiertas con quitosano y se permitió la reacción con el grupo amino de este último durante dos horas bajo agitación constante.

Posteriormente, la suspensión fue centrifugada a 15000 rpm a 4 °C. Para la determinación de la cantidad de péptido inmovilizado se determinó la concentración del péptido antes del proceso de inmovilización y el péptido en el sobrenadante después de la inmovilización utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976) con el kit Quick Start™ Bradford Protein Assay de BioRad determinando la absorbancia a 595 nm.

Para determinar el porcentaje de péptido inmovilizado se utilizó la Ecuación 1:

$$\% \text{ Inmovilización: } \frac{Abs_{\text{péptido libre}} - Abs_{\text{sobrenadante}}}{Abs_{\text{péptido libre}}} \times 100 \quad (1)$$

En donde  $Abs_{\text{péptido libre}}$  corresponde a la absorbancia del péptido activado con TBTU y DIPEA antes de ser puesto con las nanopartículas para su inmovilización y  $Abs_{\text{sobrenadante}}$  a la absorbancia del sobrenadante proveniente de la primera centrifugación.

### **3.4. Caracterización Estructural NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y Bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi**

**3.4.1. Espectroscopia IR.** Los espectros IR se registraron utilizando el espectrofotómetro FTIR Tensor II Bruker, en un rango de registro de 4000-400 cm<sup>-1</sup>, con 16 exploraciones por muestra y una velocidad óptica de 0,4747 cm/s. La cantidad de exploraciones fue suficiente para dilucidar las vibraciones propias de los enlaces de la molécula y la composición de la misma. Mediante esta técnica se pudo comprobar el enlace Fe-O característica de este tipo de nanopartículas.

**3.4.2. Dispersión de Luz Dinámica o DLS.** Los espectros DLS se registraron en el equipo Zetasizer ZS90 de Malvern con una radiación láser de gas Helio-Neón de longitud de onda 632 nm. La muestra fue diluida 1:1000 a partir de una concentración de nanopartículas de 800 µg/mL con agua tipo 1 y agitada vigorosamente.

**3.4.3. Difracción de Rayos X.** Las nanopartículas de óxido de hierro fueron caracterizadas por medio de difracción de rayos X con el fin de determinar su cristalinidad. Los perfiles de difracción de rayos X de las NPs fueron registrados en el difractómetro Bruker D8 ADVANCE operado a 40 kV y 40 mA, usando radiación Cu-Kα1 (1.540598 Å) seleccionada con filtro Ni con un paso de 0.02035° y un tiempo de 0,6 s por paso.

**3.4.4. Espectroscopia foto electrónica de Rayos X (XPS).** Mediante esta técnica se pudo obtener información respecto a los estados de oxidación del hierro en las nanopartículas obtenidas.

**3.4.5. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).** Las micrografías (SEM) de las NPs, NPs@Chi e Ib-M2/NPs@Chi se obtuvieron con un microscopio Quanta Field Emission Gun (Modelo 650) operado a 20.0 kV. Las imágenes fueron obtenidas en modo de electrón secundario.

### **3.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana del bioconjugado contra cepa *E. coli* O157:H7.**

La actividad antimicrobiana del bioconjugado se evaluó teniendo en cuenta el método de macrodilución del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio presente en la novena edición de los Métodos para la evaluación de la actividad antimicrobiana por dilución, con algunas modificaciones (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2000).

**3.5.1. Preparación de subcultivo de *E. coli*.** Se realizó el inóculo a partir del raspado de la cepa de *E. coli* que estaba a -80°C con un asa bacteriológica estéril en 5mL de Caldo LB en un tubo taparrosca. Posteriormente, se incubó durante 18 horas a 37 °C.

### 3.5.2. Determinación de la Cinética de crecimiento bacteria *E. coli* O157:H7.

La cinética de crecimiento de *E. coli* se llevó a cabo por el método de macrodilución en celdas UV-transparentes de dimensiones 12.5 x 12.5 x 45 mm. La prueba se hizo para cada una de las etapas de preparación del bioconjugado, es decir, las diluciones se hicieron para las nanopartículas NPs, nanopartículas recubiertas con quitosano NPs@Chi y el bioconjugado Ib-M2/ NPs@Chi. A continuación, se describe el procedimiento realizado para cada una de las diluciones, teniendo en cuenta que se realizaron por triplicado. Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad.

En 30 celdas UV se hicieron diluciones seriadas de las NPs, NPs@Chi e Ib-M2/NPs@Chi con MHB y subcultivo de *E. coli*  $1 \times 10^6$  UFC/ml. Las concentraciones finales en cada tipo de muestra fueron, a saber: 120,67 mg/mL, 60,34 mg/mL de NPs y NPs@Chi; 6,25  $\mu$ M, 3,10  $\mu$ M de péptido en el bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi.

Cada una de las muestras diluidas en las celdas fue incubada a 37°C en continua agitación (130 rpm) durante 24 h. Se monitoreó el crecimiento bacteriano cada dos horas tomando la absorbancia a 625 nm cada dos horas hasta las 10 h y luego a las 24 h.

### 3.6. Estabilidad del bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi

Después de haber comparado los resultados de la concentración mínima inhibitoria (MIC) del péptido libre, con la actividad del bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi frente a la cepa de *E. coli* O157:H7 y determinar la concentración a la cual el bioconjugado tuvo actividad, se procedió a evaluar la estabilidad del bioconjugado así como del péptido Ib-M2 después de 7 y 20 días de su almacenamiento.

El bioconjugado preparado se llevó a una concentración de péptido inmovilizado de 6,25  $\mu$ M suspendido en una solución de Tris-HCl 10  $\mu$ M para evaluar su estabilidad en el tiempo

mediante la técnica de Espectrometría de Masas MALDI-TOF. Lo mismo fue hecho con el péptido libre. Cada una de las soluciones fue distribuida en doce viales de 2 mL, seis por cada solución, cada uno con un contenido de 400  $\mu$ L. En la Tabla 2 se especifican las condiciones de almacenamiento de los viales durante 20 días a temperatura ambiente (amb) y a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Adicionalmente, se almacenaron 2 mL de péptido libre y de bioconjugado, respectivamente, en cuatro viales de 1 mL, con una concentración de péptido inmovilizado de 6.25  $\mu$ M. Se dispusieron a temperatura ambiente y a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Tabla 2.

*Condiciones de almacenamiento del péptido Ib-M2 libre y del bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi a 6,25  $\mu$ M para la evaluación de la estabilidad durante 20 días.*

<b>Nro. de muestra</b>	<b>Temperatura de almacenamiento</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>
<b>1</b>	amb	Péptido libre	6,25 $\mu$ M
<b>2</b>	$-20^{\circ}\text{C}$		
<b>3</b>	amb	Bioconjugado	6,25 $\mu$ M
<b>4</b>	$-20^{\circ}\text{C}$		

Luego de siete días se evaluó la actividad antimicrobiana del péptido libre y bioconjugado almacenados a temperatura ambiente y  $-20^{\circ}\text{C}$ , mediante el método de macrodilución (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2000) descrito en el numeral 3.5 del presente documento. La prueba consistió en la determinación de la cinética de crecimiento en las mismas condiciones de medio CMH, temperatura, agitación y tiempo, de la evaluación de la actividad antimicrobiana del bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi y la determinación de concentración mínima inhibitoria del péptido Ib-M2. En este caso, solo se evaluó el crecimiento bacteriano en presencia de péptido Ib-M2 de concentración 6.25  $\mu$ M que había sido almacenado; uno a -

20°C y otro a temperatura ambiente, durante una semana. De igual forma, se estudió la actividad del bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi con concentración de péptido de 6,25 µM, almacenado en las mismas condiciones que el péptido antimicrobiano, a saber: -20°C y temperatura ambiente.

**3.6.1. Espectrometría de masas MALDI TOF.** Se determinó la masa molecular del péptido 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  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (ACC) como matriz.

## 4. Resultados

### 4.1. Preparación de Nanopartículas.

Las nanopartículas preparadas de acuerdo al método de co-precipitación (Predoi, 2007) se presentan en la Figura 8. La Figura 8a corresponde a las Nps-NH y presentan un precipitado de color negro. Por otro lado, la figura 8b corresponde a las Nps-Et, las cuales presentaron un precipitado marrón.

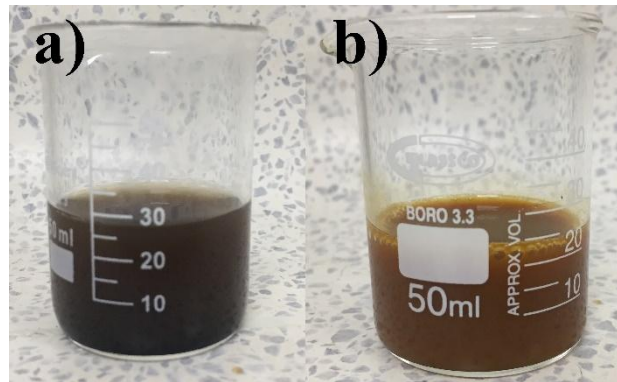


Figura 8. Solución de nanopartículas de óxido de hierro. a) Nps-NH, b) Nps-Et

Durante el proceso de preparación de Nps-NH y Nps-Et se monitoreó el pH para determinar el punto de equivalencia (Figura 9) el cual, según Jolivet, *et al* (2004), indica la formación de la magnetita  $Fe_3O_4$  está alrededor de un pH de 6-8. En la Figura 9a se observa la curva de titulación de la solución de sales de hierro  $Fe^{2+}:Fe^{3+}$  con hidróxido de amonio, para Nps-NH, en donde la relación molar entre el  $NH_4OH$  necesaria para alcanzar el punto de equivalencia fue 2.3. Esto se presenta por la permanencia del anión en la solución en mayor proporción. En ese sentido, en la Figura 9a, predomina la formación de magnetita, ya que no hay un desplazamiento a la derecha o a la izquierda como en la Figura 9b.

En la Figura 9b la curva de titulación de las sales muestra que la relación molar entre la Etilendiamina y la cantidad de hierro total, necesaria para alcanzar el punto de equivalencia,

fue menor que en Figura 9a. Esto quiere decir que, bajo estas condiciones en las sales de hierro el catión que permaneció fue el  $\text{Fe}^{2+}$ . Jolivet, *et al* (2004), determinó que en soluciones en las que se llegue al punto de equivalencia a bajas relaciones molares, va a predominar la maghemita en tanto que solo basta de una pequeña cantidad de  $\text{Fe}^{2+}$  que no se haya disuelto con  $\text{Fe}^{3+}$  para inducir la formación de una espinela en el proceso de cristalización (Jolivet, Chanéac, & Tronc, 2004).

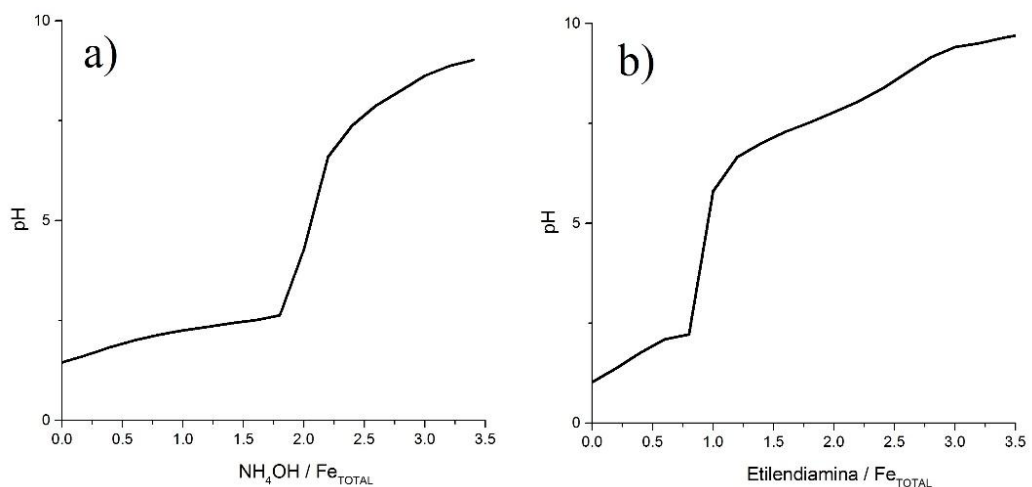


Figura 9. Curva de titulación pH vs Relación molar de las sales de hierro en presencia de a)  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{Fe}_{\text{total}}$  y b) Etilendiamina /  $\text{Fe}_{\text{total}}$

#### 4.2. Caracterización Nanopartículas de óxido de hierro.

Para determinar la estructura y tipo de polimorfo de las nanopartículas óxido de hierro que fueron preparadas, se requirió de las siguientes técnicas espectrofotométricas.

**4.2.1. Espectroscopia IR.** Con el fin de determinar la composición química de las nanopartículas de óxido de hierro se tomaron los espectros IR de las Nps-NH y Nps-Et secadas durante dos semanas a 40°C (Figura 10).

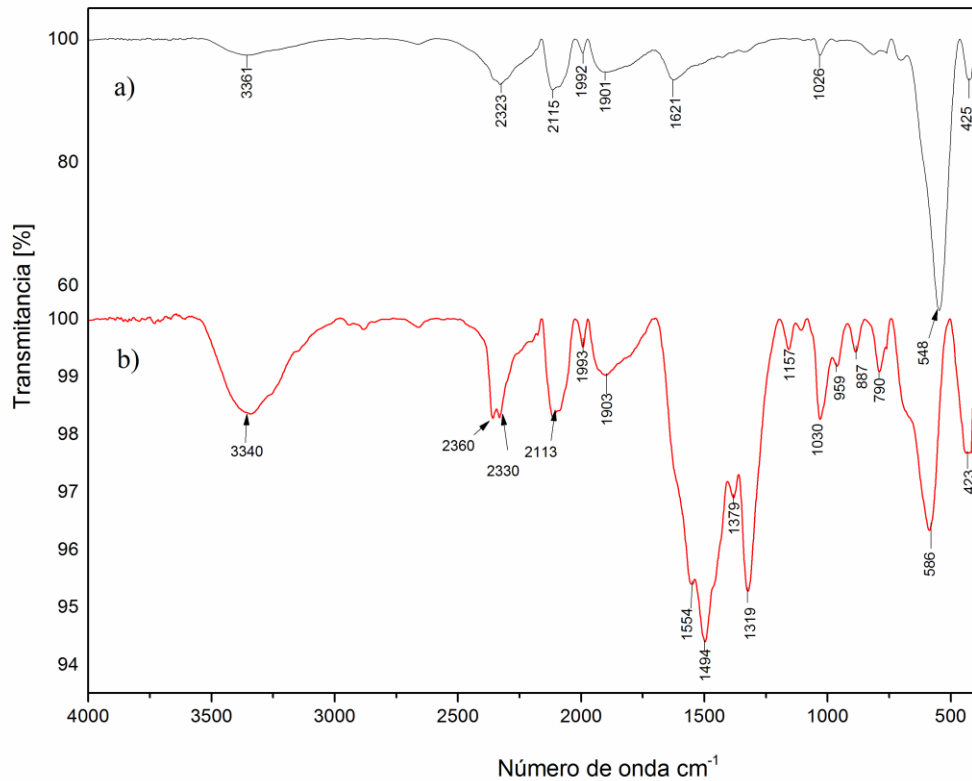


Figura 10. Espectro IR de a) Nps-NH, b) Nps-Et 2.5 M.

El espectro de las Nps-NH se presenta en la Figura 10a, en donde se observa inicialmente una banda en 3361  $\text{cm}^{-1}$  con una intensidad baja, que corresponde a la tensión N-H simétrica de una amina primaria. De manera complementaria, las bandas ubicadas entre 2323 y 1901  $\text{cm}^{-1}$  se atribuyen a la presencia de agua en debido a que el proceso de secado no superó la temperatura de 40°C (Li, Church, & Woodhead, 2012). En 1621  $\text{cm}^{-1}$ , aparece una banda relacionada con la flexión N-H de aminas primarias. Adicionalmente, la banda que se presenta en 548  $\text{cm}^{-1}$  está estrechamente asociada con el enlace Fe-O; representativa para la magnetita, polimorfo de las nanopartículas de óxido de hierro.

Por otro lado, al analizar la Figura 10b correspondiente al espectro IR de las Nps-Et se puede observar que a  $3340\text{ cm}^{-1}$  hay una banda de gran intensidad que corresponde a una tensión N - H simétrica y asimétrica que puede estar superpuesta con la banda que indica la tensión asimétrica en la misma región. Al tener en cuenta la etilendiamina puede permanecer en la superficie de la nanopartícula y, por tanto, se debe observar bandas representativas de una amina primaria en la región de  $1640$  a  $1300\text{ cm}^{-1}$ . En este caso, se evidencian dos bandas muy intensas que corresponden a la flexión N-H propia de las aminas primarias. La banda en  $586\text{ cm}^{-1}$  confirma la presencia de un enlace Fe-O. Según lo descrito por Ishii *et al* (1972), las bandas en la región de  $580$ - $420\text{ cm}^{-1}$  son características de la vibración de tensión Fe-O para la magnetita. Para el óxido de hierro existen cuatro modos vibracionales característicos en la región de  $700$ -  $300\text{ cm}^{-1}$ , a saber:  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ,  $\nu_3$  y  $\nu_4$ . En general, los modos de vibración son de tensión Fe-O, de los iones de  $\text{Fe}^{3+}$  así como de  $\text{Fe}^{2+}$  que están en los sitios octaédricos sin tener en cuenta su desplazamiento en la celda unidad de una estructura cristalina tipo espinela inversa como lo es la magnetita  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Hwang, Umar, Dar, Kim, & Badran, 2014; Rahman, Mohapatra, & Ahmad, 2012).

**4.2.2. Dispersión de Luz Dinámica o DLS.** El tamaño del diámetro de partícula medido por Dispersión de Luz Dinámica se presenta en la Figura 11. Se midió el espectro de la suspensión de nanopartículas en agua tipo 1.

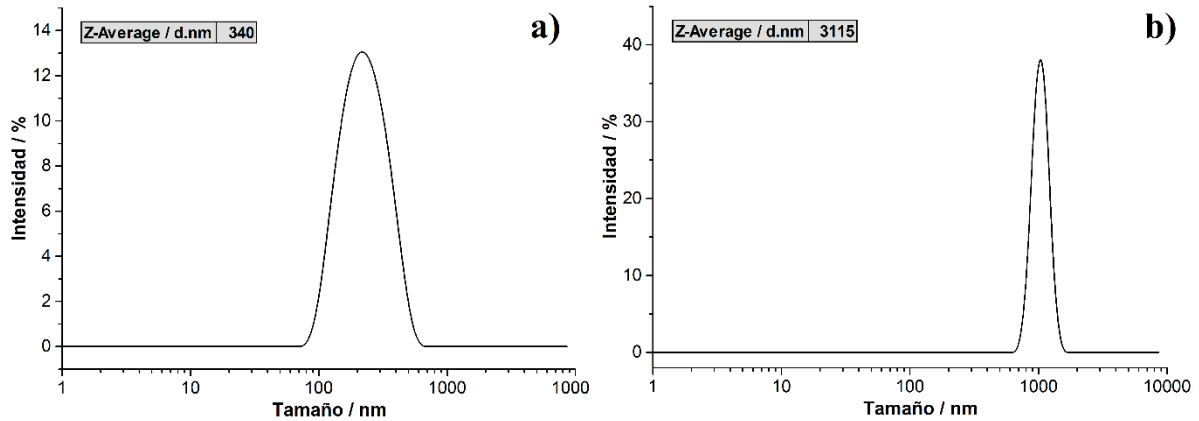


Figura 11. Espectro de dispersión de luz dinámica (DLS) de: a) Nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  preparadas con  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Nps-NH), b) Nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  preparadas con Etilendiamina (Nps-Et).

El tamaño promedio del diámetro de las nanopartículas de acuerdo al tipo de preparación fue diferente, como se esperaba por la apariencia de las suspensiones. Las Nps-NH al tener una respuesta más efectiva al aplicar un campo magnético, rápidamente se aglomeran, incluso en ausencia del mismo.

En la Figura 11a se observa que las Nps-NH presentaron un tamaño aproximado de 340 nm, con una distribución de poco homogénea por la amplitud de la banda en el espectro. Por otro lado, la distribución de tamaño de las Nps-Et se presenta en la Fig. 11b y se observa una distribución más homogénea. No obstante, el promedio del diámetro de las nanopartículas es de 3115 nm. El tamaño promedio del diámetro tanto de las Nps-NH y Nps-Et, difiere del que se obtuvo por SEM (Figura 12) en tanto que el tamaño de partícula determinado por las imágenes es menor. Al ser partículas con núcleos magnéticos, la tendencia a la aglomeración aumenta a medida que pasa el tiempo, con una consecuente precipitación. (Kolen'Ko *et al.*, 2014; Rahman *et al.*, 2012)

**4.2.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).** Las imágenes obtenidas por el microscopio electrónico de barrido (SEM) permiten observar el tamaño de partícula y su distribución. En la Figura 12, se encuentran las imágenes correspondientes a las nanopartículas sin recubrimiento para los dos tipos de preparación sugeridos en los métodos.

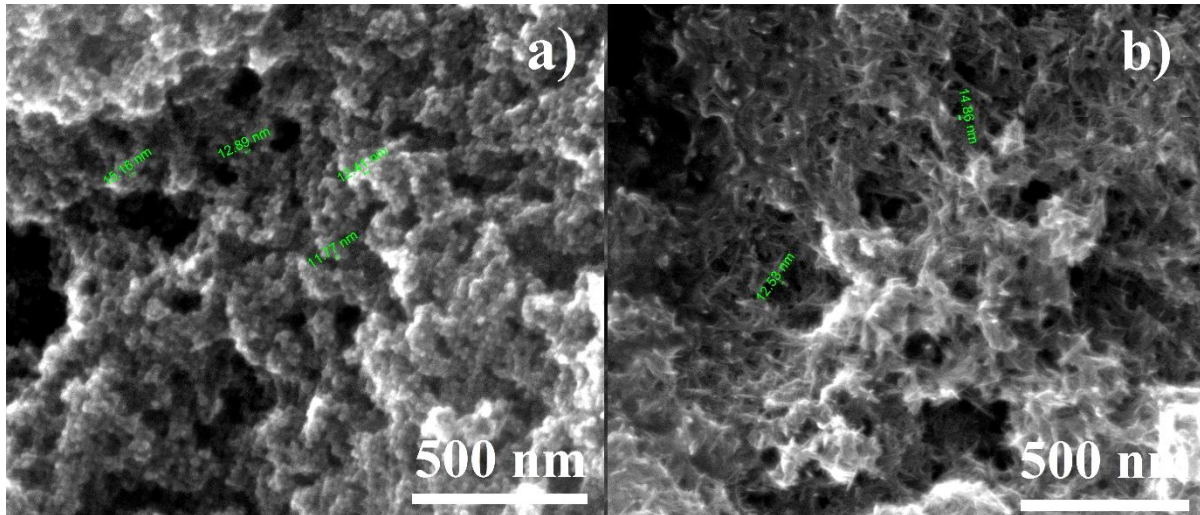


Figura 12. Microscopías obtenidas por (SEM) que muestran el tamaño de partícula para a) NPs-NH y b) Nps-Et 2.5 M.

Las Nps-NH muestran una forma circular con un tamaño de partícula promedio  $13.05 \pm 1.47$  nm, a pesar de estar aglomeradas por ser partículas magnéticas (Fig. 12a). En la Figura 12b, las Nps-Et se observan con una figura un poco irregular con un tamaño de partícula promedio  $13.69 \pm 1.65$  nm. Con base en lo observado en las imágenes se pudo establecer que el tamaño de las nanopartículas es menor al que muestra el análisis por DLS. En ese sentido se afirma que, por su carácter magnético, las partículas tienden a aglomerarse incluso si están a una baja concentración.

**4.2.4. Difracción de Rayos X.** Los patrones de difracción de Rayos X de las nanopartículas Nps-NH y Nps-Et se comparan en la Figura 13. El difractograma de color negro corresponde a NPs-NH y el de color rojo a Nps-Et.

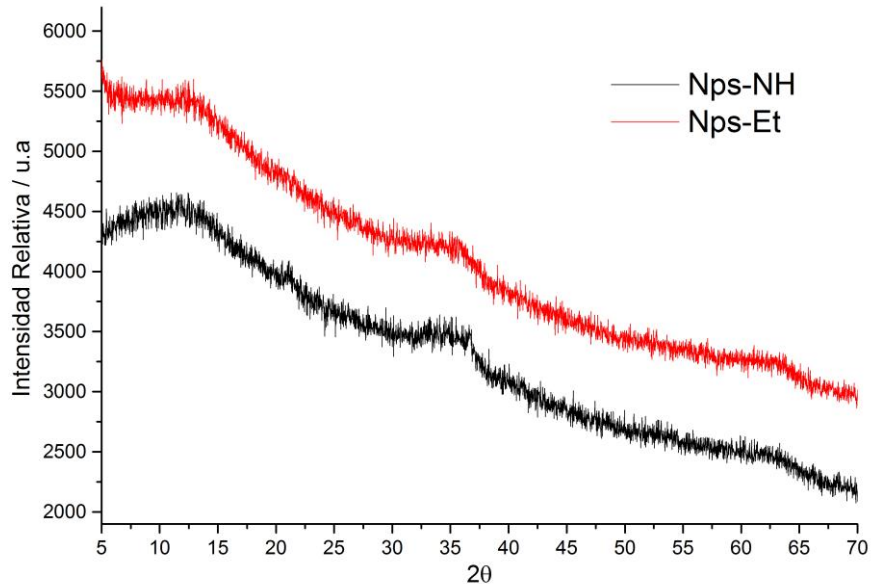


Figura 13. Patrón de difracción de Rayos X de los cristales de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Se evidencian ciertos picos de baja intensidad a  $2\theta=35.4^\circ$ ,  $62.5^\circ$ . De acuerdo con Chen *et al* (2011) los picos ubicados a  $35.4^\circ$ ,  $62.5^\circ$  pueden ser indexados a los planos (3 1 1) y (4 4 0) de una celda cúbica (Chen *et al.*, 2011). La estructura cristalina de las nanopartículas fue asociada con el perfil de difracción reportado en la base de datos PDF-2 (2014) para cada una de las muestras: Nps-NH (PDF No. 01-073-9877) y Nps-Et (PDF No. 01-076-7161). La base de datos indica que para esas muestras la fase cristalina es magnetita.

Debido a la baja intensidad los picos es difícil realizar un análisis cristalográfico adecuado, esto como consecuencia del tratamiento térmico de la muestra, la cual no fue calcinada sino secada a una temperatura de  $40^\circ\text{C}$  durante dos semanas. Estas condiciones no aseguran que la fase cristalina esté definida. Por este motivo, es necesario corroborar las fases cristalinas mediante el análisis complementario con Espectroscopía foto electrónica de Rayos X (XPS).

**4.2.5. Espectroscopia foto electrónica de Rayos X (XPS).** La caracterización directa de las nanopartículas de óxido de hierro, por medio de la técnica espectroscópica foto electrónica de Rayos X (XPS), permitió conocer características de la de la muestra mediante el análisis de la posición de los picos y su respectiva comparación con lo reportado en la literatura previamente (Banerjee *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2014; Yamashita & Hayes, 2008). Las Figuras 14 y 15 contienen los espectros XPS de las nanopartículas Nps-NH y Nps-Et para las especies de Fe, N y O.

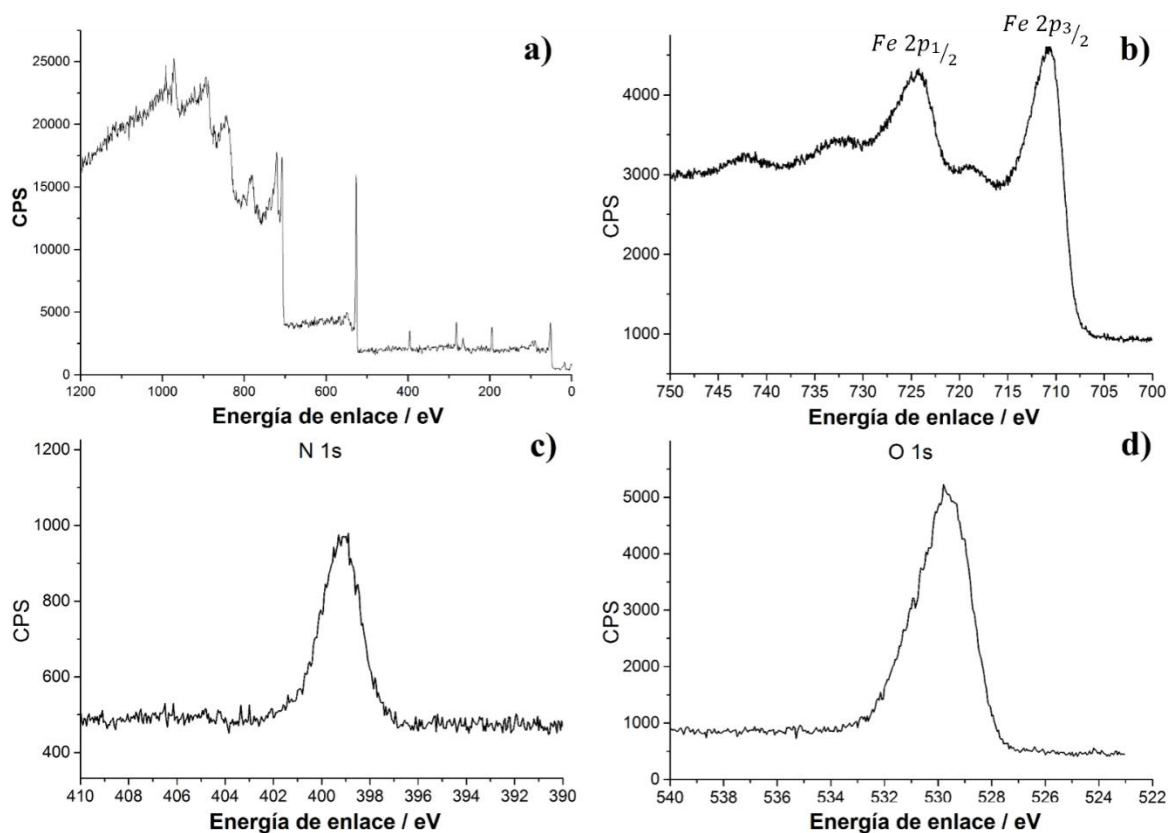


Figura 14. Espectro XPS a) General de las NPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  preparadas con  $\text{NH}_4\text{OH}$ , b) Fe (2p), c) N (1s) y finalmente de d) O (1s)

En la Figura 14a, El pico de las energías de enlace para Fe  $2p_{1/2}$  y para Fe  $2p_{3/2}$  son 724.13 y 710.78, respectivamente, con un diferencial  $\delta E=13.35$  eV, valor cercano al reportado por (Cheng *et al.*, 2011) asociado con la magnetita ( $\delta E=13.21$  eV). El incremento en la diferencia de energía se debe al desplazamiento del pico principal del  $2p_{1/2}$  hacia el lado de mayor energía, esto como consecuencia de la variación en la disposición de los iones  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  en la celda

unidad y, por consiguiente, variación en la fase cristalina del óxido de hierro (Banerjee *et al.*, 2006). La presencia de picos satélites entre 720-715 eV y 730-735 eV con una intensidad baja se debe a la superposición de las contribuciones de los componentes octaédricos de Fe<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup> con las de los componentes Fe<sup>3+</sup> tetraédricos (Cheng *et al.*, 2011; Fujii, Groot, & Sawatzky, 1999). En la Figura 15a, correspondiente al espectro de Fe, los picos de Fe 2p<sub>1/2</sub> y para Fe 2p<sub>3/2</sub> fueron 723.78 y 710.49, respectivamente, con un diferencial  $\delta E=13.29$  eV. En este espectro, la formación de picos satélites es aún visible en la región de 720-716 eV y 733-729 eV. Al ser más intensos los picos satélites, se puede inferir que la fase cristalina no es propiamente magnetita sino maghemita (Yamashita & Hayes, 2008).

Respecto al espectro de N 1s en la Figura 14c de las Nps-NH se obtuvo un pico de mayor intensidad a 399.05 eV, que se relaciona en la mayoría de los casos a la formación de complejos metálicos coordinados con nitrógeno (Lu *et al.*, 2014). De acuerdo con lo anterior, la posición del pico de N 1s puede indicar la presencia de nitrógeno en la estructura cristalina en tanto que durante la preparación de las nanopartículas hubo un flujo constante de N<sub>2</sub> y en su posterior calentamiento para el tratamiento de la muestra para esta técnica no superó los 40°C. Para las Nps-Et (Figura 15c), el pico del N 1s aparece en 398.60 eV.

De acuerdo con lo reportado por Fujii *et al.*, el espectro XPS de O 1s de los polimorfos Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> caracterizado por una celda unidad centrada en las caras FCC (Mulay, Borade, Bele, & Khale, 2011) y  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> es similar (530 eV) (Fujii *et al.*, 1999). En este sentido, el espectro O 1s para las nanopartículas de Nps-NH tiene un pico máximo a 529.08 eV (Fig. 14d) mientras que para las nanopartículas de Nps-Et el pico aparece en 529.79 eV (Fig. 15d) por lo tanto se sugiere que su fase cristalina es tipo maghemita. (Fujii *et al.*, 1999).

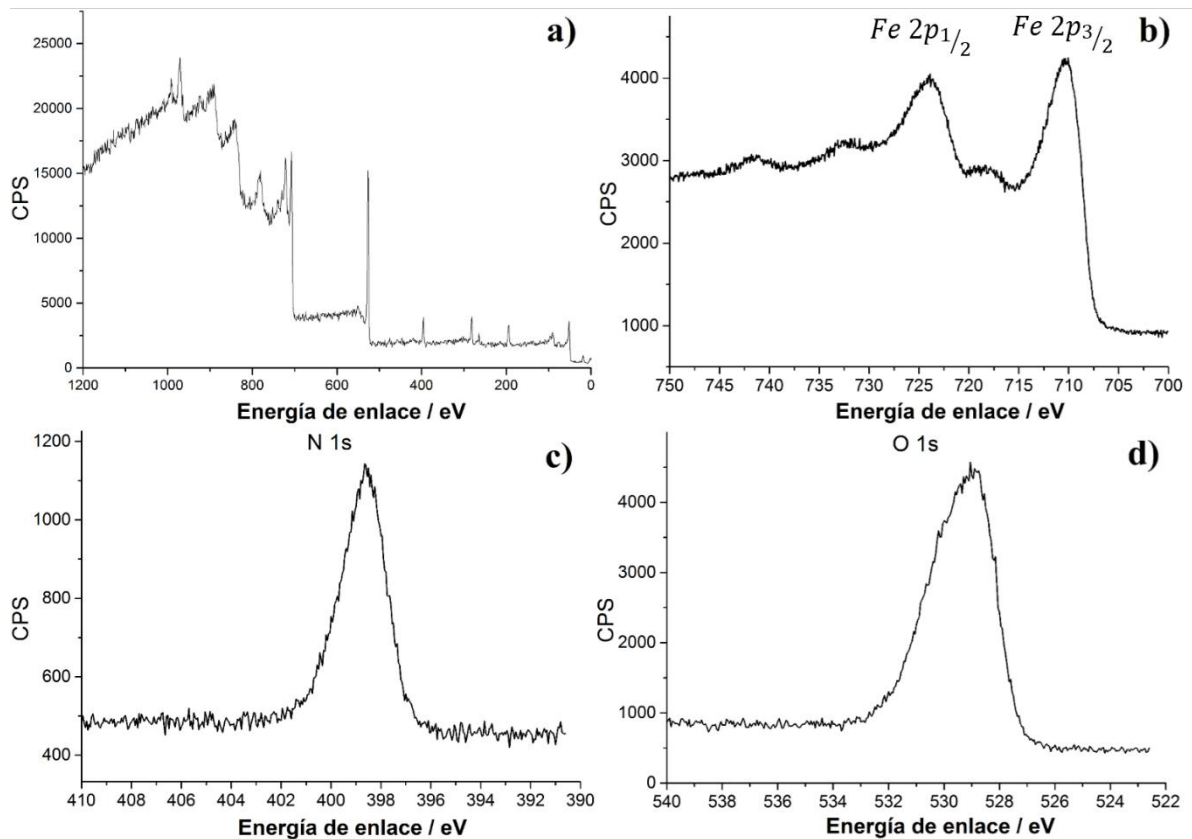
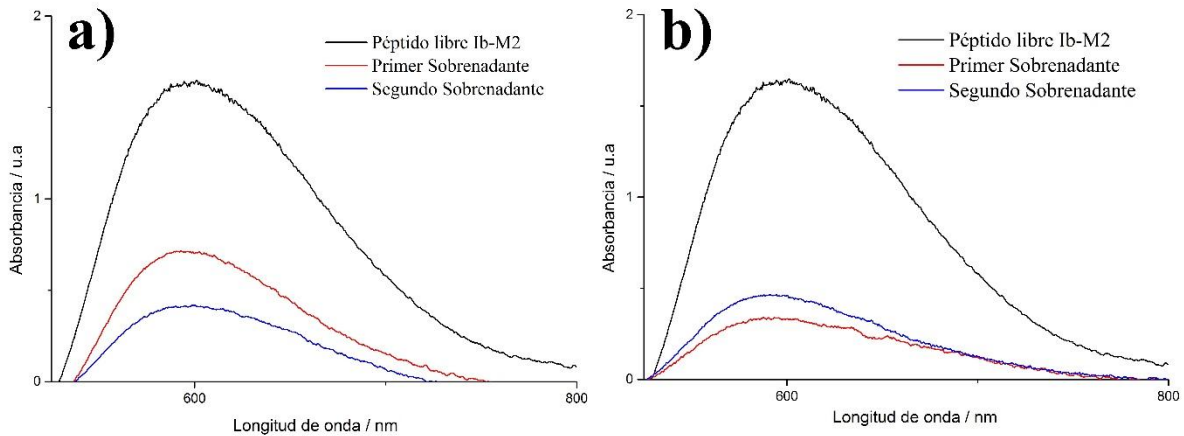


Figura 15. Espectro XPS a) General de las NPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  preparadas con Etilendiamina, b) Fe (2p), c) N (1s) y finalmente de d) O (1s).

### 4.3. Preparación Bioconjugado.

La inmovilización del péptido Ib-M2 se monitoreó por medio de la determinación de la absorbancia a 595 nm antes y después de ser agregado a las nanopartículas. En la Figura 16 se encuentran las gráficas correspondientes a la inmovilización del péptido en NPs-NH recubiertas con quitosano (NPs@Chi-NH) y Nps-Et recubiertas con quitosano (NPs@Chi-Et)



**Figura 16.** Inmovilización del péptido en NPs recubiertas con quitosano. a) NPs@Chi-Nh y b) NPs@Chi-Et

En ese sentido, en la Figura 16a, se observó una disminución en la absorbancia del primer sobrenadante proveniente de la centrifugación del bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi-NH, lo que indica que disminuyó la cantidad de péptido en solución y fue, por tanto, inmovilizado después de dos horas de agitación. El porcentaje de inmovilización de péptido en las NPs@Chi-NH fue 56.52% calculado con la Ecuación 1 mencionada en el método de inmovilización de péptido. En el segundo sobrenadante de la Fig. 16a la absorbancia disminuyó aún más, por lo que se puede concluir que el péptido si se unió a NPs@Chi-NH, el porcentaje de inmovilización respecto al valor inicial de concentración de péptido Ib-M2 fue de 74.67 %. En el espectro UV-Vis de la Figura 16b, se observan las absorbancias del primer y segundo sobrenadante. Las NPs@Chi-Et tuvieron un porcentaje de inmovilización de 79.30%. Sin embargo, en el segundo sobrenadante se observa un aumento en la absorbancia, lo que indica una liberación del péptido desde las Nps y por lo tanto una inmovilización no efectiva. El porcentaje de inmovilización del péptido en las Nps-Et en el segundo sobrenadante, respecto al valor inicial de concentración de Ib-M2 en solución fue 71.92%. Esto puede atribuirse a la cantidad de grupos amino del quitosano que estén disponibles para la formación del enlace covalente con el péptido (Chen *et al.*, 2011).

#### 4.4. Caracterización estructural del Bioconjugado.

Después de haber hecho un análisis estructural de las nanopartículas en sus dos formas de preparación y habiendo establecido el porcentaje de inmovilización, se procedió a evaluar el tamaño de partícula mediante la microscopía electrónica de barrido (SEM).

**4.4.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).** En la Figura 17 se aprecian las micrografías obtenidas por el microscopio electrónico de barrido (SEM) que permiten observar el tamaño de partícula y la distribución de la misma para los dos tipos de bioconjugados que se prepararon. Esto permitió la elección del bioconjugado a utilizar en la evaluación de la actividad antimicrobiana contra una cepa de *E. coli* O157:H7.

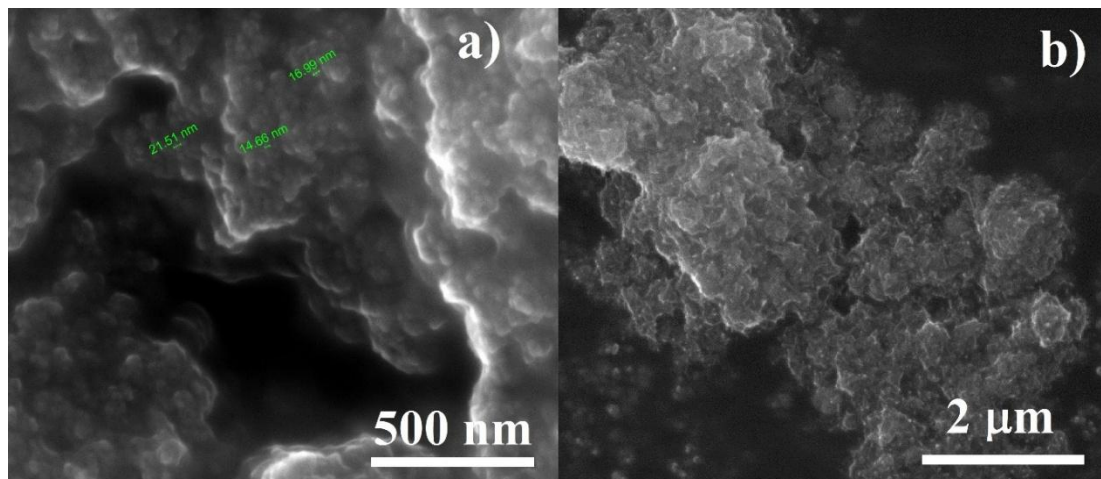


Figura 17. Microscopías obtenidas por (SEM) que muestran el tamaño de partícula para a) Ib-M2/NPs@Chi NH<sub>4</sub>OH y b) Ib-M2/NPs@Chi Etilendiamina 2.5M.

La microscopía del bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi-NH observado en la Figura 17a tiene un tamaño promedio de  $17.72 \pm 3.48$  nm. El incremento en el tamaño promedio se debe a la presencia del quitosano como recubrimiento además del péptido. El bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi-Et, tiene un tamaño promedio  $21.04 \pm 2.37$  nm de acuerdo con lo evidenciado en la Figura 17b. En esta figura es evidente que los núcleos de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> fueron recubiertos por quitosano y péptido, generando una partícula amorfa pero que sugiere una buena combinación

de los materiales entre sí. La ausencia de un campo magnético externo genera las interacciones magnéticas dipolo-dipolo entre las partículas causando la aglomeración de las partículas (Maity & Agrawal, 2018) evidenciada en los cuatro casos.

Con base en la información obtenida en la caracterización estructural se puede deducir que las nanopartículas Nps-NH y Nps- Et poseen ciertas diferencias entre sí, que permiten hacer una elección de la nanopartícula más apropiada para utilizarla como matriz del péptido Ib-M2, formación del respectivo bioconjugado y posteriormente evaluar su actividad. Si bien el tamaño de partícula determinado por DLS fue superior al esperado como consecuencia de una aglomeración de partículas debido a su magnetización, con las imágenes de SEM se pudo dilucidar el tamaño real siendo ligeramente menor el de Nps-NH que Nps-Et. Así mismo, se buscaba obtener unas nanopartículas de tipo magnetita por sus características magnéticas, las cuales son superiores a las de las nanopartículas que cristalizan en fase maghemita (Cheng et al., 2011), fase que pudo ser diferenciada por los espectros de Espectroscopía foto electrónica de Rayos X (XPS) en donde se determinó que la fase cristalina de las Nps-NH era magnetita y Nps-Et maghemita. Finalmente, en el proceso de inmovilización de péptido, se requería de una mayor cantidad de péptido inmovilizado mantenido en el tiempo, lo que no sucedió con las nanopartículas Nps-Et ya que a medida que se hicieron los dos lavados, la absorbancia aumentó en vez de disminuir, demostrando que menor cantidad de péptido permanecía enlazado con las moléculas de quitosano de la superficie de la nanopartícula.

#### **4.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana del bioconjugado contra cepa *E. coli* O157:H7.**

Previo a la evaluación de la actividad antimicrobiana del bioconjugado contra la cepa *E. coli* O157:H7 se determinó la concentración mínima inhibitoria del péptido Ib-M2, mostrado en la

Figura 18, mediante el método de macrodilución (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2000)

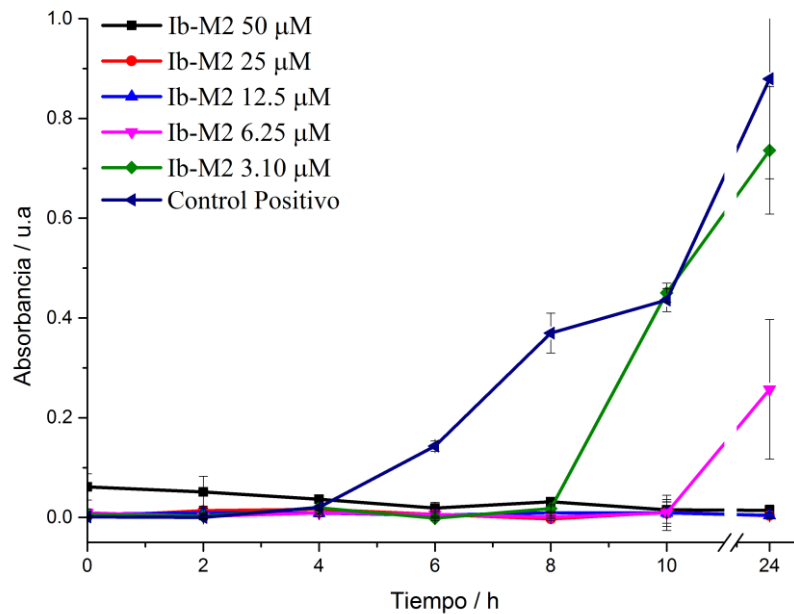


Figura 18. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) evaluada a 625 nm cada dos horas. Los resultados son expresados en término del promedio aritmético  $\pm$  desviación estándar. Control: Medio + *E. coli*.

En la Figura 18, se observa una inhibición del crecimiento de *E. coli* O157:H7 durante las 24 horas para el péptido a una concentración de 50, 25 y 12,5  $\mu$ M, línea negra, roja y azul respectivamente. En el caso de la concentración de 6,25  $\mu$ M (línea fucsia), hay una inhibición en el crecimiento de la bacteria hasta las 10 horas, pero después de ello, se evidencia un aumento en el crecimiento aunque no el cual no alcanza los valores del control positivo.

La actividad del péptido Ib-M2, está asociado a su carácter catiónico. En su estructura EWGRRMMGWRPGRMMRWWR-NH<sub>2</sub> la arginina (R) está presente en un 35%. Este residuo cuenta con un grupo lateral está cargado positivamente contribuyendo a que la carga del péptido sea positiva en su mayoría. El residuo que aporta una carga negativa es el glutamato (E) correspondiente al grupo carboxilo que se encuentra en su cadena lateral. No obstante, la carga negativa es neutralizada por la carga positiva que es mayor debido a la arginina. De acuerdo con Flórez-Castillo *et al* (2014), la carga neta del péptido Ib-M2 es +6. Por su carácter

catiónico, el péptido antimicrobiano puede interactuar con la pared celular aniónica del microorganismo (Télez & Castaño, 2010), en este caso de la bacteria Gram-negativa *E. coli*, insertándose en las membranas fosfolípicas así como la pared celular generando una inhibición en el crecimiento de la bacteria. El porcentaje de inhibición del crecimiento de la bacteria en presencia del péptido Ib-M2 a 6,25  $\mu\text{M}$  después de 24 horas fue de aproximadamente el 71%.

La evaluación de la actividad antimicrobiana del bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi-NH se hizo teniendo en cuenta la concentración mínima inhibitoria (MIC) que se obtuvo en el estudio de la inhibición a diferentes concentraciones de péptido antimicrobiano del crecimiento de *E. coli*. Al observar que a concentraciones por debajo de 6,25  $\mu\text{M}$  no hay inhibición, se tomó la decisión de evaluar la actividad del bioconjugado con una concentración de péptido Ib-M2 de 6,25 y 3,10  $\mu\text{M}$ . Lo anterior con el fin de evaluar si el péptido, a pesar de estar conjugado con la nanopartícula recubierta, tendría menor, igual o mayor actividad.

En la Figura 19 se presentan los resultados de la cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 se evaluaron las nanopartículas solas, recubiertas con quitosano y el bioconjugado a diferentes concentraciones: 120,67; 60,34  $\mu\text{M}$  de Nps en todos los casos; 6,25 y 3,10  $\mu\text{M}$  de péptido en el bioconjugado.

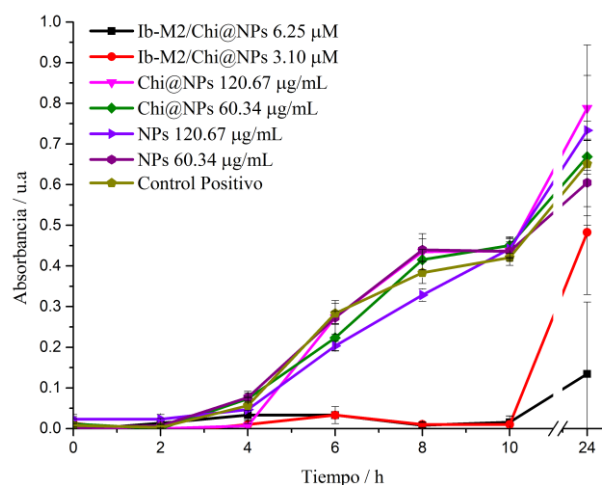


Figura 19. Cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en presencia de bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi, nanopartículas recubiertas NPs@Chi y nanopartículas solas NPs a diferentes concentraciones. Los

resultados son expresados en término del promedio aritmético  $\pm$  desviación estándar. Control: Medio + *E. coli*

La Figura 19 muestra que a partir de las 10 horas, el microorganismo crece hasta las 24 horas, en ambas concentraciones de péptido inmovilizado en el bioconjugado: 6,25 y 3,10  $\mu$ M. El crecimiento bacteriano en presencia del bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi a 6,25  $\mu$ M es menor respecto al crecimiento que se presentó en la MIC del péptido Ib-M2 a la misma concentración, obteniéndose una inhibición del 80% del crecimiento microbiano. Por esta razón, es posible decir que la actividad del péptido Ib-M2 aumentó ligeramente al estar conjugado con las nanopartículas recubiertas.

En cuanto a la actividad del bioconjugado con una concentración de péptido de 3,10  $\mu$ M, se observó una inhibición del crecimiento bacteriano de aproximadamente el 26% a las 24 horas de tratamiento.

No se observa un efecto sinérgico por parte de las Nps libres o las Nps recubiertas con quitosano, a pesar de la actividad antimicrobiana reportada por este polímero (Subhi, 2018). Según lo reportado por Subhi (2018) esto depende de la concentración de Nps utilizada, la cual en este trabajo fue mucho menor que la reportada (Gabrielyan, Hovhannisyanyan, Gevorgyan, Ananyan, & Trchounian, 2019; Subhi, 2018) No obstante, la actividad de las nanopartículas depende de su concentración y del pH. En este caso la concentración de NPs es muy pequeña respecto a la reportado en la literatura como inhibidora del crecimiento de otras cepas de *E. coli* (Auffan *et al.*, 2008b).

#### **4.6. Prueba de estabilidad del bioconjugado**

En la Figura 20 se muestra la gráfica correspondiente a la cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en presencia de péptido libre Ib-M2 6,25  $\mu$ M y bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi 6,25

$\mu\text{M}$  después de siete días de almacenamiento a temperatura ambiente y  $-20^{\circ}\text{C}$ , para evaluación de su estabilidad en el tiempo.

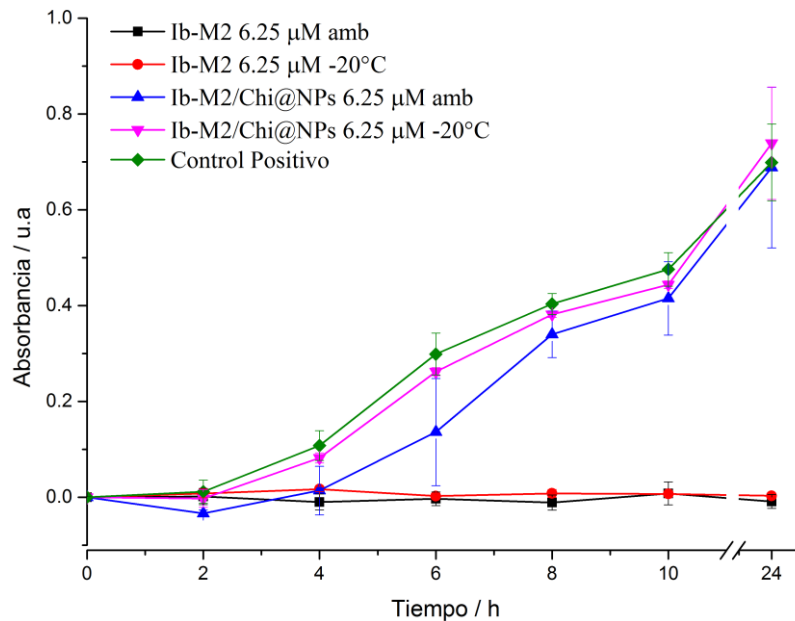


Figura 20. Cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en presencia de péptido Ib-M2 a diferentes concentraciones. Los resultados son expresados en término del promedio aritmético  $\pm$  desviación estándar. Control: Medio + *E. coli*.

Después de una semana, el péptido a la concentración mínima inhibitoria de  $6.25 \mu\text{M}$ , almacenado tanto a  $-20^{\circ}\text{C}$  como a temperatura ambiente conserva su actividad (Fig. 14). Caso contrario se dio cuando con los bioconjugados guardados a  $-20^{\circ}\text{C}$  y a temperatura ambiente, donde se observa una disminución de la actividad antibacteriana obteniéndose un crecimiento de la bacteria muy cercano a la línea de control positivo, comportamiento similar a las NPs y NPs@Chi en la actividad antimicrobiana. Se ha establecido que la actividad de los péptidos antimicrobianos catiónicos se caracteriza por la aplicación de un mecanismo de acción tomando ventaja de la carga negativa de la superficie de un microorganismo como *E. coli* a través de diversos métodos (Brogden, 2005). En ese sentido, se esperaría que el péptido Ib-M2 actúe de la misma forma en presencia de un microorganismo debido a su carácter catiónico (Flórez-Castillo et al., 2014). En este caso, el bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi no tuvo la misma actividad después de haber estado almacenado probablemente porque no se garantizó que el

pH fuera lo suficientemente ácido para aumentar su carácter catiónico (Costa, Carvalho, Montelaro, Gomes, & Martins, 2011). Además, las interacciones entre nanopartículas y las moléculas que lo rodean se debilitan por su exposición a temperaturas entre 20-30 °C (Reddy & Lee, 2013).

**4.6.1. Espectrometría de masas MALDI TOF.** Los espectros de masas MALDI-TOF se tomaron con el fin de conocer la estabilidad del péptido mediante su identificación de acuerdo a su masa calculada en una matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (ACC). En la Figura 21 se encuentran los espectros de Masas del péptido libre Ib-M2 almacenado a temperatura ambiente o a -20°C durante 1, 7 y 15 días. Las Figuras 21a, 21b, 21c, corresponden al espectro del péptido Ib-M2 6.25  $\mu$ M: 1.1, 1.2, 1.3 almacenados a temperatura ambiente durante 0, 7 y 15 días respectivamente. A su vez, las Figuras 21d, 21e, 21f, corresponden al espectro del péptido Ib-M2 6.25  $\mu$ M: 2.1, 2.2, 2.3 almacenados a -20°C durante 0, 7 y 15 días respectivamente.

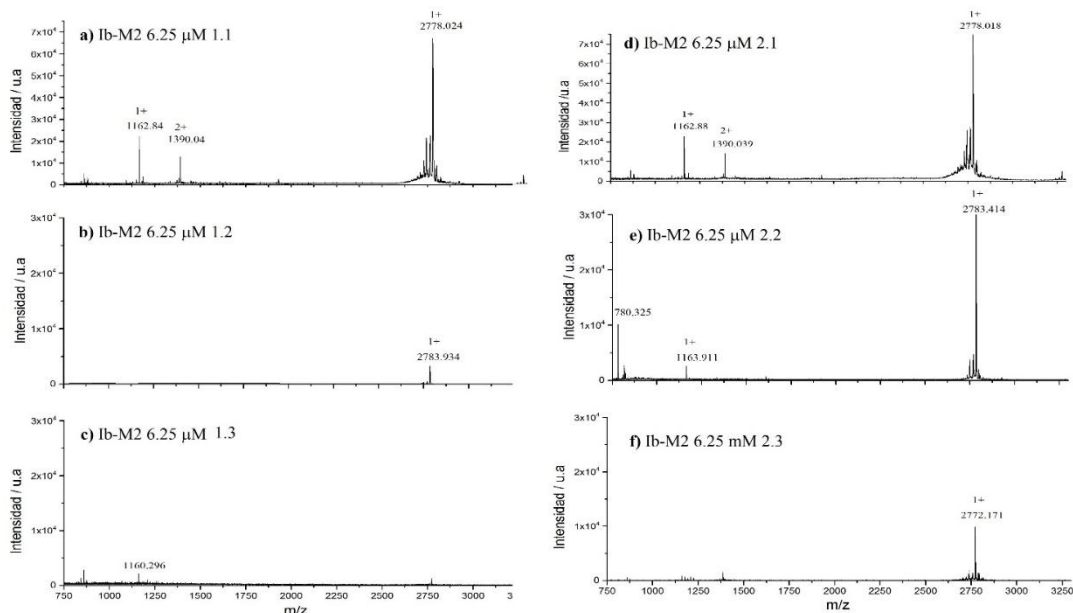


Figura 21. Espectros de Masas del péptido Ib-M2 6.25  $\mu$ M

Se observa en las Figuras 21(a-c) que el pico aparece en el mismo m/z alrededor de 2778 coincidiendo con los valores de masa del péptido reportados por Flórez et al (2014) en donde

compararon la masa calculada con los residuos del péptido respecto a lo obtenido en el espectro de masas (Flórez et al., 2014). El solvente para los dos casos fue Tris-HCl debido a que esta solución buffer permite reconstituir el péptido que provee la casa comercial Biomarck®. Un comportamiento similar en la disminución de la intensidad se evidencia en la Figura 21 (d-f) para un mismo valor de m/z. El pico que aparece en 2778 aparece en Fig. 21a y Fig. 21b, corresponde al ión molecular del péptido. Los picos adyacentes a este, en 1390 m/z permiten evidenciar una posible delección del péptido en tanto que el valor del m/z es aproximadamente la mitad del pico del ión molecular. La desaparición del pico del péptido en la Fig. 21c y la aparición del pico en 1160 hace pensar que hubo una delección del péptido mayor, por lo tanto la estructura del péptido habría cambiado. Entre la Figura 21(a-c) y 21(d-f) se puede establecer una diferencia respecto a la intensidad del pico en un mismo m/z. Esto está relacionado con la estabilidad del péptido en que, al ser una secuencia de aminoácidos, así como las proteínas, pueden sufrir de desnaturalización por la variación de la temperatura (Lehninger, Nelson, & Cox, 2000).

Adicionalmente, en la Figura 22 se relacionan los espectros de masa del Bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi 6,25  $\mu$ M igualmente almacenados a temperatura ambiente y  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 0, 7 y 15 días. Las Figuras 22a, 22b, 22c, corresponden al espectro del bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi 6,25  $\mu$ M: 3.1, 3.2, 3.3 almacenados a temperatura ambiente durante 0, 7 y 15 días respectivamente. A su vez, las Figuras 22d, 22e, 22f, corresponden al espectro del bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi 6,25  $\mu$ M: 4.1, 4.2, 4.3 almacenados a temperatura ambiente durante 1, 7 y 15 días respectivamente.

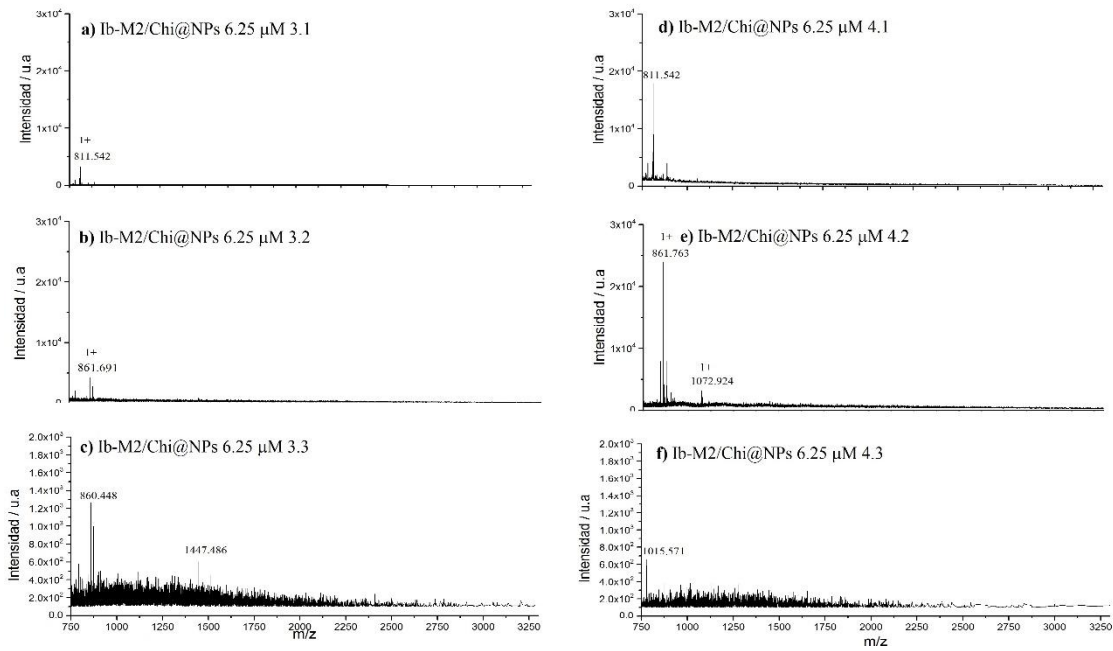


Figura 22. Espectros de Masas del bioconjugado Ib-M2/NPs@Chi 6.25  $\mu$ M

El espectro de masas del bioconjugado se tomó con el fin de determinar si había presencia del péptido en suspensión, lo que significaría que no estaba unido covalentemente con la superficie de la nanopartícula. Para esto se buscó el pico representativo del péptido libre en la región de 2778 m/z. En las Figuras 22(a-c) no se observa el pico a ese valor de m/z y tampoco hay un espectro homogéneo. Esto se debe a que el bioconjugado no fue filtrado para la toma de muestra y que, además, la masa de las nanopartículas, el quitosano y el péptido conjugadas es mayor que 2778 m/z. No obstante, se observan picos en regiones en las que se deduce que corresponden a las señales de la unión de fragmentos de aminoácidos; secuencias más pequeñas. En las Fig. 22a y Fig. 22d aparece un pico en 811 m/z, mientras que en Fig. 22 (b, c, e) el pico está en 860-861 m/z. Así mismo a partir de la Figura 22b aparece un pico en 1447 y en 1072. De lo anterior se puede establecer la pérdida de aminoácidos provenientes del péptido inmovilizado en la nanopartícula lo que podría indicar una posible degradación lo que permitiría explicar la disminución de la actividad antimicrobiana del péptido después de permanecer almacenado durante dos semanas.

## 5. Conclusiones

Se obtuvieron nanopartículas de óxido de hierro mediante el método de co-precipitación. Las Nps-NH presentaron una fase cristalina tipo magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) con un tamaño de partícula de  $13.05 \pm 1.47$  nm. Por otro lado, las Nps-Et presentaron una fase cristalina tipo maghemita y un tamaño de partícula de  $13.69 \pm 1.65$  nm.

Las nanopartículas recubiertas NPs@Chi-NH demostraron tener una mejor inmovilización del péptido Ib-M2 en comparación con las NPs@Chi-Et, lo que permitió que fueran elegidas para el proceso de Evaluación de actividad antimicrobiana contra *E.coli* O157:H7.

El péptido Ib-M2 presentó actividad contra la cepa *E.coli* O157:H7 que fue determinada por la concentración mínima inhibitoria, siendo esta  $>6,25\mu\text{M}$ .

Mediante la cinética de crecimiento de *E.coli* O157:H7 se determinó que la concentración mínima de péptido Ib-M2 inmovilizado en NPs@Chi a la cual se puede retardar el crecimiento del microorganismo respecto al control y al valor de la MIC es  $6,25 \mu\text{M}$ .

Las pruebas de estabilidad demostraron que el péptido libre Ib-M2 a una concentración de  $6,25 \mu\text{M}$  tiene mayor estabilidad que en su forma conjugada con NPs@Chi a la misma concentración, a pesar de estar en las mismas condiciones de almacenamiento, debido a la reducción en la inhibición de *E. coli* O157:H7.

## 6. Recomendaciones

Estudios posteriores podrían mejorar el proceso de preparación de nanopartículas mediante el uso del tratamiento térmico para favorecer la formación de la estructura cristalina óptima de óxido de hierro tipo magnetita con el fin de asegurar la magnetización en presencia de un campo magnético externo. Adicionalmente, se podría mejorar el porcentaje de inmovilización del péptido en las nanopartículas controlando la formación de grupos amino en la superficie haciendo seguimiento por IR y potencial Z. Finalmente, se sugiere hacer un estudio de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas a mayores concentraciones y mejorar la dispersión de las mismas en solución acuosa.

**Referencias bibliográficas**

- Abolfazl, A., Samiei, M., & Soodabeh, D. (2012). Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Research Letters*, 2550–2555. <https://doi.org/10.1109/IROS.2015.7353724>
- Aoki, W., & Ueda, M. (2013). Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics. *Pharmaceuticals*, 6, 1055–1081. <https://doi.org/doi:10.3390/ph6081055>
- Assa, F., Jafarizadeh-malmiri, H., Ajamein, H., Vaghari, H., Anarjan, N., Ahmadi, O., & Berenjian, A. (2016). *Critical Reviews in Biotechnology Chitosan magnetic nanoparticles for drug delivery systems*. 8551(June). <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1185389>
- Auffan, M., Achouak, W., Rose, J., Roncato, M.-A., Chanéac, C., Waite, D. T., ... Bottero, J.-Y. (2008a). Relation between the Redox State of Iron-Based Nanoparticles and Their Cytotoxicity toward *Escherichia coli*. *Environmental Science & Technology*, 42(17), 6730–6735. <https://doi.org/10.1021/es800086f>
- Banerjee, I., Kholam, Y. B., Balasubramanian, C., Pasricha, R., Bakare, P. P., Patil, K. R., ... Bhoraskar, S. V. (2006). Preparation of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles using DC thermal arc-plasma route, their characterization and magnetic properties. *Scripta Materialia*, 54(7), 1235–1240. <https://doi.org/10.1016/j.scriptamat.2005.12.029>
- Barkocy-Gallagher, G. A., M. Arthur, T., Siragusa, G. R., Keen, J. E., Elder, R. O., Laegreid, W. W., & Koohmaraie, M. (2001). Genotypic Analyses of *Escherichia coli* O157:H7 and O157 Nonmotile Isolates Recovered from Beef Cattle and Carcasses at Processing Plants in the Midwestern States of the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 3810–3818. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.3810-3818.2001>
- Behera, S. S., Patra, J. K., Pramanik, K., Panda, N., & Thatoi, H. (2012). *Characterization and*

*Evaluation of Antibacterial Activities of Chemically Synthesized Iron Oxide Nanoparticles*. 2012(December), 196–200.

Bishop, R. E. (2019). Lipid A. In *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes*. Springer Nature Switzerland.

Bodanszky, M. (1993). *Principles of Peptide Synthesis* (2nd ed.). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-78056-1>

Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Brogden, K. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>

Cao, G. (2004). *NANOSTRUCTURES & NANOMATERIALS. Synthesis, Properties G;Z: Applications*. Imperial College Press.

Cao, Q., Han, X., & Li, L. (2011). Enhancement of the efficiency of magnetic targeting for drug delivery: Development and evaluation of magnet system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 323(15), 1919–1924. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2010.11.058>

Chen, J. P., Yang, P. C., Ma, Y. H., & Wu, T. (2011). Characterization of chitosan magnetic nanoparticles for in situ delivery of tissue plasminogen activator. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.052>

Cheng, J. P., Ma, R., Chen, X., Shi, D., Liu, F., & Zhang, X. B. (2011). Effect of ferric ions on the morphology and size of magnetite nanocrystals synthesized by ultrasonic irradiation. *Crystal Research and Technology*, 46(7), 723–730. <https://doi.org/10.1002/crat.201100144>

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2000). *Methods for Determining Bactericidal*

*Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline This* (Vol. 19).

Cohn, C. A., Laffers, R., Simon, S. R., Schoonen, M. A. A., Roemer, E., & O’Riordan, T.

(2006). Mineral-Induced Formation of Reactive Oxygen Species. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 64(1), 179–221. <https://doi.org/10.2138/rmg.2006.64.7>

Collection, A. T. C. (n.d.). *Escherichia coli* ( ATCC ® 43888). 7–8.

Costa, F., Carvalho, I. F., Montelaro, R. C., Gomes, P., & Martins, M. C. L. (2011). Covalent

immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomaterialia*, 7(4), 1431–1440. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.11.005>

Di Corato, R., Aloisi, A., Rella, S., Greneche, J.-M., Pugliese, G., Pellegrino, T., ... Rinaldi,

R. (2018). Maghemite Nanoparticles with Enhanced Magnetic Properties: One-Pot Preparation and Ultrastable Dextran Shell. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(24), 20271–20280. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b18411>

Elieh-Ali-Komi, D., & Hamblin, M. R. (2017). *Chitin and Chitosan: Production and*

*Application of Versatile Biomedical Nanomaterials*. 46(5), 1247–1262. <https://doi.org/10.1002/jmri.25711>. PET/MRI

Finas Dominique and Baumann, K. and H. K. and R. B. and S. L. and G. K. and S. T. and L.-

B. K. and B. T. (2012). Distribution of Superparamagnetic Nanoparticles in Lymphatic Tissue for Sentinel Lymph Node Detection in Breast Cancer by Magnetic Particle Imaging. In J. Buzug Thorsten M. and Borgert (Ed.), *Magnetic Particle Imaging* (pp. 187–191). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Fleet, M. E. (2002). The structure of magnetite. *Acta Crystallographica Section B Structural*

*Crystallography and Crystal Chemistry*, 37(4), 917–920. <https://doi.org/10.1107/s0567740881004597>

Flórez-Castillo, J. M., Perullini, M., Jobbágy, M., & De Jesús Cano Calle, H. (2014).

Enhancing antibacterial activity against *Escherichia coli* K-12 of peptide Ib-AMP4 with synthetic analogues. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 20(3), 365–369. <https://doi.org/10.1007/s10989-014-9391-2>

Foxman, B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nature Reviews Urology*, 7, 653. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2010.190>

Franco Anaya, P. A., Ramírez Medina, L. M., Orozco Ugarriza, M. E., & López Gutierrez, L. A. (2013). Determinación de *Escherichia Coli* e identificación del serotipo O157:H7 en carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena. *Revista Lasallista de Investigación*, 10(1), 91–100.

Friák, M., Schindlmayr, A., & Scheffler, M. (2007). Ab initio study of the half-metal to metal transition in strained magnetite. *New Journal of Physics*, 9. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/9/1/001>

Fujii, T., Groot, F. M. F. De, & Sawatzky, G. A. (1999). *In situ XPS analysis of various iron oxide films grown by NO<sub>2</sub>-assisted molecular-beam epitaxy*. 59(4), 3195–3202.

Gabrielyan, L., Hovhannisyan, A., Gevorgyan, V., Ananyan, M., & Trchounian, A. (2019). Antibacterial effects of iron oxide (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles: distinguishing concentration-dependent effects with different bacterial cells growth and membrane-associated mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(6), 2773–2782. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09653-x>

Ghaz-Jahanian, M. A., Abbaspour-Aghdam, F., Anarjan, N., Berenjian, A., & Jafarizadeh-Malmiri, H. (2015). Application of Chitosan-Based Nanocarriers in Tumor-Targeted Drug Delivery. *Molecular Biotechnology*, 57(3), 201–218. <https://doi.org/10.1007/s12033-014-9816-3>

Guptaa, A. K., & Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide

- nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18), 3995–4021.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.012>
- H, O., Uhlich, G. A., Reichenberger, E. R., Cottrell, B. J., & Fratamico, P. (n.d.). *Whole-Genome Sequence of Escherichia coli Serotype O157:H7 Strain B6914-ARS*. 5(44), 7–8. Retrieved from <https://doi.org/10.1128/genomeA%0A.01191-17>.
- Hale, J. D. F., & Hancock, R. E. W. (2007). Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 5(6), 951–959. <https://doi.org/10.1586/14787210.5.6.951>
- Honary, S., Ebrahimi, P., Rad, H. A., & Asgari, M. (2013). Optimization of preparation of chitosan-coated iron oxide nanoparticles for biomedical applications by chemometrics approaches. *International Nano Letters*, 3(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/2228-5326-3-48>
- Hu, Q., Li, H., Wang, L., Gu, H., & Fan, C. (n.d.). DNA Nanotechnology-Enabled Drug Delivery Systems. *Chemical Reviews*, 0(0), null. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00663>
- Hwang, S. W., Umar, A., Dar, G. N., Kim, S. H., & Badran, R. I. (2014). Synthesis and Characterization of Iron Oxide Nanoparticles for Phenyl Hydrazine Sensor Applications. *Sensor Letters*, 12(1), 97–101. <https://doi.org/10.1166/sl.2014.3224>
- Issa, B., Obaidat, I. M., Albiss, B. A., & Haik, Y. (2013). Magnetic nanoparticles: Surface effects and properties related to biomedicine applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11), 21266–21305. <https://doi.org/10.3390/ijms141121266>
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9(1), 1050–1074.

<https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>

Jolivet, J.-P., Chanéac, C., & Tronc, E. (2004). Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks. *Chem. Commun.*, (5), 477–483.

<https://doi.org/10.1039/b304532n>

Kent, S. B. H. (1988). Chemical Synthesis of Peptides and Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 57(1), 957–989. <https://doi.org/10.1201/b15106-22>

Kolen'Ko, Y. V., Bañobre-López, M., Rodríguez-Abreu, C., Carbó-Argibay, E., Sailsman, A., Piñeiro-Redondo, Y., ... Rivas, J. (2014). Large-scale synthesis of colloidal Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles exhibiting high heating efficiency in magnetic hyperthermia. *Journal of Physical Chemistry C*, 118(16), 8691–8701. <https://doi.org/10.1021/jp500816u>

Kong, K. F., Schneper, L., & Mathee, K. (2010). Beta-lactam antibiotics: From antibiosis to resistance and bacteriology. *Apmis*, 118(1), 1–36. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x>

Laurent, S., Boutry, S., & Muller, R. N. (2017). Metal Oxide Particles and Their Prospects for Applications. In *Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-101925-2.00001-2>

Laurent, Sophie, Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., & Muller, R. N. (2008). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chemical Reviews*, 108(6), 2064–2110. <https://doi.org/10.1021/cr068445e>

Lee, H., Yu, M. K., Park, S., Moon, S., Min, J. J., Jeong, Y. Y., ... Jon, S. (2007). Thermally Cross-Linked Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Application as a Dual Imaging Probe for Cancer in Vivo. *Journal of the American Chemical Society*, 129(42), 12739–12745. <https://doi.org/10.1021/ja072210i>

- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2000). Chapter 3: Amino acids, peptides and proteins. In *Fundamentals of Biochemistry*.
- Li, Y. S., Church, J. S., & Woodhead, A. L. (2012). Infrared and Raman spectroscopic studies on iron oxide magnetic nano-particles and their surface modifications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 324(8), 1543–1550.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2011.11.065>
- Lim, J. Y., Yoon, J. W., & Hovde, C. J. (2010). A brief overview of Escherichia coli O157:H7 and its plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 1–10.  
<https://doi.org/10.4014/jmb.0908.08007>
- Lin, Y.-H., Mi, F.-L., Chen, C.-T., Chang, W.-C., Peng, S.-F., Liang, H.-F., & Sung, H.-W. (2007). Preparation and Characterization of Nanoparticles Shelled with Chitosan for Oral Insulin Delivery. *Biomacromolecules*, 8(1), 146–152.  
<https://doi.org/10.1021/BM0607776>
- Lloyd-Williams, P., Albericio, F., & Giralt, E. (1997). *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins*. (1st ed.).
- Lu, W., Ling, M., Jia, M., Huang, P., Li, C., & Yan, B. (2014). Facile synthesis and characterization of polyethylenimine-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> superparamagnetic nanoparticles for cancer cell separation. *Molecular Medicine Reports*, 9(3), 1080–1084.  
<https://doi.org/10.3892/mmr.2014.1906>
- Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., Laurent, S., & Sen, T. (2011). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(1–2), 24–46.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.05.006>
- Maity, D., & Agrawal, D. C. Ñ. (2018). *Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles under Oxidizing*

*Environment and Their Stabilization in Aqueous and Non-Aqueous Media Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media.* (January 2007). <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.05.001>

Mattar S, & Vásquez E. (1998). *Escherichia coli* O157:H7 infection in Colombia. *Emerging Infectious Diseases*, 4(1), 126–127. <https://doi.org/10.3201/eid0401.980120>

Mojsoska B, Carretero G, Larsen S, Mateiu R, & Jenssen H. (2017). Peptoids successfully inhibit the growth of gram negative *E. coli* causing substantial membrane damage. *Sci. Rep*, 14(7). <https://doi.org/doi:10.1038/srep42332>

Mosquito, S., Ruiz, J., Luis Bauer, J., Ochoa, T. J., Humboldt, von, & Peruana Cayetano Heredia Lima, U. (2011). MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN *Escherichia coli* ASOCIADAS A DIARREA MOLECULAR MECHANISMS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN *Escherichia coli*-ASSOCIATED DIARRHEA Instituto de Medicina Tropical Alexander Institut d'investigacions Biomèdiques . *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 28(4), 648–656. Retrieved from <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v28n4/a13v28n4.pdf>

Mulay, S., Borade, A., Bele, A., & Khale, A. (2011). Aloe Vera- A Review. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, 3(3), 203–211. Retrieved from <https://www.eijppr.com/index.php/ejppr/article/view/143>

Murray, P., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2009). *Microbiología Médica* (Sixth). ELSEVIER.

Organización Mundial de la Salud. (2018). *Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo.* Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/es/>

Pitout, J. (2012). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* combination of virulence with

- antibiotic resistance. En *Frontiers in Microbiology*. *Frontiers in Microbiology*, 10(9), 1–4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00009>
- Pitout, J. (2017). *Escherichia Coli*. Retrieved September 12, 2017, from <http://www.antimicrobe.org/b104.asp>
- Predoi, D. (2007). *A study on Iron Oxide Nanoparticles coated with dextrin obtained by coprecipitation*. 2(1), 169–173.
- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., & Zou, X. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, 339(16), 2693–2700. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.09.007>
- Rahman, O. U., Mohapatra, S. C., & Ahmad, S. (2012). Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> inverse spinal super paramagnetic nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, 132(1), 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2011.11.032>
- Reddy, D. H. K., & Lee, S. M. (2013). Application of magnetic chitosan composites for the removal of toxic metal and dyes from aqueous solutions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 201–202, 68–93. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.10.002>
- Rédei, G. P. (2008). *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics* (3rd ed.). Springer Netherlands.
- Shagholani, H., Ghoreishi, S. M., & Mousazadeh, M. (2015). Improvement of interaction between PVA and chitosan via magnetite nanoparticles for drug delivery application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 78, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.042>
- Subhi, H. (2018). *Activity of Iron Oxide Nanoparticles-Chitosan Composite on Bacterial Biofilm Formation*. (Icpas), 7–10. <https://doi.org/10.14500/icpas2018.mim104>
- Taylor, R. H., Acland, D. P., Attenborough, S., Cammue, B. P. A., Evans, I. J., Osborn, R. W.,

- ... Broekaert, W. F. (1997). A Novel Family of Small Cysteine-rich Antimicrobial Peptides from Seed of. *272(39)*, 24480–24487.
- Téllez, G. A., & Castaño, J. C. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, *14(1)*, 55–67.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(10\)70093-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70093-X)
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*, *34(5 SUPPL.)*. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.219>
- Torchilin, V. P. (2012). Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64(SUPPL.)*, 302–315. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.031>
- United Nations Children’s Fund. (2017). Child Health: Diarrhoeal Disease; Current status and progress. Retrieved September 13, 2017, from <https://data.unicef.org/topic/child-health/diarrhoeal-disease/#>
- Vila, J., Saez López, E., Johnson, J. R., Romling, U., Dobrindt, U., Canton, R., ... Soto, S. M. (2016). Escherichia coli: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/doi:10.1093/femsre/fuw005>
- Wang, C. C., & Ying, J. Y. (1999). Sol-gel synthesis and hydrothermal processing of anatase and rutile titania nanocrystals. *Chemistry of Materials*, *11(11)*, 3113–3120.  
<https://doi.org/10.1021/cm990180f>
- Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H., & Car, H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*, *64(5)*, 1020–1037.  
[https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70901-5](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70901-5)
- Wulandari, I. O., Santjojo, D. J. D. H., Shobirin, R. A., & Sabarudin, A. (2017). Characteristics and magnetic properties of chitosan-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles prepared by ex-situ co-precipitation method. *Rasayan Journal of Chemistry*, *10(4)*, 1348–1358.  
<https://doi.org/10.7324/RJC.2017.1041907>

- Yamashita, T., & Hayes, P. (2008). Analysis of XPS spectra of Fe 2+ and Fe 3+ ions in oxide materials. *Applied Surface Science*, 254(8), 2441–2449. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2007.09.063>
- Yao, K., Peng, Z., & Fan, X. (2009). Preparation of nanoparticles with an environment-friendly approach. *Journal of Environmental Sciences*, 21(6), 727–730. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62331-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62331-1)
- Zhang, Y. S., Pang, B., Xia, Y., Yang, M., Sun, T., & Hyun, D. C. (2014). Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/anie.201403036>