

**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA FUNCIONALIZADAS CON
PÉPTIDOS ANÁLOGOS DE LACTOFERRAMPINA CON POTENCIAL
ANTIBIÓTICO CONTRA *Escherichia coli* O157:H7.**

JENNIFFER CRUZ LAITÓN

Química

**LABORATORIO DE QUÍMICA Y MICROBIOLOGÍA
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2012

**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA FUNCIONALIZADAS CON
PÉPTIDOS ANÁLOGOS DE LACTOFERRAMPINA CON POTENCIAL
ANTIBIÓTICO CONTRA *Escherichia coli* O157:H7**

JENNIFFER CRUZ LAITÓN

Química

Tesis presentada como requisito parcial para optar a título de:

MAGISTER EN QUÍMICA

Director

RODRIGO GONZALO TORRES SÁEZ

PhD. BIOQUÍMICA

Codirectora

CLAUDIA CRISTINA ORTIZ LÓPEZ

PhD. MICROBIOLOGÍA

LABORATORIO DE QUIMICA Y MICROBIOLOGIA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2012

DEDICATORIA

Al Señor Jesucristo por guiar mis pasos y por sus bendiciones

A mi hijo Samuel David, el motor de mi vida

A mi familia por estar siempre

A mis verdaderos amigos que me acompañaron en tiempo de angustia

A mi ángel guardián.

A los que estuvieron y ya no están.

Jennifer Cruz Laitón

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rodrigo Torres por su apoyo incondicional no sólo en el desarrollo de esta tesis, sino por sus consejos a tiempo en todos los aspectos en mi vida.

A la Dra. Claudia Cristina Ortíz López por su confianza, paciencia, guía y gran motivación en la realización de este trabajo de investigación.

A la Dra. Fanny Guzmán Quimbayo por su contribución, confianza y apoyo científico en la realización de la síntesis de péptidos. Gracias también por su amistad.

Al MSc. Luis Oveimar Barbosa por sus enseñanzas, consejos y amistad.

A mi hijo Samuel David por la sonrisa tan alentadora que me regala cada día. A mis padres y hermanas por su apoyo, paciencia y amor en todas las etapas de felicidad y tristeza en mi vida.

A los que no sólo fueron mis compañeros de laboratorio, sino que también me permitieron ser su amiga: Magaly, Yenny Bueno y Johan.

A mis amigos Jorge Ardila, Yury Andrea Martínez, César Bernal, Luis Carlos Ramírez y Luz Karime Luna, los llevo en mi corazón.

A los profesores del postgrado y calificadores que una u otra forma aportaron en mi formación académica y científica.

A Colciencias por su programa de “Joven investigador e innovador” y a la Universidad Industrial de Santander.

A todas las personas que me apoyaron

GRACIAS!

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	22
1. MARCO CONCEPTUAL Y ANTECEDENTES	24
1.1 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAMs)	24
1.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PAMs	25
1.3 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LACTOFERRAMPINA (LFamp)	27
1.4 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA (SPFS)	31
1.4.1 Soporte sólido.	33
1.4.2 Reactivos de acoplamiento	34
1.4.3 Síntesis múltiple de péptidos	36
1.5 NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNPs)	37
1.5.1 Síntesis Química de AgNPs	38
1.5.2 Mecanismo de acción de las AgNPs en microorganismos	40
1.5.3 Propiedades antimicrobianas	43
1.5.4 Otras aplicaciones de las AgNPs	46
1.6 NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS CON BIOMOLÉCULAS	47
1.7 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS FUNCIONALIZADOS CON AgNPs	51
2. OBJETIVOS	54
2.1 OBJETIVO GENERAL.	54
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
3. MATERIALES Y MÉTODOS	55
3.1 MATERIALES	55
3.2 DISEÑO Y SÍNTESIS DE PÉPTIDOS	56
3.3 CARACTERIZACIÓN DE LA LFAMPB, LFAMPH Y SUS ANÁLOGOS	57
3.3.1 Cromatografía líquida	57
3.3.2 Análisis de espectrometría de masas	58
3.3.3 Dicroísmo Circular (DC)	58
3.3.4 Simulación teórica de la estructura secundaria	59

3.4	SÍNTESIS DE AgNPs	59
3.5	CARACTERIZACIÓN DE LAS AgNPs	61
3.5.1	Microscopía electrónica de transmisión (TEM).	61
3.5.2	Dispersión de luz en modo dinámico	61
3.5.3	Potencial Zeta	62
3.5.4	Espectroscopía IR	62
3.6	FUNCIONALIZACIÓN DE AGNPS-LFAMP Y SUS DERIVADOS	62
3.7	CARACTERIZACIÓN DEL BIOCONJUGADO PAM-AgNPs	64
3.8	DETERMINACIÓN DE LA CMI y CMB de LFampB, LFampH, ANÁLOGOS, AgNPs Y EL BIOCONJUGADO PAMs-AgNPs frente a <i>E. coli</i> O157:H7	64
3.9	ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE LA LFampB, LFampH Y SUS ANÁLOGOS	65
3.10	ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL BIOCONJUGADO PAMs-AgNPs	66
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
4.1	DISEÑO Y SÍNTESIS DE PÉPTIDOS	67
4.2	CARACTERIZACIÓN DE LA LFampB, LFampH Y SUS ANÁLOGOS	70
4.2.1	Cromatografía líquida	70
4.2.2	Análisis de espectrometría de masas	70
4.2.3	Dicroísmo Circular	72
4.2.4	Simulación teórica de la estructura secundaria	74
4.3	SÍNTESIS DE AgNPs	75
4.4	CARACTERIZACIÓN DE LAS AgNPs	78
4.4.1	Microscopía de transmisión electrónica	79
4.4.2	Dispersión de luz en modo dinámico	80
4.4.3	Potencial Zeta	82
4.4.4	Espectroscopía IR	83
4.5	FUNCIONALIZACIÓN DE AgNPs-LFamp Y SUS DERIVADOS	84
4.6	CARACTERIZACIÓN DEL BIOCONJUGADO PAM-AgNPs	87
4.7	DETERMINACIÓN DE LA CMI y CMB DE LFampB, LFampH, ANÁLOGOS, AgNPs Y EL BIOCONJUGADO PAMs-AgNPs FRENTE A <i>E. coli</i> O157:H7	89
4.7.1	Actividad antimicrobiana de LFampB, LFampH y sus análogos	89

4.7.2 Actividad antimicrobiana de las AgNPs	93
4.7.2.1 Efecto de la naturaleza del agente precursor en la actividad antimicrobiana	93
4.7.2.2 Efecto de la naturaleza del agente estabilizante en la actividad antimicrobiana	99
4.7.2.3 Efecto de la naturaleza de la relación agente reductor/ precursor de plata en la actividad antimicrobiana	101
4.7.3 Actividad antimicrobiana de las AgNPs-LFamp	105
4.8 ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE LA LFampB, LFampH Y SUS ANÁLOGOS	110
4.9 ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL BIOCONJUGADO PAM-AgNPs PROVENIENTE PRECURSOR AgBF ₄ .	111
5. CONCLUSIONES	113
6. RECOMENDACIONES	115
BIBLIOGRAFÍA	116
ANEXOS	147

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Principales estructuras secundarias de los PAMs	25
Figura 2. Mecanismo de acción de los PAMs de acuerdo con el modelo de estructura de barril	26
Figura 3. Acción de los PAMs de acuerdo con el modelo de capa	27
Figura 4. Diagrama Ribbon del dominio N1 de Lactoferrina bovina	28
Figura 5. Diagrama de las estructuras de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de los análogos de Lactoferrina	30
Figura 6. Microscopía de transmisión electrónica de las bacterias de <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>S. aureus</i> tratadas con los péptidos de LFcinB, LFampB y LFchimera	31
Figura 7. Metodología Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida	34
Figura 8. Síntesis Múltiple de péptidos en fase sólida por la metodología en bolsitas de té	37
Figura 9. Mecanismo de formación de las nanopartículas de plata por reducción química en usando AgNO_3 como precursor	39
Figura 10. Diferentes nanoestructuras de plata sintetizada por reducción química usando el nitrato de plata como precursor, el etilenglicol como agente reductor en presencia de PVP	41
Figura 11. Mecanismo de acción antibacteriano de la AgNPs	43
Figura 12. Microscopía de transmisión electrónica de una célula de <i>E. coli</i>	44
Figura 13. Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> en presencia de diferentes concentraciones de AgNPs	45
Figura 14. Aplicaciones multifuncionales de las NPS como portador de uno o más agentes terapéuticos	48
Figura 15. Conjugación entre una biomolécula y la superficie de la NP	48
Figura 16. Formación de AgNPs funcionalizadas con Lisozima	51

Figura 17. Metodología experimental de la síntesis múltiple en fase sólida en bolsitas de té	57
Figura 18. Procedimiento general para la obtención de las AgNPs	61
Figura 19. Metodología de funcionalización de péptidos y nanopartículas de plata	63
Figura 20. Alineamiento múltiple de secuencia: a) LFampB y b) LFampH	69
Figura 21. Espectros de masas	71
Figura 22. Espectros de DC y efecto del TFE en la estructura helicoidal	73
Figura 23. Estructura secundaria simulada	74
Figura 24. Nanopartículas de plata sintetizadas a partir de una concentración 3 mM de los precursores de Ag, usando el PVA como agente estabilizante, utilizando una relación agente reductor/precursor de 3 con diferentes precursores	76
Figura 25. Reacción de la síntesis de nanopartículas formadas usando el AgNO_3 como precursor	76
Figura 26. Espectros de absorción de las nanopartículas en solución	77
Figura 27. Microscopía electrónica de las AgNPs que exhibieron la mayor estabilidad para cada precursor	80
Figura 28. DLS de las AgNPs que exhibieron la mayor actividad para cada precursor	81
Figura 29. Potencial Z de las AgNPs que exhibieron la mayor actividad para cada precursor.	82
Figura 30. Espectro IR de las AgNPs que exhibieron la mayor actividad para cada precursor	83
Figura 31. Espectros de absorción de la suspensión y sobrenadante de los péptidos en el proceso de autoensamble con la nanopartícula de plata proveniente del precursor AgNO_3	85
Figura 32. Caracterización del bioconjugado Anál.2-AgNPs proveniente del precursor AgBF_4	87

Figura 33. Efecto antimicrobiano de los péptidos sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7	90
Figura 34. Efecto bactericida de la concentración del análogo 2 sobre <i>E. coli</i> O157:H7	93
Figura 35. Diagrama helicoidal de LFampB, LFampH y sus derivados	94
Figura 36. Efecto de la naturaleza del precursor de plata en la actividad antimicrobiana de las AgNPs sobre <i>E. coli</i> O157:H7	95
Figura 37. Efecto de la naturaleza del agente estabilizante en la actividad antimicrobiana de las AgNPs sobre <i>E. coli</i> O157:H7. AgNPs sintetizadas a partir de una concentración 1mM de AgNO ₃ a una relación de NaBH ₄ /AgNO ₃ =3	99
Figura 38. Fotografías representativas de la actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata a una concentración de 80 y 50 µg/mL, respectivamente	101
Figura 39. Concentración mínima bactericida de las AgNPs sobre <i>E. coli</i> O157:H7 para cada precursor	105
Figura 40. Concentración mínima bactericida de los bioconjugados Análogo 2-AgNPs sobre <i>E. coli</i> O157:H7 para cada precursor	110
Figura 41. Actividad Hemolítica de <i>E. coli</i> O157:H7 en presencia de péptidos antimicrobianos	111
Figura 42. Actividad hemolítica del bioconjugado Anál.2-AgNPs proveniente del precursor AgBF ₄	112

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Grupos protectores Boc y F -moc	32
Esquema 2. Estructura de las carbodiimidas y aditivos utilizados en la síntesis de péptidos en fase sólida	35
Esquema 3. Estructura de algunas sales de fosfonio (BOP y PyBOP) y sales de uronio (HBTU y TBTU) utilizadas como agente de acoplamiento	36
Esquema 4. Metodología general de la propuesta de investigación	56

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Concentración letal al 50% (CL _{50%}) de LFampB sobre bacterias Gram (+) y Gram (-)	29
Tabla 2. Resumen de algunos métodos de síntesis química de AgNPs	41
Tabla 3. CMI de AgNPs y AgSiO ₂ sobre cinco cepas diferentes	45
Tabla 4. Alineamiento múltiple de secuencias (Clustal W) de LFampB y LFampH contra diferentes proteínas	67
Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de LFampB, LFampH y sus análogos	69
Tabla 6. Masa experimental y calculada por MALDI-TOF de LFampB, LFampH y sus análogos	72
Tabla 7. Resumen de las características del tamaño y carga de las AgNPs	79
Tabla 8. Concentración del PAM funcionalizado con las AgNPs	86
Tabla 9. Actividad antimicrobiana de LFampB, LFampH y sus derivados sobre <i>E. coli</i> O157:H7	92
Tabla 10. CMI de las AgNPs sobre <i>E. coli</i> O157:H7 mediante el método de microdilución en caldo y difusión de disco para cada precursor	98
Tabla 11. Concentración mínima inhibitoria de las AgNPs sobre <i>E. coli</i> O157:H7 mediante diferentes metodologías evaluando el efecto del agente estabilizante	100
Tabla 12. Resumen de los valores de CMI y CMB obtenidos para todas las metodologías de síntesis de AgNPs frente a <i>E. coli</i> O157:H7	102
Tabla 13. Resumen de los valores de la CMI obtenidos para todas las metodologías de síntesis de AgNPs sobre <i>E. coli</i> O157: H7 por el método de difusión de disco	103
Tabla 14. Actividad antimicrobiana de los PAM funcionalizados con las AgNPs. sobre <i>E. coli</i> O157:H7	106
Tabla 15. Actividad antimicrobiana de los PAM funcionalizados con las AgNPs. sobre <i>E. coli</i> O157:H7 por difusión de disco	109

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. AMINOÁCIDOS, CÓDIGO DE TRES LETRAS, UNA LETRA Y ESTRUCTURA	148
ANEXO 2. GRUPOS PROTECTORES EMPLEADOS EN LA ESTRATEGIA Fmoc/tBu	150
ANEXO 3. SOPORTES SÓLIDOS UTILIZADOS EN LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE	151
ANEXO 4. AGENTE DE CONDENSACIÓN Y ADITIVOS EMPLEADOS EN LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA	152
ANEXO 5. CROMATOGRAMAS DE LFampB, LFampH Y SUS ANÁLOGOS.	153

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SÍMBOLOS

λ	Longitud de onda
θ	Elepticidad Molar
μ	Momento hidrofóbico

A

Aa	Aminoácido
ACC	Acido α -ciano-4-hidroxicinámico
ACN	Acetonitrilo
AgNPs	Nanopartículas de plata
ATF	Ácido Trifluoroacético

B

BHI	Infusión cerebro-corazón
Boc	<i>terc</i> -Butoxicarbonilo
BOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(dimetilamino)
fosfonio	
BZL	Benzil

C

CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
C-terminal	Carboxi-terminal

D

DC	Dicroísmo circular
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
DIPC	N,N' – Disopropilcarbodiimida
DLS	Dispersión de luz dinámica

DMAP N,N-Dimetil-4-aminopiridina

E

EDA Enfermedad diarreica aguda

F

Fmoc 9 -flurenilmetoxicarbonilo

FT-IR Infrarrojo con transformada de Fourier

H

HOBT 1-Hidroxibenzotriazol

I

IR Infrarrojo

L

LFamp Lactoferrampina

LFampB Lactoferrampina Bovina

LFampH Lactoferrampina Humana

Lf Lactoferrina

Lfb Lactoferrina bovina

Lfc Lactoferricina

Lfcb Lactoferricina bovina

Lfh Lactoferrina humana

LFchimera Lactoferrampina chimera

LPS Lipopolisacárido

M

MALDI Desorción/Ionización láser asistida

MBHA 4-metilbencilhidrilamina

N

NPs Nanopartículas

P

PAM 4-hidroximetilfenilacetamidometil

PAMs Péptidos antimicrobianos

PVA Polivinilalcohol

PVP Polivinilpirrolidona

PyBOP Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidin) fosfonio

R

Rink 4-(2',4'- dimetoxifenil-aminofenil) fenoximetilpoliestireno.

S

SDS Dodecil Sulfato de Sodio

SiNPs Nanopartículas de Silicio

SPFS Síntesis de péptidos en fase sólida

T

TBTU Hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il) dimetilaminoil)-dimetilaminometilen]-N metilmetanaminio

TEM Microscopía de transmisión electrónica

TFE 2,2,2- Trifluoroetanol

TFS Tampón Fosfato de Sodio

TiNPs Nanopartículas de Titanio

TOF Tiempo de vuelo

U

UFC Unidades formadoras de colonia

Uv-vis Ultravioleta-Visible

RESUMEN

TÍTULO: SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA FUNCIONALIZADAS CON PÉPTIDOS ANÁLOGOS DE LACTOFERRAMPINA CON POTENCIAL EFECTO ANTIBIÓTICO CONTRA *Escherichia coli* O157:H7.

AUTOR: CRUZ LAITÓN Jenniffer **

PALABRAS CLAVES: Nanopartículas de plata, péptidos antimicrobianos, *E. coli* O157:H7, Enfermedad diarreica Aguda.

DESCRIPCIÓN

En este trabajo de investigación se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas de plata funcionalizadas con 4 péptidos análogos de Lactoferrampina Bovina (LFampB) y Humana (LFampH) con potencial actividad antibiótica. Inicialmente, se estudió la estructura de la LFampB utilizando herramientas de bioinformática para determinar los residuos importantes asociados a la actividad antimicrobiana. Posteriormente, se sintetizaron nuevas secuencias peptídicas en fase sólida empleando la estrategia Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo). Los análogos sintéticos de LFampB se obtuvieron con una pureza del 95% y un perfil típico de α -Hélice, de acuerdo con los espectros de difracción circular. Además, las AgNPs fueron sintetizadas mediante el método de reducción química. Se caracterizaron de acuerdo con su tamaño y morfología por microscopía de transmisión electrónica (TEM) y dispersión de luz dinámica (DLS), obteniéndose nanopartículas esféricas con tamaños entre 18-20 nm. A su vez, Los espectros UV-VIS para los coloides de plata presentaron una banda de plasmón marcada a 400 nm. Las nanopartículas que exhibieron las actividades antimicrobianas más altas fueron funcionalizadas con los péptidos sintetizados aumentando así su potencial antibiótico contra *E. coli* O157:H7.

El bioconjugado que presentó la mayor actividad antimicrobiana sobre *E. coli* O157:H7 fue el análogo 2 de LFampB con la AgNPs derivada del precursor AgBF₄. Con este bioconjugado se alcanzó una CMI y CMB de $1 \pm 0.7\mu\text{M}$ mejorando de esta manera la actividad antimicrobiana del péptido 100 veces y la de la AgNP nueve veces.

* Tesis de Maestría

** Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director: TORRES, R. Co-directora: ORTIZ, C.

ABSTRACT

TITLE: SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES FUNCTIONALIZED LACTOFERRAMPIN PEPTIDES ANALOGUES OF POTENTIAL ANTIBIOTICS AGAINST *ESCHERICHIA COLI* O157:H7*

AUTHOR: CRUZ LAITÓN Jenniffer**

KEYWORDS: silver nanoparticles, antimicrobial peptides, *E. coli* O157:H7, Acute Diarrheal Disease.

DESCRIPTION

In this research work a total of four peptides functionalized analogues Bovine (LFampB) and Human Lactoferrampin (LFampH) with potential antibiotic. Initially, LFampB was characterized using bioinformatics tools to identify important residues associated with antimicrobial activity. Then, the new sequences were synthesized on solid phase using Fmoc strategy (9-fluorenylmethoxycarbonyl). LFampB analogues were obtained with a purity of 95% and a typical profile of α -helix, according to Circular dichroism spectra. In turn, the AgNPs were synthesized by chemical reduction method and characterized according to their size and morphology by transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS) to obtain spherical nanoparticles with sizes between 18-20 nm. UV-VIS spectra for colloidal silver plasmon band showed a marked 400 nm.

Nanoparticles exhibited higher activities were functionalized with antimicrobial peptides, thereby increasing its potential antibiotic against *E. coli* O157: H7

The bioconjugated showing the highest antimicrobial activity against *E. coli* O157:H7 was the analogous 2 from LFampB with the AgNPs derivate from the precursor AgBF₄. The values of CMI and CMB for the bioconjugated were $1 \pm 0.7\mu\text{M}$, the antimicrobial activity was thus increased 100 times and the activity from AgNPs was nine times.

* Master Thesis

** Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Research advisors: TORRES, R.. ORTIZ, C

ESPECIFICACIONES DEL PROYECTO

TRABAJOS PRESENTADOS EN PROYECTOS INTERNACIONALES

Cruz J, Ortiz C, Torres R. Síntesis, caracterización y actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata contra *E. coli* O157:H7. Congreso Mundial de Química-IUPAC 2011, Puerto Rico. (Ponencia Oral)

Cruz J, Guzmán F, Ortiz C, Torres R. Síntesis de nuevos péptidos análogos de Lactoferrampina con actividad contra *E. coli* O157:H7. Congreso Mundial de Química-IUPAC 2011, Puerto Rico. (Ponencia Oral)

ESTANCIAS INTERNACIONALES

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (PUCV), bajo la tutoría de la PhD. Fanny Guzmán Quimbayo. Laboratorio de Síntesis de péptidos e Inmunología Molecular. Noviembre de 2010. "Síntesis de péptidos en fase sólida".

Se escribió una publicación titulada "ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NOVEL PEPTIDES ANALOGUES TO LACTOFERRAMPIN AGAINST *Escherichia coli* O157:H7" enviado a la revista *Peptides*.

INTRODUCCIÓN

Debido a la gran variedad de enfermedades infecciosas causadas por diferentes tipos de bacterias patógenas, y el creciente fenómeno de resistencia a antibióticos, ha surgido durante los últimos años dentro de la comunidad científica el interés por encontrar nuevos compuestos antibacterianos que eviten el desarrollo de resistencia microbiana. En este contexto, las nanopartículas metálicas (NPs) y los péptidos antimicrobianos (PAMs), han logrado establecerse como los agentes antimicrobianos más prometedores, exhibiendo un amplio espectro de actividad antibacteriana [1-4].

Nanopartículas de distintos metales como cobre, zinc, titanio [5], oro, magnesio [6], alginato [7] y plata han mostrado actividad antibacteriana. Sin embargo, las nanopartículas de plata (AgNPs) son las más efectivas y presentan la mayor actividad antimicrobiana contra bacterias, virus y hongos. No obstante, el uso clínico de las AgNPs ha sido limitado, debido a la alta citotoxicidad [3].

Por su parte, los PAMs, constituyen un componente importante de las defensas naturales de los seres vivos contra microorganismos patógenos. Además, presentan excelente actividad antibacteriana y no poseen un mecanismo de acción definido, lo que dificulta el desarrollo de mecanismos de resistencia. Los PAMs pueden ser sintetizados, por lo que es posible desarrollar nuevas secuencias peptídicas con mejores propiedades antimicrobianas que el PAM original. Sin embargo, una gran desventaja para el uso terapéutico de los PAMs es su vulnerabilidad a ser degradados por proteasas y su baja estabilidad en medios de alta fuerza iónicas [8-10].

Existen diferentes tipos de péptidos antimicrobianos, los cuales pueden ser obtenidos de diferentes fuentes biológicas o derivados de ellos de forma sintética. La Lactoferrampina, un PAM de origen sintético, ha exhibido actividad

antimicrobiana contra hongos, bacterias y virus. Dentro de sus propiedades antibacterianas, se resalta su actividad contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Pseudomonas aeruginosa*, bacterias que contribuyen de manera significativa al elevado índice de mortalidad en el mundo a causa de enfermedades infecciosas [11,12].

Una de las estrategias que permite al mismo tiempo dar solución al problema de la baja estabilidad a proteasas de los PAMs y aumentar la biocompatibilidad de las AgNPs frente a células humanas, es la funcionalización de las AgNPs con los PAMs. Otro aspecto importante de la bioconjugación, es que generalmente la funcionalización con nanopartículas aumenta la estabilidad de las biomoléculas frente a un tratamiento térmico o de desnaturalización frente a pHs extremos u otros agentes tales como la urea [13,14].

Por todo lo anterior, este trabajo de investigación, se orientó hacia la síntesis de péptidos análogos de Lactoferrampina bovina y humana con potencial actividad antimicrobiana. Además, se estudió el efecto antibacteriano de AgNPs funcionalizadas con los péptidos sintetizados. Los péptidos y nanopartículas funcionalizadas fueron sometidos a pruebas *in vitro* de inhibición de crecimiento (CMI) y muerte bacteriana (CMB), utilizando como modelo de estudio la bacteria patógena *E.coli* O157:H7. Esta nueva generación de fármacos los constituye son candidatos promisorios a formar parte de la nueva generación de agentes antimicrobianos.

1. MARCO CONCEPTUAL Y ANTECEDENTES

1.1 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAMs)

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son moléculas efectoras del sistema inmune innato que tienen funciones contra gérmenes, y que poseen un amplio espectro de acción antibiótica (incluyendo bacterias, hongos y virus). Los PAMs juegan un papel importante, aunque poco conocido hasta el momento, en los procesos inflamatorios, liberación de citoquinas, inducción inmune y cicatrización, cumpliendo un papel importante en la patogénesis de muchas enfermedades [15-18].

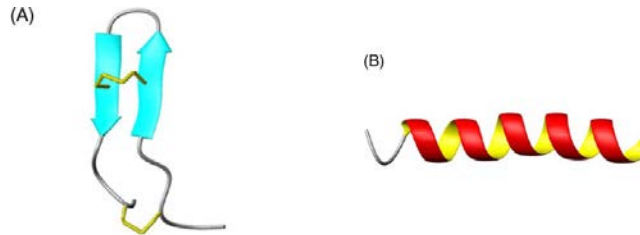
Los PAMs son relativamente pequeños en masa molecular (<10 KDa), catiónicos, anfipáticos, y de una longitud de secuencia y estructura variable [19]. A pesar de esta diversidad, los PAMs tienen algunas características comunes, tales como encontrarse generalmente cargados o presentar regiones activas anfipáticas.

Estas características comunes son utilizadas para el diseño y modificación de PAMs. Tossy y col. [20], diseñaron péptidos basados generalmente en: i) análogos de residuos aminoácidos de péptidos naturales (Ej. Congéneres) que difieren en la posición de uno o más residuos, en la longitud o contienen deleciones, e híbridos de PAMs compuestos por fragmentos de dos diferentes péptidos naturales; ii) residuos de aminoácidos que maximizan la naturaleza anfipática de los PAMs; iii) secuencias de aminoácidos de librerías combinatorias; y iv) secuencia de aminoácidos que siguen el modelo de un péptido naturalmente conocido con dominios α -helicoidales [21]

Los PAMs se han clasificado de acuerdo con la estructura tridimensional determinada mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en los siguientes grupos: a) *PAMs con estructura β -plegada*, b) *PAMs de α -hélice*, c) *PAMs ricos en*

cisteína d) PAMs ricos en aminoácidos regulares y e) PAMs compuestos de aminoácidos modificados [22]. La Figura 1, presenta la estructura de los dos primeros grupos, que son los más comunes en la naturaleza [23].

Figura 1. Principales estructuras secundarias de los PAMs



Nota. (A) β -plegada, Tachiplesina I; (B) α -hélice, Magainina 2. Los puentes disulfuro son indicados en amarillo [24-26].

1.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PAMs

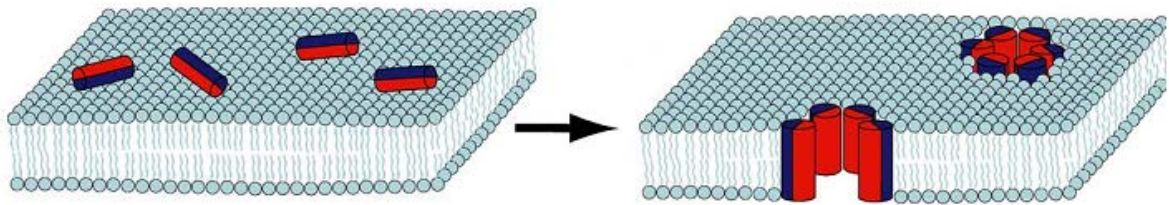
Existen diferentes estudios sobre la relación estructura-función de los PAMs [27-29]. Se ha documentado ampliamente que las propiedades biofísicas de los PAMs, tales como: estructura secundaria, carga total e hidrofobicidad, influyen en la interacción con membranas modelo y células biológicas. Teniendo en cuenta la información disponible, se han propuesto dos modelos que explican el mecanismo de acción de los PAMs:

- **Modelo de ruptura por barril.** El mecanismo de ruptura por barril describe la formación de canales/poros transmembrana generados por paquetes de α -hélice anfipáticas, de manera que las superficies hidrofóbicas interactúan con el núcleo lipídico de la membrana y las superficies hidrofílicas apuntan hacia adentro produciendo un poro acuoso. La formación de poros transmembrana implica la unión monomérica de péptidos a la membrana en forma helicoidal seguida por la inserción de las hélices dentro del núcleo hidrofóbico de la membrana formando un poro. La inserción progresiva de monómeros adicionales incrementa el tamaño de poro conduciendo a la pérdida del contenido celular, y de este modo, a la

muerte celular, tal como se describe en la Figura 2. La formación del poro depende de la reorientación de la hélice del estado paralelo al estado perpendicular a lo largo de la membrana [30].

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

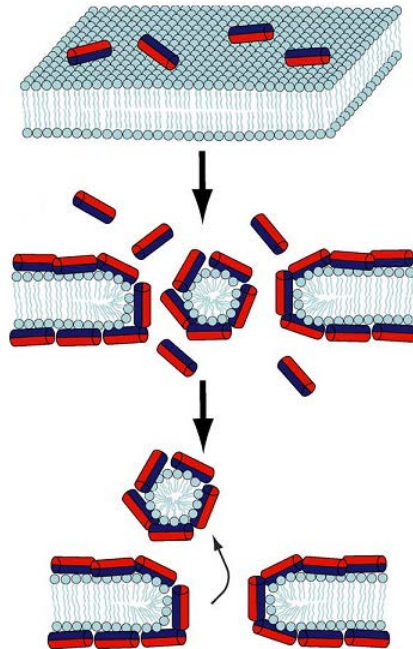
Figura 2. Mecanismo de acción de los PAMs de acuerdo con el modelo de estructura de barril.



Nota. Los péptidos atraviesan la membrana y forman un poro alineado [30].

Los siguientes son los mecanismos por etapas implicados en el modelo capa: (1) unión preferencial de los péptidos a la cabeza de los fosfolípidos, (2) alineación de monómeros de los péptidos en la superficie de la membrana de tal manera que la superficie hidrofílica se enfrenta a la cabeza de los fosfolípidos o a moléculas de agua, ocasionando la reorientación de los residuos hidrofílicos hacia el núcleo hidrofóbico de la membrana. (3) desintegración de la membrana debido a que el péptido altera la curvatura de la bicapa, tal como se describe en la Figura 3 [31].

Figura 3. Acción de los PAMs de acuerdo con el modelo de capa.



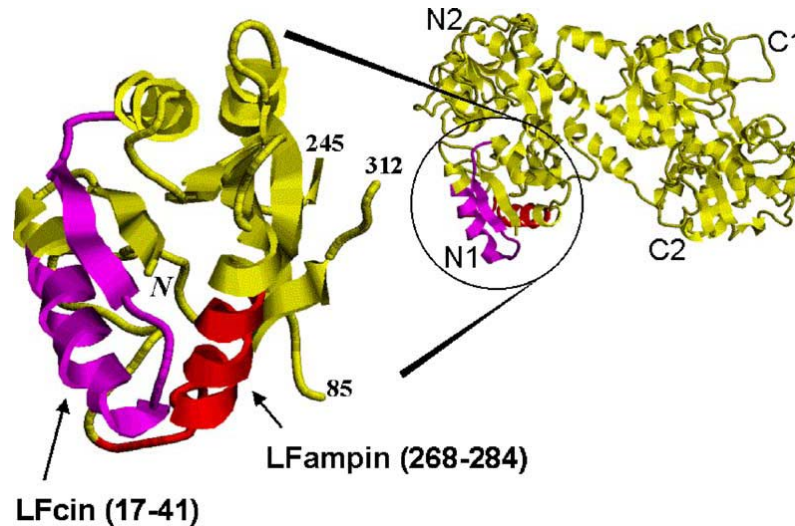
Nota. Los péptidos se alinean paralelamente a la superficie de la membrana y forman una capa [31].

1.3 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LACTOFERRAMPINA (LFamp)

La LFamp es un péptido antimicrobiano catiónico de origen sintético derivado del dominio N1 de la Lactoferrina (Lf) bovina y humana, una glicoproteína de 80 KDa, producida por las células epiteliales de las mucosas de los mamíferos. Esta glicoproteína pertenece a la familia de las proteínas transportadoras de hierro, denominadas transferrinas [32-34].

La Lactoferrampina Bovina (LFampB), es un péptido antimicrobiano catiónico formado por 17 aminoácidos, con un dominio hidrofóbico que contiene triptófano. Es de origen sintético derivado de los residuos 268-284 del dominio N-1 de Lactoferrina bovina (Lfb), tal como se observa en la Figura 4 [35,36].

Figura 4. Diagrama Ribbon del dominio N1 de Lactoferrina bovina.



Nota. La figura fue construida usando el graficador molecular RasWin Banco de Datos de Proteínas código IBLF.pdb.

La Lactoferrampina humana (LFampH) es un nuevo péptido antimicrobiano catiónico proveniente del lóbulo N-terminal de la proteína Lf humana de los residuos 269-285. La secuencia de aminoácidos, que corresponde directamente a LFampH, ha sido inactiva frente a algunos microorganismos (WNLLRQAQEKFGKDKSP).

La carga catiónica del extremo C-terminal de la LFampB y la LFampH se encuentra relacionada con la flexibilidad y actividad antimicrobiana del péptido. Por su parte el extremo N-terminal se considera que forma una α -hélice anfipática [37]. Adicionalmente, se ha encontrado que al aumentar la carga neta positiva de estos péptidos, cerca del extremo C-terminal aumenta significativamente la actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro* [38].

Van der Kraan y col. [34, 35, 36, 37, 13], han realizado investigaciones de la actividad antimicrobiana de LFampB contra un amplio rango de microorganismos. Inicialmente, LFampB fue activo contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, pero no frente a bacterias

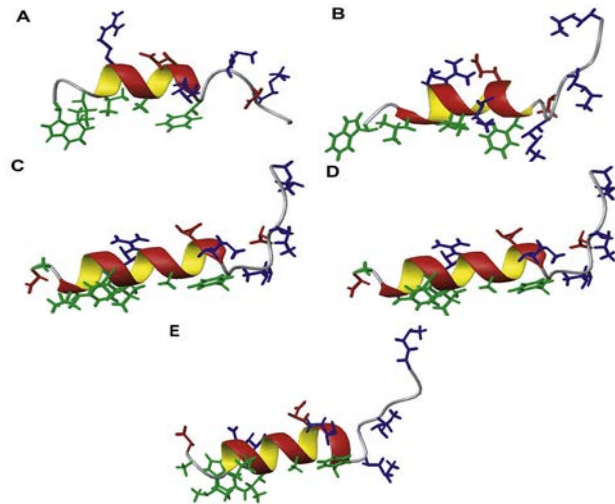
fermentativas como *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguis*. En la tabla 1 se registran los valores de las concentraciones letales al 50%.

Tabla 1. Concentración letal al 50% (CL_{50%}) de LFampB sobre bacterias Gram (+) y Gram (-).

Microorganismo	LFampB	
	μM	μg/mL
<i>C. albicans</i>	2.1	4.3
<i>B. subtilis</i>	18	36.9
<i>E.coli</i> K12	5.8	11.9
<i>E.coli</i> O157:H7	25	51.2
<i>P. aureginosa</i> Pak	7	14.3
<i>A. naeslundii</i>	>100	>200
<i>P. gingivalis</i>	>100	>200
<i>S. sanguis</i>	>100	>200
<i>S. mutans</i>	>100	>200

Posteriormente, Haney y col. [39], evaluaron la actividad de LFampH y análogos de este péptido frente a *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Streptococcus sanguis*. LFampH fue inactiva sobre estos microorganismos, pero su análogo LFampH-K –adición de un residuo de lisina en el extremo C-terminal- exhibió un incremento de actividad antifúngica. Por el contrario, la adición de una secuencia de los aminoácidos Asp-Ala-Ile en el extremo N-terminal, no tuvo ningún efecto apreciable sobre la actividad antibacteriana y antifúngica del análogo peptídico. LFampH y sus análogos fueron caracterizados por Resonancia Magnética Nuclear en micelas de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) y todas las estructuras mostraron una hélice anfipática en el extremo N-terminal, mientras que en el extremo C-terminal se obtuvo una hélice flexible catiónica como se muestra en la Figura 5.

Figura 5. Diagrama de las estructuras de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de los análogos de Lactoferrampina



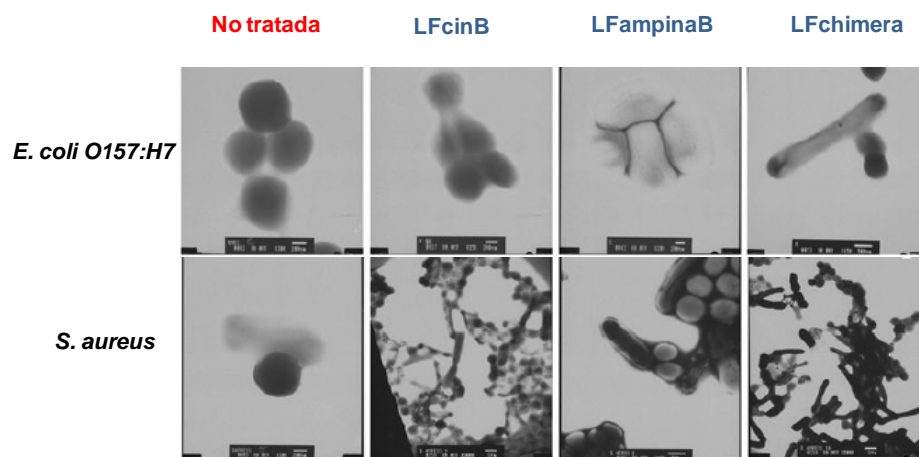
Nota. **(A)** *LFampH*, **(B)** *LFampH-K*, **(C)** *cap-LFampH*, **(D)** *cap-LFampH-K* y **(E)** *cap-LFampH-K D17N*.

Por otra parte, Flores y col.[40] evaluaron el efecto antimicrobiano de Lactoferricina (Lfc), Lactoferricina Bovina (LfcB) 17-30, LFampB y Lactoferrampina Chimera (LFchimera), frente a aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos y *Escherichia coli* O157:H7. Las bacterias fueron susceptibles a Lf, LFc17-30 y LFampinB, inhibiendo el crecimiento bacteriano entre un 85 y 90%, respectivamente. Sin embargo, LFchimera mostró la mejor inhibición del crecimiento bacteriano a una concentración de 1 μM y 10 μM , para *E. coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Por otro lado, se observó por microscopía electrónica la formación y unión de múltiples vesículas y ampollas en la membrana celular (Figura 6), lo que indica la fragmentación y la ruptura de la membrana bacteriana.

En el presente año, Adão y col. [41] sintetizaron un grupo de péptidos (LFampB 265-284, LFampB 265-280 y LFampinaB 270-284) obtenidos por la extensión y/o truncamiento en la región N- y C-terminal de LFampB, con el fin de determinar las principales características estructurales responsables de la acción antimicrobiana.

Los péptidos fueron probados contra bacterias (*E. coli* y *S. sanguinis*), hongos (*Candida albicans*), y las membranas modelo de 1,2-dimiristoil-*sn*-glicerol-3-fosfocolina (DMPC), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicerol-3-[fosfo-*rac*-(1-glicerol)](DMPG), y sus mezclas en una proporción de 3: 1 (DMPC: DMPG (3: 1)).

Figura 6. Microscopía de transmisión electrónica de las bacterias de *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* tratadas con los péptidos de LFcinB, LFampB y LFchimera [40].



La LFampB 265-284 fue el péptido más activo contra los microorganismos ensayados, mostrando mayor capacidad de formar una α -hélice y una interacción más fuerte con membranas modelo. No obstante, LFampB 270-284 fue inactiva, mostrando una estructura secundaria y sin interacción con las membranas modelos patógenas.

1.4 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA (SPFS)

La SPFS fue descrita por primera vez por Merrifield [42], y modificada posteriormente por Sheppard [43]. Hoy en día es la metodología más habitual y sencilla de obtener péptidos. Este método se basa en la unión del aminoácido carboxi-terminal (C-terminal) a un soporte insoluble y posterior elongación

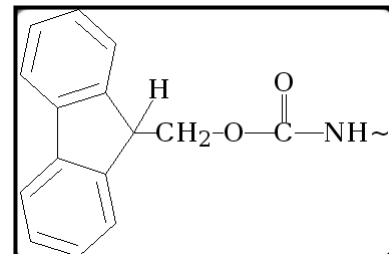
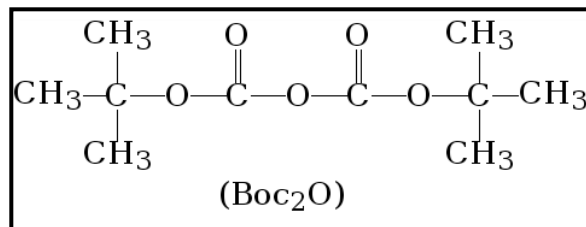
secuencial, aminoácido tras aminoácido, de la cadena peptídica. Presenta numerosas ventajas respecto a la síntesis de péptidos en solución, entre las cuales se encuentran: mayores rendimientos, lavado y filtrado sencillo de los péptidos, y posibilidad de automatización del proceso de síntesis.

El crecimiento de la cadena peptídica siempre tiene lugar por el extremo carboxilo mediante la adición sucesiva de los aminoácidos que tienen el extremo α -amino y las cadenas laterales de los aminoácidos convenientemente protegidos.

Existen dos estrategias distintas para la síntesis de péptidos en fase sólida: la estrategia *tert*-butoxicarbonil /Benzil (Boc/Bzl) [42] y la estrategia 9-fluorometoxicarbonil/*tert*-butil (Fmoc/tBu) [45]. Boc/Bzl utiliza el grupo Boc como protector de los grupos -amino y grupos Bzl como protector de las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales. Fmoc/tBu emplea el grupo Fmoc como protector temporal del grupo -amino y grupos del tipo tBu para proteger las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales (Ver Esquema 1).

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

Esquema 1. Grupos protectores Boc y F-moc.

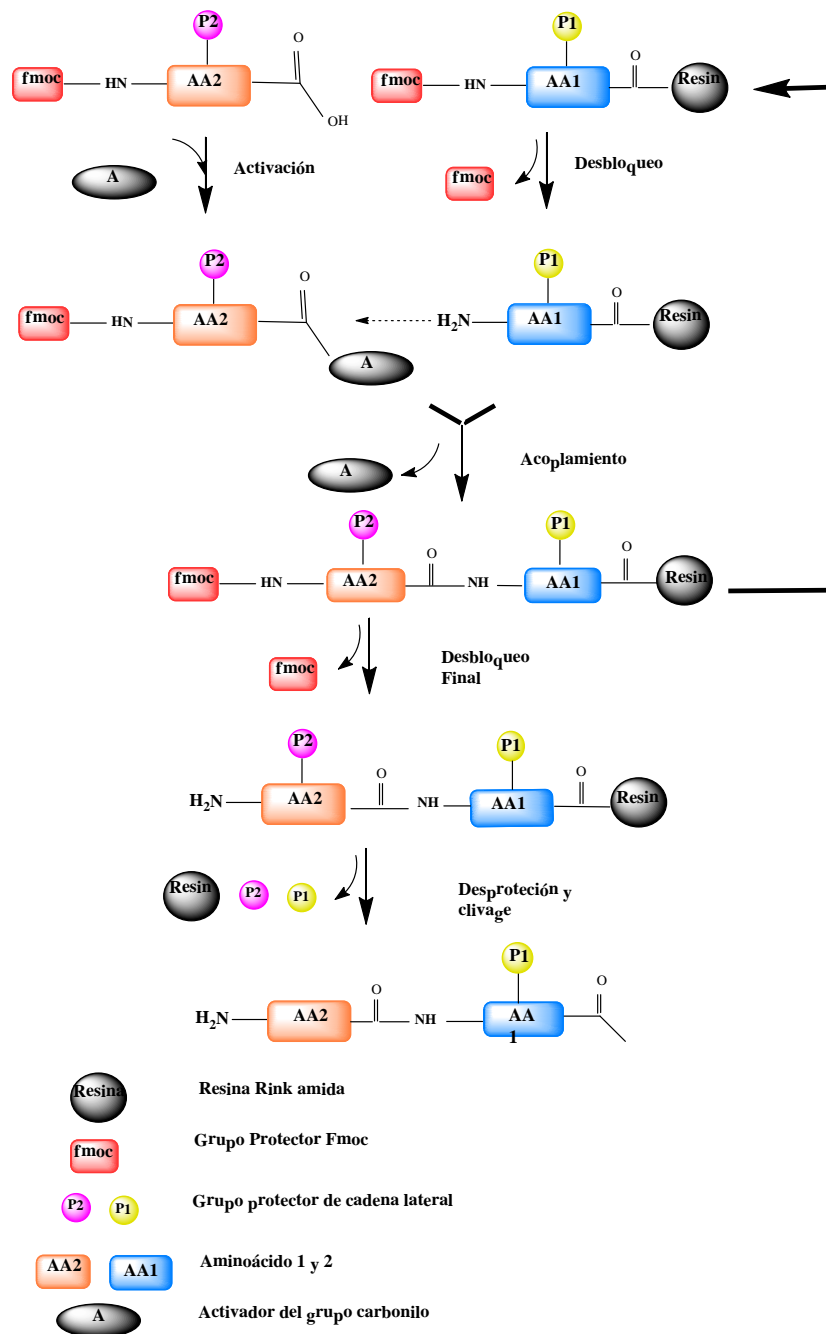


El grupo protector -amino se elimina antes de la unión del siguiente aminoácido. La eliminación del grupo protector Boc se realiza en medio ácido, mientras que la eliminación del grupo Fmoc se realiza en medio básico, habitualmente con piperidina. Una vez el grupo amino se encuentra libre, se enlaza al siguiente aminoácido previamente activado, formando el enlace peptídico. El proceso de acoplamiento requiere la activación del grupo carboxilo del aminoácido siguiente de modo que éste sea susceptible de reaccionar con el grupo amino de la cadena de péptido creciente. Este proceso de desprotección y acoplamiento se repite tantas veces como sea necesario hasta completar la secuencia del péptido deseado. Una vez sintetizada la cadena peptídica, ésta se separa del soporte polimérico y se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos, habitualmente en una única etapa (Figura 7).

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

Las resinas aumentan su volumen en contacto con los disolventes y este hecho es clave para el buen desarrollo de la síntesis. Además, deben estar convenientemente funcionalizadas para poder unir el aminoácido o el conector. Los soportes sólidos más comunes son: 4-metilbencilhidrilamina (MBHA), 4-hidroximetilfenilacetamidometil (PAM), resinas funcionalizadas con hidroximetil usadas para *t*-Boc/Bzl y 4-(2',4'- dimetoxifenil-aminofenil) fenoximetilpoliestireno (Rink) para Fmoc/*t*Bu [46,47].

Figura 7. Metodología Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida [44].

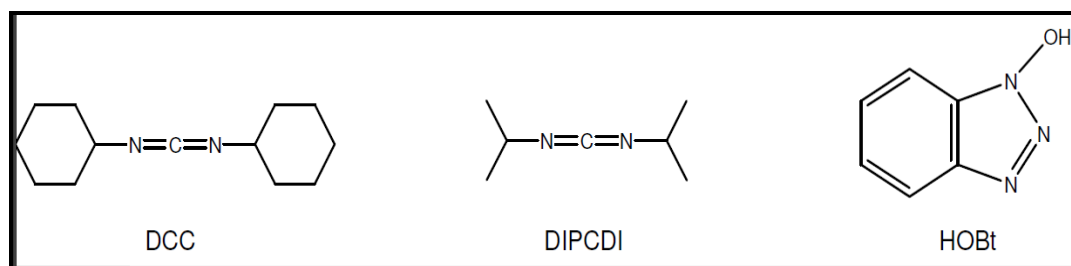


1.4.2 Reactivos de acoplamiento. Para que la formación del enlace peptídico sea eficiente y se minimicen los procesos de racemización, es necesaria una buena activación del grupo carboxilo del aminoácido a acoplar. Las carbodiimidas

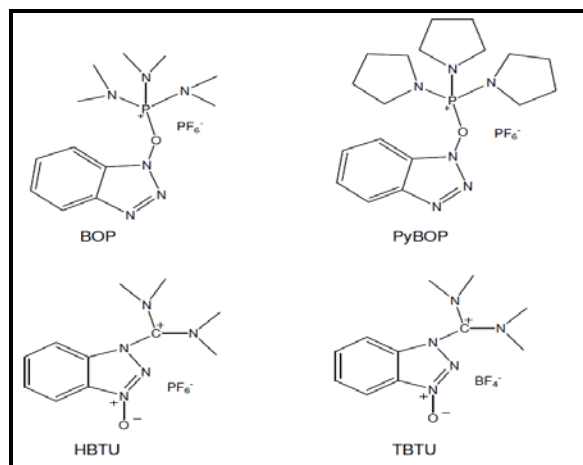
son los reactivos de acoplamiento más utilizados en la síntesis de péptidos. La N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) fue el primer reactivo descrito para el acoplamiento, siendo hasta el día de hoy la más utilizada. Además, es particularmente apropiada para trabajar en ambientes apolares como los originados por las resinas de poliestireno. Otra de las carbodiimidas más utilizadas es la N,N-diisopropilcarbodiimida (DIPC), la cual es mucho mejor que la anterior debido a su alta solubilidad. Cuando se emplean las carbodiimidas como agentes de condensación se recomienda la utilización de aditivos como el 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), que aceleran la reacción y reducen el riesgo de racemización (Esquema 2) [48].

Otros reactivos de acoplamiento son las sales de fosfonio y uranio, las cuales, en presencia de una base, pueden convertir el carboxilato del aminoácido protegido en una especie activada. Las sales de fosfonio más empleadas son el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi tris-(dimetilamino) fosfonio (BOP) y el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris-(pirrolidin) fosfonio (PyBOP) [49], derivadas del HOBT. Entre las sales de uranio, se encuentran el hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il)-dimetilaminoil]-dimetilaminometilen]-N metilmetanamino (TBTU) entre las más comunes (Esquema 3) [50].

Esquema 2. Estructura de las carbodiimidas y aditivos utilizados en la síntesis de péptidos en fase sólida.



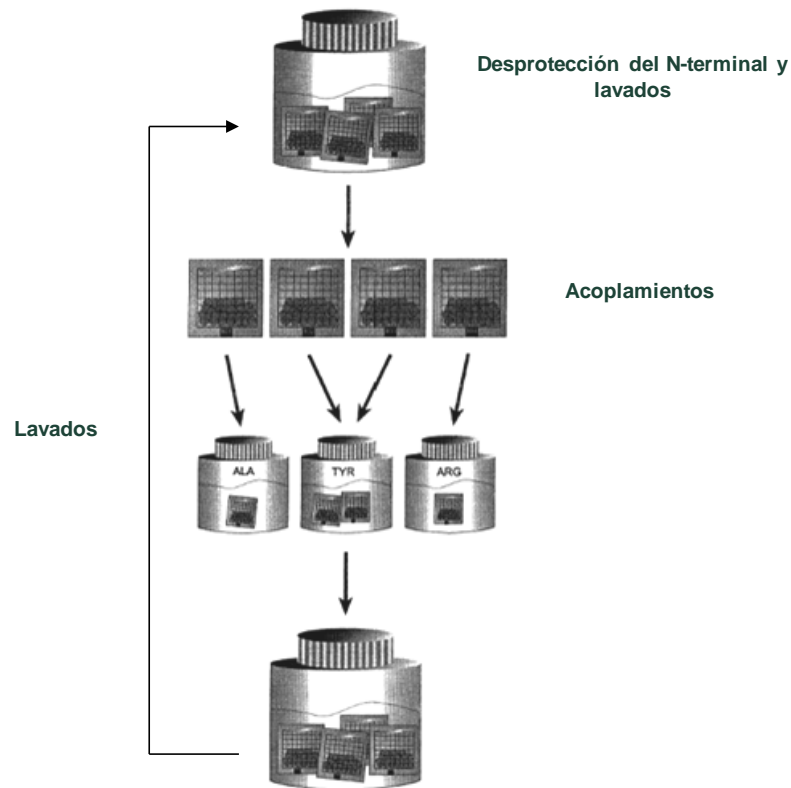
Esquema 3. Estructura de algunas sales de fosfonio (BOP y PyBOP) y sales de uronio (HBTU y TBTU) utilizadas como agente de acoplamiento.



1.4.3 Síntesis múltiple de péptidos. Entre las técnicas más empleadas para la síntesis múltiple de péptidos se encuentra la síntesis en bolsas de polipropileno la cual fue desarrollada por Richard A. Houghten [51] y se conoce popularmente como síntesis en bolsas de té. Consiste en colocar dentro de las bolsas una resina que usualmente es 4-metilbencilhidrilamina (MBHA). Cada bolsa es etiquetada para identificar el péptido que se va a sintetizar dentro de ella. Las etapas de desprotección y los lavados se realizan en un mismo recipiente con todas las bolsas juntas. Para el acoplamiento, cada bolsa se separa y adiciona el aminoácido respectivo, y así sucesivamente hasta completar la secuencia (figura 8).

Una vez que ha terminado la síntesis de la secuencia deseada, se realizan la desprotección de grupos de las cadenas laterales y el clivaje de la resina en una misma etapa con todas las bolsitas en un mismo recipiente.

Figura 8. Síntesis Múltiple de péptidos en fase sólida por la metodología en bolsitas de té. [52]



1.5 NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNPs)

Las propiedades antimicrobianas de la plata son conocidas desde hace más de 2.000 años. Se ha descrito que las antiguas civilizaciones griegas y romanas utilizaban recipientes de plata para mantener el agua potable [53,54]. Desde el siglo XIX, los compuestos a base de plata han sido ampliamente usados en diferentes aplicaciones. Por ejemplo, en 1881 Carl S.F. Crede usó gotas de Nitrato de plata (AgNO_3) para tratar una oftalmía neonatal. Más adelante su hijo, B. Crede diseñó aderezos de plata para injertos en la piel [55, 56]. En 1968, el AgNO_3 fue combinado con Sulfonamida para formar una crema de Sulfadiazina de plata (SDAg), que se usó como un agente antibacteriano de amplio espectro sobre bacterias como *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp* [57, 58].

La plata iónica presenta un limitado uso clínico ya que se une a componentes celulares como el ADN inhibiendo la transcripción y produciendo una alta toxicidad en células eucariotas. Sin embargo, durante la última década, con el surgimiento de la nanotecnología, los investigadores se han enfocado hacia la generación de nuevos compuestos con propiedades antibacterianas mejoradas [59,60]. De ahí que el uso de AgNPs ha venido ganando impulso en el presente siglo, debido a su gran área superficial con relación al volumen, y sus propiedades químicas, físicas, ópticas, catalíticas, eléctricas, mecánicas y antimicrobianas únicas, que no presentan otras nanopartículas o el metal a granel [59,61-66]

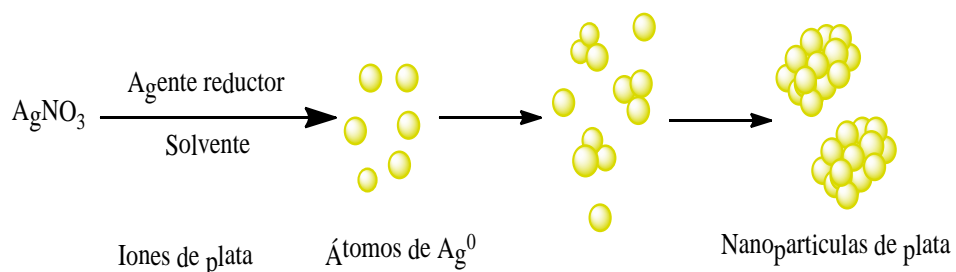
Las AgNPs tienen la mayor actividad bactericida y biocompatibilidad entre todas las nanopartículas metálicas antibacterianas conocidas [67-69]. Adicionalmente, la plata no requiere de ningún agente fotocatalítico para la acción bactericida, como sí lo exige el Óxido de Titanio (TiO_2), Óxido de Zinc (ZnO), Sulfuro de Cadmio (CdS), Sulfuro de Zinc (ZnS), entre otros. La actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata es comparable o mejor, que el amplio espectro de los antibióticos más importantes utilizados en todo el mundo [70]. Sin embargo, el uso clínico de las AgNPs ha sido limitado, debido a la alta citotoxicidad [3].

1.5.1 Síntesis Química de AgNPs. En la síntesis de AgNPs se han utilizado principalmente métodos de reducción química con y sin agentes estabilizantes [71-74], descomposición térmica y química en solventes orgánicos [75-78], ablación láser [79-81], irradiación química, irradiación gamma [82], procesos con microondas y fotorreducción en micelas [83]. El método más usado es aquel que involucra la formación de AgNPs coloidales con agentes reductores relativamente fuertes como el Borohidruro de Sodio [84-87], Hidracina [88-91] y Borohidruro de Tetrabutylamonio [92] Estos agentes pueden ser adicionados en diferentes relaciones molares respecto al compuesto que proporciona los iones Ag, modulando de esta forma sus propiedades físicas (forma y tamaño), ópticas, químicas y mecánicas.

Los primeros métodos de síntesis fueron descritos por Lee-Meisel [93] y Creighton [94]. El primero consiste en una modificación del método de Turkevich para la síntesis de nanopartículas de oro, utilizando AgNO_3 en lugar de HAuCl_4 como precursor metálico y citrato de sodio como agente reductor. En este método las nanopartículas obtenidas muestran una amplia distribución de tamaño. El método Creighton consiste en la reducción de AgNO_3 con NaBH_4 como agente reductor. Este es el método más popular y puede generar AgNPs con tamaños de 10 nm y una distribución de tamaño limitado.

La síntesis de nanopartículas en solución requiere el uso de métodos que permiten un control preciso del tamaño y la forma para producir un conjunto de nanopartículas monodispersas que presenten propiedades específicas. En general, la síntesis de nanopartículas metálicas en solución requiere de los siguientes componentes: i) un precursor metálico, ii) un agente reductor y iii) un agente estabilizante. El mecanismo de formación de las soluciones coloidales mediante la reducción de iones plata (I) se realiza en dos etapas: nucleación y crecimiento. El paso de nucleación requiere energía de activación alta, mientras que el paso de crecimiento requiere de una baja energía de activación. El tamaño y la forma de las nanopartículas dependerán de la velocidad relativa de estos procesos que pueden ser controlados mediante el ajuste de los parámetros de reacción (concentración, temperatura, pH, la capacidad de reducción, etc.)[95-97]. (Figura 9).

Figura 9. Mecanismo de formación de las nanopartículas de plata por reducción química en usando AgNO_3 como precursor [93].



Basados en los métodos anteriormente mencionados, se han descrito varios tipos de reacciones químicas que permiten la síntesis de AgNPs por reducción química a partir de una sal de plata [98-108]. En este tipo de reacciones la oxidación de las nanopartículas formadas es desfavorecida termodinámicamente debido al alto potencial de reducción de la plata, lo que permite la formación de suspensiones acuosas o alcohólicas sin la presencia de agentes estabilizantes. Además, la doble capa eléctrica formada alrededor de las nanopartículas en soluciones coloidales de baja fuerza iónica inhibe la agregación de las nanopartículas. En el caso de las soluciones coloidales de alta fuerza iónica o en fase orgánica es necesario el uso de agentes estabilizantes como monocapas autoensambladas [109-115], surfactantes [116,117], polímeros [118,119] o dendrímeros [120-122]. Estos agentes no sólo protegen las nanopartículas del medio ambiente y evitan su aglomeración, sino que también juegan un papel importante en el control de la forma y el tamaño de las nanopartículas.

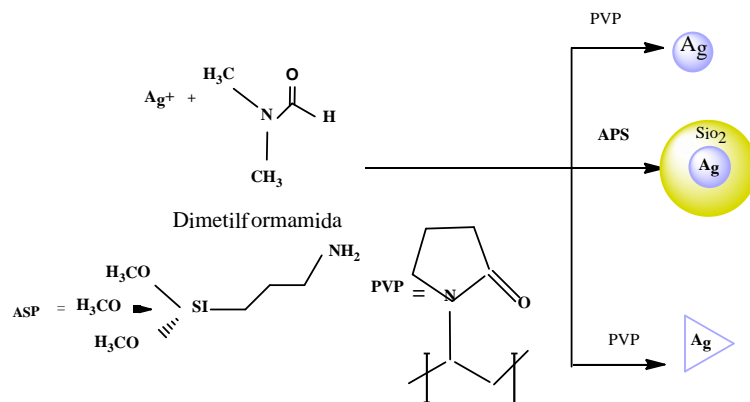
En la tabla 2 se resumen algunas de las síntesis químicas para la obtención de nanopartículas y en la figura 10 se muestran las diferentes morfologías de AgNPs que se pueden obtener a partir de un mismo tipo de síntesis.

1.5.2 Mecanismo de acción de las AgNPs en microorganismos. En investigaciones realizadas en los últimos años, la plata se ha definido como "oleodinámica" debido a su capacidad para producir un efecto bactericida a concentraciones muy bajas. Esta característica de iones Ag^+ se debe a su gran reactividad frente a proteínas, enzimas, ADN, ARN, etc, debido a las interacciones con grupos funcionales, tales como tioles, fosfatos, carboxilatos, imidazol, hidroxilo, indol o aminas que pueden interferir en procesos microbianos. Según la literatura, se ha determinado que la membrana bacteriana constituye el principal objetivo de la actividad antibacteriana de las AgNPs. Sin embargo aún no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de las AgNPs.

Tabla 2. Resumen de algunos métodos de síntesis química de AgNPs.

Precursor	Agente reductor	Agente estabilizante	Referencia
AgNO ₃	Citrato		[92]
AgNO ₃	NaBH ₄		[93]
AgNO ₃	Ácido ascórbico		[94]
AgNO ₃	Poliol	PVP	[95]
AgNO ₃	β-D-Glucosa	Starch	[96]
[Ag(NH ₃) ₂]	Sacáridos		[97]
AgNO ₃	DMF	APS	[98]
AgNO ₃	DMF	PVP	[99]
Ag(COOH)	Termólisis		[100]
Ag(COOCH ₃)	Acetaldehído	HDA	[101]
Ag(COOCH ₃)	Oleilamina	OLA	[102]
[Ag(Me ₃) ₄]	Termólisis	HDA	[103]
AgNO ₃	Ácido ascórbico	CTAB	[104]
AgNO ₃	N ₂ H ₄ ·H ₂ O	AOT	[105]
AgNO ₃	Radiación UV	PVP	[106]
AgNO ₃	Radiación UV	PEG	[107]
[Ag(C ₆ F ₅)]		HDA	[108]

Figura 10. Diferentes nanoestructuras de plata sintetizada por reducción química usando el nitrato de plata como precursor, el etilenglicol como agente reductor en presencia de PVP [93].



Las nanopartículas causan la deformación de la membrana debido a la probable producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), produciendo radicales libres. La producción de ERO es uno de los principales mecanismos de toxicidad de las nanopartículas, que puede dar lugar a estrés oxidativo, inflamación y daño

consecuente, no sólo de las membranas, sino también del ADN y las proteínas [123].

Otro modelo de interacción bacteria-AgNPs presentado por Neal y col. [124] se basa en la peroxidación mediada por el contacto con los lípidos de la membrana donde surgen las especies reactivas con oxígeno. El contacto se da por las fuerzas electrostáticas entre las nanopartículas y la carga negativa de la membrana celular.

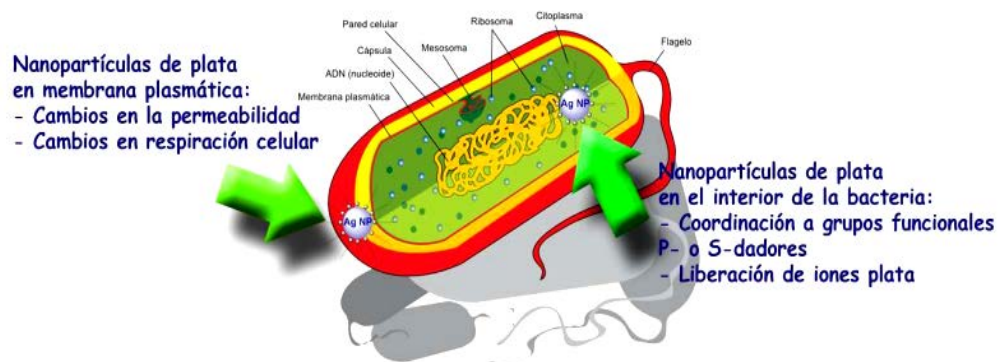
Sondi y Salopek-Sondi [125] confirmaron por Microscopía de Trasmisión Electrónica la formación de piscinas en la pared celular de la *E. coli* y la acumulación de plata en la membrana bacteriana lo cual incrementó la permeabilidad y produjo la muerte celular.

Las AgNPs también se pueden dirigir hacia la membrana bacteriana, dando lugar a una disipación de la fuerza motriz de protones, como se demuestran en estudios proteómicos y bioquímicos. Una corta exposición de *E. coli* con AgNPs da lugar a alteraciones en la expresión de varias proteína de membrana (OmpA, OmpC, OmpF, Oppa, MetQ) y proteínas de choque térmico, (IBPA, IbpB y la subunidad ribosomal 30s) [126].

Otro mecanismo de acción antimicrobiana de las AgNPs se relaciona con su absorción a la membrana logrando penetrar el interior de las bacterias. La membrana bacteriana contiene proteínas sulfuradas y las AgNPs interactúan con estas proteínas y con el fósforo que contienen las moléculas de ADN. Cuando las AgNPs ingresan a la célula bacteriana, forman una región de bajo peso molecular en el centro de la bacteria. Las AgNPs atacan preferiblemente la cadena respiratoria y el proceso de división celular conduciendo finalmente a la muerte de las células. Además, las AgNPs liberan iones Ag^+ en la célula bacteriana, que mejoran la actividad bactericida [127,128,] (Figura 11).

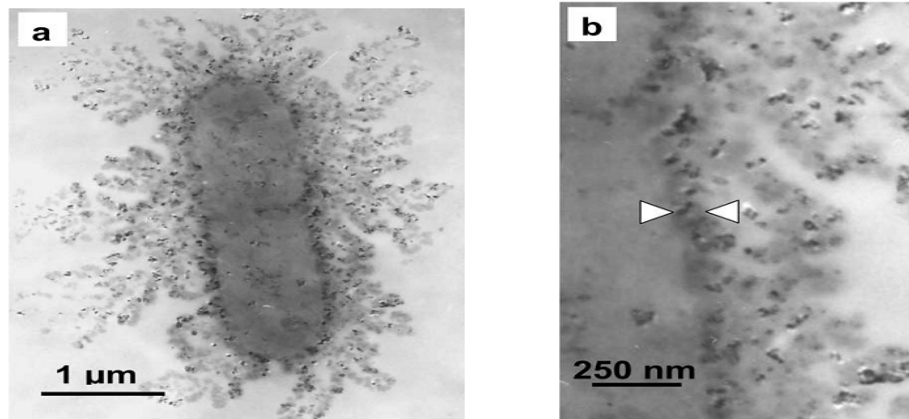
1.5.3 Propiedades antimicrobianas. Se ha demostrado la versatilidad de la actividad antimicrobiana de las AgNPs comprobada contra diferentes tipos de microorganismos [129-134]. Incluso se ha comenzado a incursionar en el último tiempo sobre la síntesis verde de AgNPs [135]. Se ha observado que este tipo de nanopartículas pueden interactuar con la membrana celular y atravesarla, ocasionando la muerte de las células bacterianas [125], tal como se observa en la figura 11. Además, su mecanismo de acción antibacteriano ha sido relacionado con su tamaño, donde las nanopartículas más pequeñas son las que poseen una actividad antibacteriana más eficiente [93, 127, 136-138].

Figura 11. Mecanismo de acción antibacteriano de la AgNPs [93].



Por otro lado, las AgNPs se han funcionalizado con quitosano, dando origen a un compuesto con alta actividad antibacteriana contra *E.coli* [139]. A su vez, la combinación de AgNPs con antibióticos ha conllevado a un aumento de la actividad de antibióticos como Penicilina G, amoxicilina, eritromicina, y otros, contra *Staphylococcus aureus* y *E. coli* [92] (Figura 12).

Figura 12. Microscopía de transmisión electrónica de una célula de *E. coli*

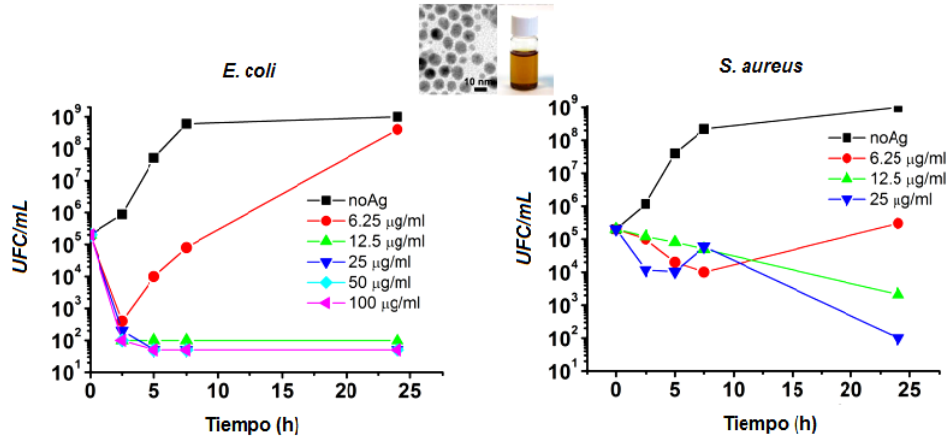


Nota. (a) Tratada con AgNPs (b) vista aumentada de la membrana de esta célula [125].

Se ha probado también la actividad antimicrobiana de las AgNPs producidas por métodos organometálicos sobre *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Listeria monocytogenes* (CECT 4032). En este estudio, las nanopartículas con tamaño menor a 10 nm tuvieron la mayor actividad bactericida. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) fue muy baja, y en un rango entre 12.5 a 25 mg/mL, respectivamente (Figura 13) [140].

Durante los últimos años, se ha llevado a cabo un gran esfuerzo por desarrollar la síntesis de nuevos compuestos con AgNPs, con propiedades antibacterianas nuevas o mejoradas. Es así como en el presente año, Rastogi y col. [141] sintetizaron híbridos de plata-dióxido de silicio (Ag-SiO_2) y AgNPs coloidales, las cuales fueron probadas sobre *Escherichia coli* (*E. coli* ATCC 25922), *E. coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* ATCC 19585 y *Bacillus cereus*.

Figura 13. Curva de crecimiento de *E. coli* y *S. aureus* en presencia de diferentes concentraciones de AgNPs [140].



Los resultados mostraron que las AgNPs de $6,6 \pm 4,5$ nm se adsorben a la superficie de nanopartículas de SiO_2 ($74 \pm 13,5$ nm) y las AgNPs de $3,5 \pm 2$ nm mostraron excelentes propiedades antibacterianas. En la tabla 3 se resumen los resultados de las CMI de las nanopartículas sobre las diferentes cepas.

Tabla 3. CMI de AgNPs y AgSiO₂ sobre cinco cepas diferentes [141].

Bacteria	NPsAg-SiO ₂ (µg/mL)	AgNPs (µg/mL)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	125	34
<i>E. coli</i> O157:H7	125	34
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	125	34
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 19585	125	42.5
<i>Bacillus cereus</i>	150	42.5

Además de la propiedad bactericida de las AgNPs, existen diversos trabajos en los que se ha estudiado su capacidad antiviral o fungicida. Por ejemplo, se ha estudiado la inhibición de la replicación del virus HIV-1 [142] o la inhibición del crecimiento de levadura en presencia de nanopartículas de plata [60]. En el caso de la actividad frente al virus HIV-1 los autores describen que el empleo de concentraciones de AgNPs entre 0.5 y 50 µM conduce a una actividad anti-

retroviral. Además, se observó un potente efecto en la inhibición de la replicación del virus con una concentración 50 μM de AgNPs.

Por otro lado, se ha descrito la capacidad fungicida de nanopartículas de plata de aproximadamente 13.4 nm de diámetro en concentraciones entre 6.6 y 33 nM frente a una levadura. La comparación de la inhibición del crecimiento de la levadura que producen estas nanopartículas con la de un control de itraconazol muestra una actividad similar a una concentración de 33 nM de nanopartículas, pero éstas siguen mostrando una actividad inhibitoria incluso a bajas concentraciones por debajo, incluso, de 13.2 nM [60].

1.5.4 Otras aplicaciones de las AgNPs. Una de las propiedades más importantes desde el punto de vista de su potencial aplicación es el empleo de nanopartículas de plata como agente cicatrizante [143]. Se ha llevado a cabo un estudio en el que se ha observado que la actividad cicatrizante de las nanopartículas de plata insertadas en los vendajes es mayor que la del compuesto sulfadiazina de plata, ampliamente usado para este objetivo. El estudio muestra que las AgNPs, además de sus propiedades antimicrobianas son capaces de controlar procesos inflamatorios mediante la inhibición de citoquinas pro-inflamatorias.

En el campo de la biomedicina se han desarrollado instrumentos y materiales que contienen o están recubiertos de nanopartículas de plata como por ejemplo: vendajes y materiales relacionados (agente cicatrizante), instrumentos quirúrgicos, catéteres o prótesis [144]. A modo de ejemplo, se han desarrollado implantes de titanio recubiertos mediante la técnica de “*co-sputtering*” con nanopartículas de plata e hidroxiapatita con el objeto de mejorar sus propiedades bactericidas. Los resultados muestran que hay una reducción significativa en la adhesión de bacterias (*S. aureus* y *S. epidermidis*) a la superficie del implante. Se ha realizado también un estudio de biocompatibilidad, en el que se muestra que este recubrimiento no es tóxico frente a los precursores de células óseas [145].

En aplicaciones cotidianas cabe destacar las aplicaciones desarrolladas en consumibles diarios como detergentes, purificadores de agua o pinturas. Se han incorporado también nanopartículas de plata en fibras textiles para manufactura de prendas de vestir o en lavadoras y frigoríficos que incorporan nanopartículas de plata en su interior [146,147].

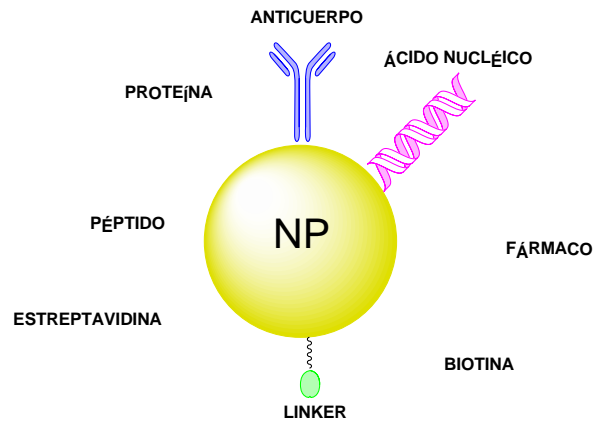
1.6 NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS CON BIOMOLÉCULAS

Recientemente, se han documentado diferentes investigaciones sobre la entrega específica de fármacos antimicrobianos dirigidos por nanopartículas biocompatibles [148-150]. La funcionalización de biomoléculas antimicrobianas enlazadas covalentemente a las nanopartículas puede abordar los problemas de estabilidad, citotoxicidad y la posibilidad de distribución selectiva así como inhibir los procesos proteostáticos. Otra conclusión importante es que la funcionalización con nanopartículas por lo general aumenta la estabilidad de la enzima a un tratamiento térmico o de desnaturalización con pH extremos u otros agentes tales como la urea [151-153].

Un número de biomoléculas, incluyendo peroxidasa, catalasa, tripsina, anticuerpos, ácidos nucleicos, fármacos, biotina, estreptavidina, biopolímeros como el colágeno [154], fragmentos de DNA y monocapas de moléculas pequeñas como los péptidos se adsorben fuertemente tanto a las nanopartículas orgánicas e inorgánicas (Fig 14). Por ejemplo, se ha llevado a cabo la funcionalización de nanopartículas con PAMs, mediante la síntesis de nanopartículas de Silicio (SiNPs) y Titanio (TiNPs) funcionalizadas con un PAM catiónico anfipático que cataliza su auto-biomineralización dentro de matrices inorgánicas. Los compuestos obtenidos se caracterizaron por retener actividad biocida, proteger al péptido de la degradación proteolítica, y facilitar una continua liberación del antibiótico en el tiempo. Estas propiedades demuestran el potencial terapéutico que pueden llegar

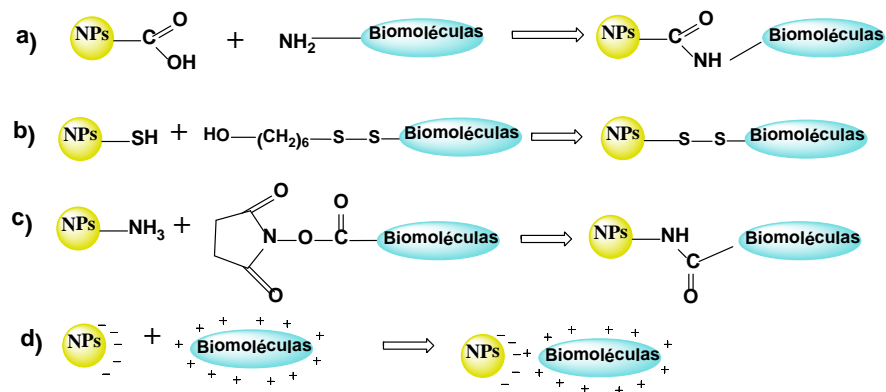
a tener compuestos producto de la funcionalización de nanopartículas con PAMs [155].

Figura 14. Aplicaciones multifuncionales de las NPS como portador de uno o más agentes terapéuticos.



Además del enlace covalente en la superficie de la NP, la biomolécula puede ser físicamente adsorbida a la superficie de la NP usando interacciones electrostáticas entre las NP y la carga de la biomolécula, o entre la NP y la proteína modificada para incorporar dominios cargados (Figura 15).

Figura 15. Conjugación entre una biomolécula y la superficie de la NP.



Nota. a,b,c) formación del enlace covalente, d) interacción electrostática.

Las nanopartículas poliméricas también han sido bioconjugadas con antibióticos. Entre estos se encuentran nanopartículas recubiertas con polímeros como

poliacrilamida, polialquilmianocrilato y polilactida-co-glicólico, portadores de antibióticos como la ampicilina, ciprofloxacina y rifampicina contra *Lactobacillus delbrueckii* [156]. En la mayoría de estos casos, el papel de las nanopartículas fue proporcionar una liberación sostenida del fármaco cargado. Sin embargo, la ejecución selectiva de los antibióticos a los macrófagos infectados se ha realizado mediante el uso de nanopartículas poliméricas y liposomas. Esta focalización fue posible debido a la mayor absorción de las nanopartículas poliméricas por el sistema retículo endotelial.

Por su parte, las AuNPs cubiertas con antibióticos han mostrado actividad contra *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* [157]. Las AuNPs coloidales expresan actividad contra *E. coli* y otras bacterias [158]. Además, se han sintetizado nanoestructuras basadas en ferrita con propiedades antibacterianas [159].

Con el fin de investigar los efectos del tamaño, se estudiaron las interacciones de las enzimas con nanopartículas esféricas de SiO₂ de diferentes tamaños, desde 4 a 100 nm. La lisozima fue utilizada como proteína modelo, cuyas dimensiones (4,5 x 3,5 x 3,5 nm) fueron comparables en tamaño a los 4 nm de la nanopartícula. En general, se observó una mayor pérdida de α -helicidad y actividad enzimática de la lisozima adsorbida sobre nanopartículas de mayor tamaño. Estos resultados indican que el tamaño de las nanopartículas influye en la estructura y función de proteínas adsorbidas. Por lo tanto, la modificación del tamaño de las nanopartículas puede incidir en la actividad de la proteína conjugada [160].

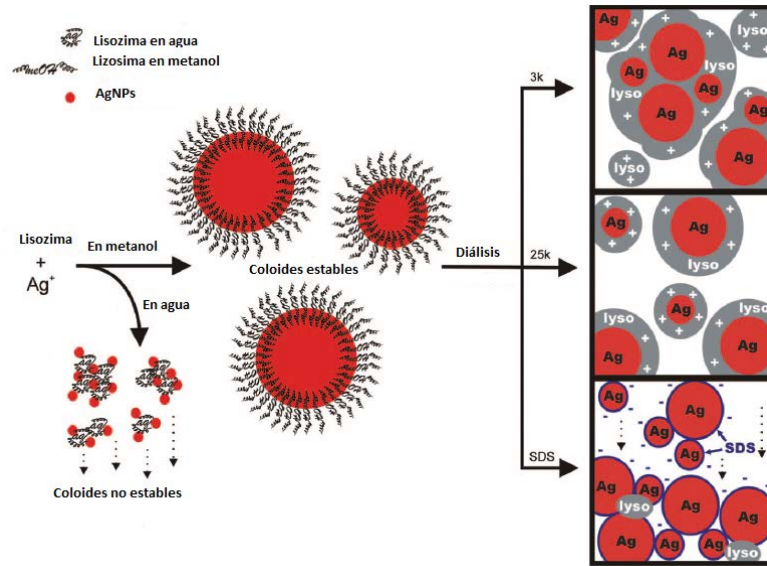
Cuando las nanopartículas son magnéticas, pueden ser manipuladas por un gradiente de campo magnético externo. Esta acción combinada con la penetrabilidad intrínseca de los campos magnéticos en los tejidos humanos, abre muchas aplicaciones relacionadas con el transporte y/o inmovilización de nanopartículas magnéticas, o de dianas biológicas marcadas magnéticamente

[161]. Por lo tanto, las nanopartículas pueden ser utilizadas para entregar fármacos anticancerígenos, o un grupo de átomos de radio nucleídos a una región específica del cuerpo, como un tumor.

Ahamed y col. [162] compararon el efecto de las AgNPs con y sin revestimiento en células madre embrionarias de ratón y fibroblastos. Los autores demostraron que las AgNPs recubiertas exhibieron un mayor grado de respuesta al daño en el ADN que las AgNPs sin recubrimiento, tal como lo demuestra el aumento en la expresión de proteínas de reparación y la fosforilación H2AX. Esto se debió a que las AgNPs recubiertas presentaron una distribución eficiente de tamaño comparada con la aglomeración de las AgNPs sin recubrir, aumentando así el número total de partículas y por lo tanto la exposición del contenido celular.

Adicionalmente, estudios realizados por Eby y col. [163] permitieron sintetizar AgNPs funcionalizadas con lisozima, teniendo en cuenta que esta enzima cataliza la formación de las nanopartículas. Los diferentes compuestos AgNP-lisozima retuvieron la actividad hidrolasa de la lisozima y fueron efectivos en inhibir el crecimiento de *E. coli*, *S. aureus*, *B. anthracis* y *C. albicans*. La funcionalización AgNPs-lisozima demostró un fuerte efecto antimicrobiano contra cepas de *P. mirabilis* resistentes a la plata y una cepa de *E. coli* recombinante que contiene un plásmido (pMG101) resistente a la plata y a múltiples antibióticos. Los resultados toxicológicos revelan que las AgNPs-lisozima no son tóxicas en las concentraciones requeridas para inhibir el crecimiento microbiano (Figura 16).

Figura 16. Formación de AgNPs funcionalizadas con Lisozima.



Recientemente, se ha estudiado la entrega específica de nanopartículas poliméricas libres o revestidas por un fármaco antimicrobiano. Nanopartículas de poliestireno manosiladas o glucosiladas han dado lugar a la aglutinación de las cepas mutantes de *E. coli* que sobreexpresan receptores manosa y galactosa superficiales, respectivamente [164,165]. Estos estudios se han limitado a cepas de *E. coli* mutantes, sin embargo, los autores visualizan el desarrollo de nanopartículas recubiertas por oligosacáridos que reconocen específicamente cepas bacterianas y produce su muerte adsorbiéndose a la pared celular y provocando aglutinación.

1.7 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS FUNCIONALIZADOS CON AgNPs

Las nanopartículas de plata, así como los PAMs, pueden ser usados como potenciales agentes para combatir enfermedades infecciosas [166]. Se sabe que los PAMs permeabilizan la membrana bacteriana, y por lo tanto, podrían ayudar a las nanopartículas de plata a acceder a la diana de interés. Adicionalmente, los péptidos se han usado como herramientas eficaces para controlar la forma y el

tamaño de las AgNPs. En general, no sólo se combina un buen control de la estructura y la inducción quirál del péptido a la AgNP, sino también mejoran la estabilidad, biocompatibilidad y capacidad de dispersión de las nanopartículas. Esto hace al péptido atractivo para la protección de las nanopartículas y funcionalización en una gran variedad de nanopartículas inorgánicas [167-169].

Sin embargo, existen pocos reportes donde se han funcionalizado péptidos antimicrobianos con AgNPs. Ruden y col.[170], investigaron sus actividades combinadas y mostraron el efecto sinérgico entre los péptidos Polimixina B (PMB), Gramicidina A y S (GA y GS, respectivamente), Alameticina (Alam), PGLa y Magainina 2 (Mag2) y las AgNPs en *E. coli* (DSM 498), *A. calcoaceticus* (DSM 586), *E. helveticus* (DSM 18396), *A. bestiarum* (DSM 13956), *P. myxofaciens* (DSM 4482), *P. fluorescens* (DSM 50090), *B. subtilis* (DSM 347), *K. rhizophila* (DSM 348), y *M. luteus* (DSM 1790). Los resultados destacan que el péptido PGLa presentó una CMI de 16,1 y 0.67 µg/mL sobre *E. coli* (DSM 498) cuando el péptido se encontraba libre, funcionalizado con las AgNPs y mezclado con AgNO₃, respetivamente. Por su parte, Polimixina B actuó sinérgicamente con las AgNPs contra todas las bacterias gram-negativas, mientras que con el AgNO₃ mostró sinergia sólo contra *E. coli*, *E. helveticus* y *Proteus myxofaciens*. Además, gramicidina S muestra una sinergia con las AgNPs contra *E. helveticus*, *myxofaciens P.*, y *Pseudomonas fluorescens* y con AgNO₃ sólo contra *E. helveticus*. *Acinetobacter calcoaceticus* no fue sensible a las nanopartículas de plata incluso a la concentraciones tan altas de 1024 µg / ml. En general, las AgNPs, muestran una mayor sinergia que los iones de plata (I) en contra de la mayoría de las cepas.

En el presente año bioconjugados de AgNPs y péptidos antimicrobianos de la familia bacterenecín -considerados como antibióticos endógenos- fueron sintetizados por Golubeva y col [171]. La actividad biológica de los bioconjugados fue evaluada sobre las cepas de *Pseudomonas aureginosa* y *S. aureus* (MRSA ATCC 33591)

resistente a meticilina. Los conjugados de AgNPs con el péptido G-Bac 3.4 (27 aminoácidos) exhibieron actividad antimicrobiana demostrando que el complejo AgNPs-péptido no posee un efecto hemolítico inherente en el péptido y presentaron una concentración mínima inhibitoria de 1 µg/mL para las dos cepas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar y funcionalizar nuevos péptidos análogos en secuencia aminoacídica a la Lactoferrampina con nanopartículas de plata (AgNPs) que posean actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* O157:H7.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desarrollar estudios bioinformáticos para el diseño de péptidos análogos de lactoferrampina con actividad antimicrobiana frente *Escherichia coli* O157:H7.

Sintetizar en fase sólida péptidos análogos a la Lactoferrampina, con variación en los aminoácidos involucrados en la actividad antimicrobiana.

Evaluar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata variando el tamaño y área superficial a partir de su síntesis con diferentes aniones.

Determinar y comparar la actividad antimicrobiana de los péptidos análogos de Lactoferrampina, las AgNPs y las diferentes AgNPs funcionalizadas con los péptidos sintetizados contra *E. coli* O157:H7.

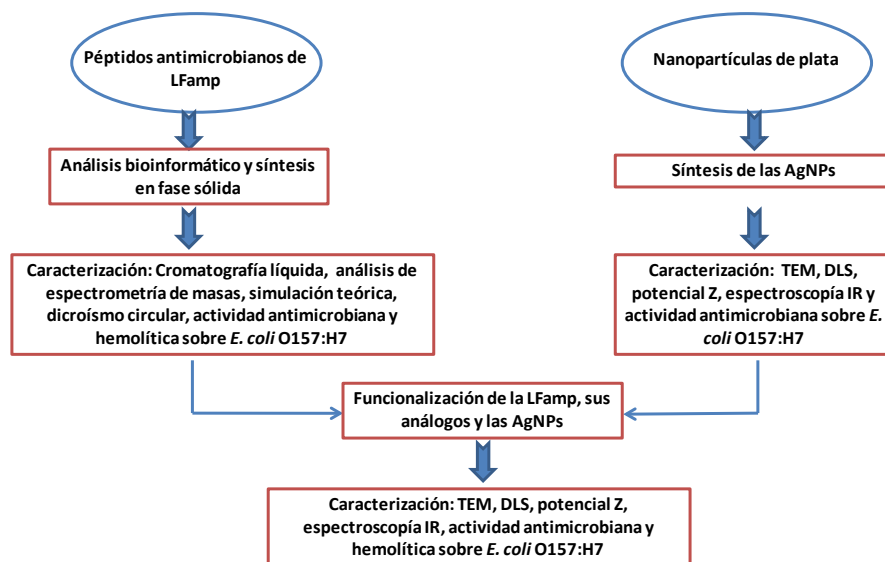
3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

Los Fmoc-L-aminoácidos fueron adquiridos de IRIS Biotech GmbH, la resina Rink amida 4MBHA fue obtenida de Merck Novabiochem, el caldo y agar Luria Bertani fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Todos los demás reactivos, disolventes de síntesis de péptidos, y acetonitrilo fueron grado HPLC. *E. coli* O157:H7 fue donada por el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. El Nitrato de plata (AgNO_3 , >99,8%), Borohidruro de sodio (NaBH_4 , 98%), Polivinilpirrolidona (PVP, PM 10,000), Bromuro de potasio (KBr) y polivinilalcohol (PVA, PM 89,000-98,000) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. El Tetrafluoroborato de plata (AgBF_4 , >99%) y el Perclorato de plata (AgClO_4 , >99.8%) fueron obtenidos de Merck. Todos los reactivos son de grado analítico y se emplearon sin purificación posterior. Agua MilliQ con una resistividad de 18.3 M Ω fue usada la preparación de todas las soluciones. Los medios de cultivo fueron obtenidos de Oxoid. El hidróxido de sodio (NaOH, 99%) fue adquirido por Merck.

Inicialmente se sintetizaron y caracterizaron los PAMs (LFampB, LFampH y sus análogos). Posteriormente, se sintetizaron y caracterizaron las AgNPs. Las AgNPs que exhibieron el mayor potencial antimicrobiano fueron funcionalizadas con los péptidos de LFampB, LFampH y sus análogos. Finalmente, se determinó la actividad antimicrobiana de la LFampB, LFampH, sus análogos, las AgNPs y el bioconjugado PAM-AgNPs frente a *E. coli* O157:H7. En el esquema 4 se muestra la metodología general.

Esquema 4. Metodología general de la propuesta de investigación.



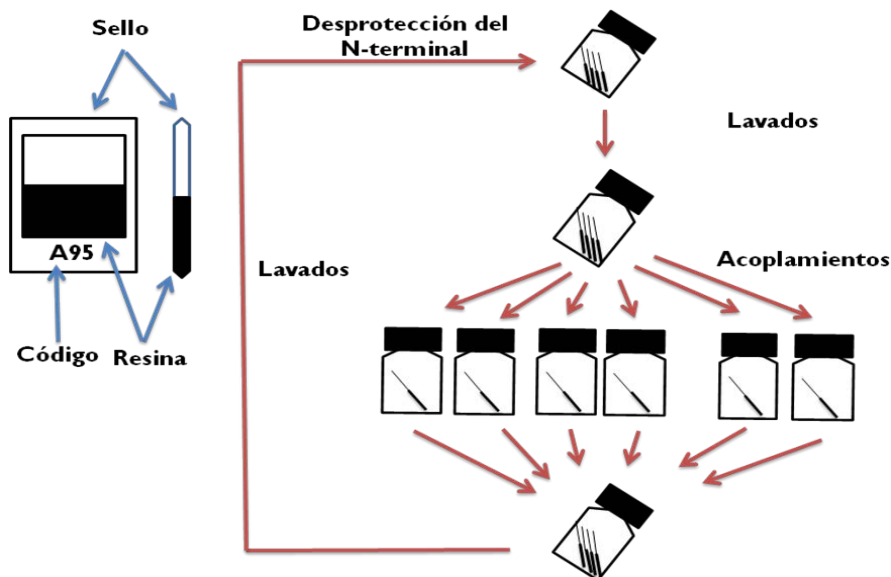
3.2 DISEÑO Y SÍNTESIS DE PÉPTIDOS.

Las secuencias de aminoácidos de LFampina fueron alineadas contra diferentes proteínas homólogas, incluyendo proteínas de la familia de Lactoferrina, todas reportadas en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>). Las secuencias fueron alineadas usando la herramienta BLASTP y el método de alineamiento múltiple de secuencia Clustal W [172].

Los péptidos se obtuvieron mediante síntesis química en fase sólida, empleando la estrategia Fmoc en bolsas de polipropileno [173,174] soportados en una resina Rink amida 4MBHA (capacidad: 0.63 mmol/gramo) (Figura 11). Las bolsitas fueron marcadas y selladas. Los aminoácidos fueron acoplados con DIPC y Dimetilformamida (DMF) en exceso (7 equivalentes DIPC /5 equivalentes HOBt) como reactivos de acoplamiento (Figura 18). El indicador azul de bromofenol (1% en DMF) se añadió a la solución disuelto en cada etapa de acoplamiento para el seguimiento de la reacción [175]. La desprotección del grupo Fmoc se llevó a cabo con piperidina al 20% en DMF estudiando dos

tiempos; a los 5 y 20 minutos. Los péptidos fueron clivados de la resina con Ácido trifluoroacético/agua/Trihidroxipropilsilano (TFA/H₂O/TIS) (95:2.5:2.5) por 3.5 h y se precipitaron con éter frío. Los péptidos se liofilizaron y se conservaron a -20°C.

Figura 17. Metodología experimental de la síntesis múltiple en fase sólida en bolsitas de té.



La estructura química de los grupos protectores empleados en la estrategia Fmoc/tBu, los soportes sólidos utilizados, el agente de condensación y los aditivos empleados en la síntesis se encuentran en los anexos 2, 3 y 4, respectivamente.

3.3 CARACTERIZACIÓN DE LA LFAMPB, LFAMPH Y SUS ANÁLOGOS

3.3.1 Cromatografía líquida. Los péptidos fueron purificados en una columna preparativa Vydac C-18 (250 mm x 10 mm) en fase reversa RP-HPLC equilibrada utilizando dos sistemas de solventes: (A) H₂O con 0.1% Ácido trifluoroacético (TFA) y (B) acetonitrilo (ACN) conteniendo 0.1% TFA. Se utilizó el siguiente programa de gradientes: 5-70 % B, en 30 min; volumen de inyección 10 µL; detección UV a 220 nm [176].

3.3.2 Análisis de espectrometría de masas. Los espectros de masas se registraron utilizando un espectrómetro Bruker TOF. Los ensayos se llevaron a cabo por desorción/ionización láser asistida (MALDI) usando la técnica con tiempo de vuelo (TOF). Este instrumento usa una radiación láser en N₂ a una longitud de onda de 337 nm con pulsos de 3 ns. La matriz usada en este trabajo fue ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (ACC). La matriz ACC fue preparada como una solución saturada en 1 mL 30%TFE/70% de H₂O en 0.1% de ATF. La muestra fue disuelta en ATF para obtener una concentración de 100 pmol/pL. Las muestras fueron preparadas por análisis MALDI-TOF diluyendo la solución en la matriz saturada a una concentración de 10 pmol/ μ L. A continuación, se puso una alícuota de 0.5 μ L de la mezcla muestra-matriz dentro del plato para el blanco, dejó secar y analizó [177].

3.3.3 Dicroísmo Circular (DC). El análisis por dicroísmo circular se llevó a cabo a temperatura ambiente en celdas lavadas con nitrógeno y usando un espectropolarímetro Jasco J-810. El espectro se tomó en un intervalo de longitud de onda entre 190-260 nm usando una celda rectangular de 1-mm. Cada espectro fue obtenido como un promedio de tres escáneres tomados a una velocidad de 20 nm/min con un ancho de banda espectral de 1nm. El perfil de DC de cada molécula fue obtenido de cada disolución liofilizada en: (i) tampón fosfato de sodio 50 mM (TFS), pH 7.0, o (ii) en una solución acuosa del 0-30% de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) en un volumen final de 500 μ L. Una concentración de 0.2 mM del péptido se estabilizó en una mezcla de TFE como se describe en [178]. Los resultados fueron expresados como el grado de elipticidad (θ):

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

Donde:

l = la longitud del camino óptico (cm)

c = concentración del péptido (mg/mL)

n = número de residuos de aminoácidos en la secuencia.

3.3.4 Simulación teórica de la estructura secundaria. Las secuencias de aminoácidos de LFamp fueron alineados comparados con diferentes proteínas homólogas, incluyendo la familia de la Lactoferrina, reportadas en la base de datos CBS (<http://www.cbs.dtu.dk>). Las secuencias fueron alineadas usando la herramienta cphmodels usando WebLab Viewer Pro como visualizador.

3.4 SÍNTESIS DE AgNPs

Se sintetizaron nanopartículas de plata (AgNPs) por medio de la metodología de reducción química empleando tres diferentes sales de plata: Tetrafluoroborato de plata (AgBF_4) [179], perclorato de plata (AgClO_4) [180] y nitrato de plata (AgNO_3) [181]. La síntesis se estandarizó llevando a cabo una serie de 27 ensayos por cada precursor de plata variando tres parámetros: concentración del agente precursor, relación agente reductor/precursor de Ag (1,2 y 3) ($\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$, $\text{NaBH}_4/\text{AgClO}_4$, $\text{NaBH}_4/\text{AgBF}_4$), y el uso de agentes estabilizantes (PVA y PVP). El NaBH_4 fue usado como agente reductor.

Cada solución de agente precursor (1,2 y 3mM) fue adicionada gota a gota a una solución de NaBH_4 que se encontraba en agitación en un baño de hielo guardando las relaciones molares 1,2 y 3 NaBH_4 / agente precursor. Luego, se observó un cambio de color indicando la formación de las AgNPs. Por último, se adicionaron 4 gotas del agente estabilizante según el caso, PVA o PVP al 3% p/v. Los coloides de Ag fueron estables por meses y almacenados en la oscuridad a temperatura ambiente.

En la figura 18 se describe el procedimiento general de las síntesis de éstas nanopartículas.

La formación de las AgNPs se comprobó por espectroscopía UV-Visible usando un espectrofotómetro Shimadzu 1800 con un ancho de rejilla de 1 cm realizando un barrido desde 300 nm hasta 600 nm posterior a la reacción de formación de las AgNPs. Se determinó la longitud de onda máxima característica para cada solución coloidal en una dilución 1:10 (%v/v). Se colocó la solución coloidal de AgNPs diluida en una cubeta de cuarzo y la absorbancia resultante se calculó empleando la Ley de Lamber-Beer.

Figura 17. Metodología experimental de la síntesis múltiple en fase sólida en bolsitas de té.

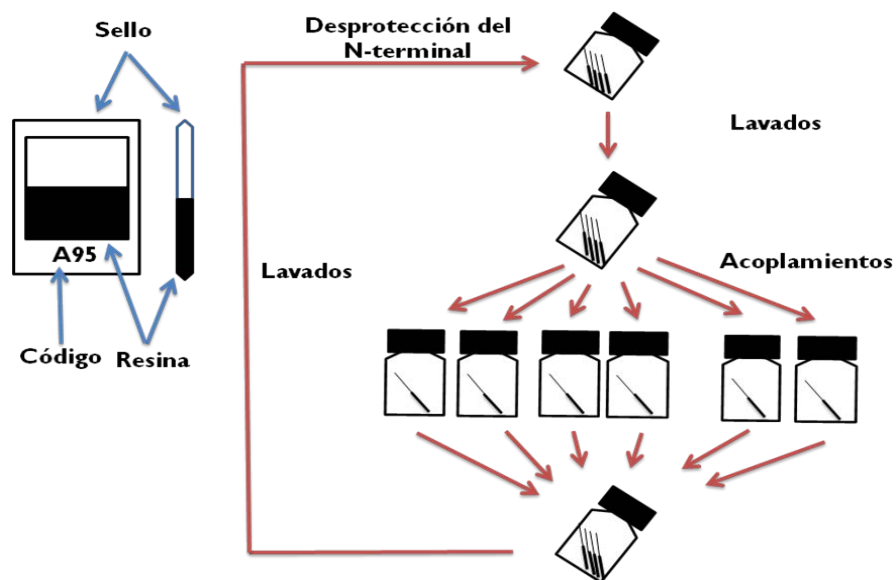
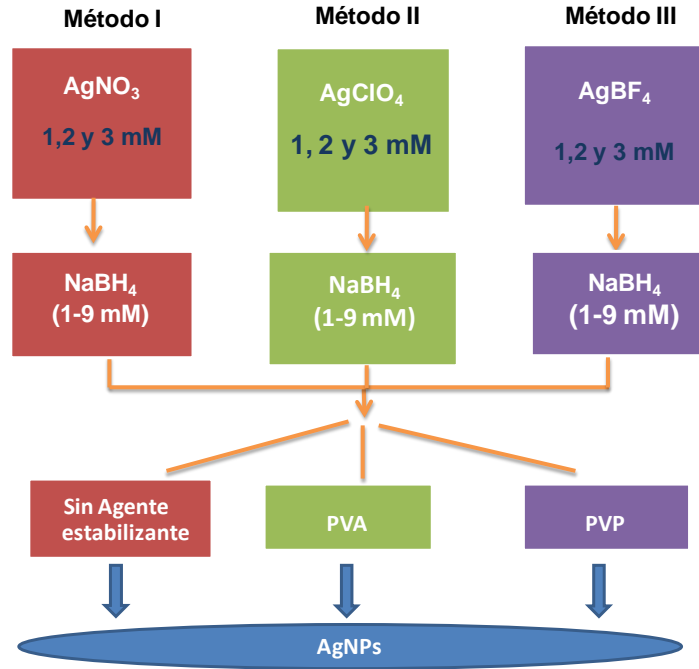


Figura 18. Procedimiento general para la obtención de las AgNPs.



3.5 CARACTERIZACIÓN DE LAS AgNPs

3.5.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las nanopartículas se prepararon dejando caer 10 μL de cada solución coloidal sobre un grid (Formvar) de cobre cubierto por carbón y se enviaron para su caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM) en el Centro de Investigación en Materiales (CCMR) de la Universidad de Cornell, Ithaca, Nueva York (EE UU) y al Laboratorio de Microscopía electrónica de transmisión de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira (Colombia) en un equipo TECNAI 20 Twin de alta resolución con voltaje de 200kV. Las mejores imágenes se obtuvieron con un rango de ampliación desde 195kx hasta 1957kx.

3.5.2 Dispersión de luz en modo dinámico. Las nanopartículas de plata fueron caracterizadas por dispersión de luz en modo dinámico (DLS) con un equipo Malvern Zetasizer Nano-ZS de la Universidad de Cornell, Ithaca, Nueva York (EE

UU) y un equipo Mastersizer 2000 de Malvern (UK) del Laboratorio de Instrumentación química de la Universidad Industrial de Santander. Se necesitó un volumen de muestra de 1,5 mL de solución coloidal de AgNPs de un rango de concentración de 100-200ppm.

3.5.3 Potencial Zeta. Las nanopartículas de plata fueron analizadas por el equipo mencionado anteriormente que también mide el potencial Zeta de las partículas en dispersión (Mastersizer 2000 de Malvern). Se introdujeron 800 μ L de la muestra coloidal de AgNPs (100-200ppm) en la celda atravesada por un potencial de 150V. Se utilizó el programa Zetasizer software con el fin de medir la magnitud de la repulsión o atracción entre las AgNPs. Su medición aporta información detallada sobre el mecanismo de dispersión y es la clave para controlar la dispersión electrostática.

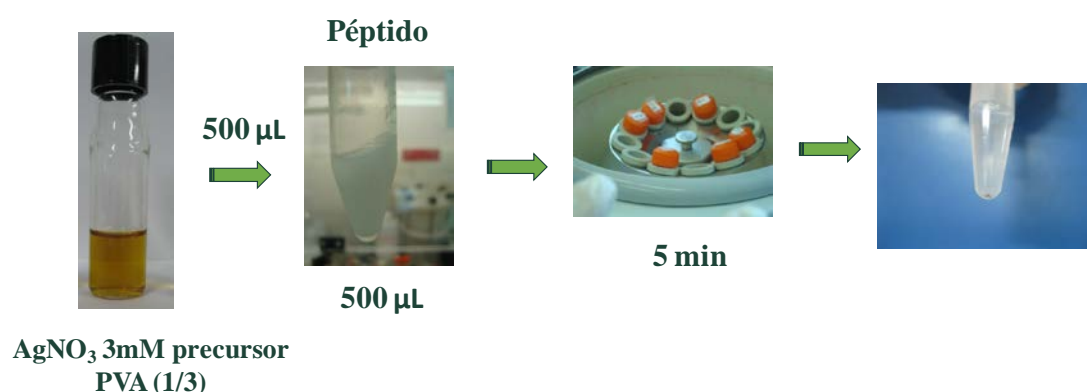
3.5.4 Espectroscopía IR. El análisis de la superficie química las AgNPs se realizó por espectroscopía Infrarroja (IR) en un espectrofotómetro Perkin Elmer de transformada de Fourier (FT-IR). Los espectros FT-IR se obtuvieron con el software "Spectrum" (Perkin Elmer) en un rango de 4000-450 cm^{-1} , a una velocidad de barrido de 0,2 cm s^{-1} , y con una resolución espectral de 4 cm^{-1} . La muestra se colocó en un mortero y fue preparada secándola con una lámpara IR, una vez seca, se mezcló con KBr, y se formó la pastilla. El espectro IR de KBr se realizó antes de la medición bajo las mismas condiciones instrumentales usadas en la muestra.

3.6 FUNCIONALIZACIÓN DE AGNPS-LFAMP Y SUS DERIVADOS

Las AgNPs que exhibieron el mayor potencial antimicrobiano para cada precursor fueron funcionalizadas con los péptidos de LFampB, LFampH y sus derivados - como se muestra en la figura 20- siguiendo los protocolos previamente documentados [182,183] (Figura 19). Se tomó 500 μ l de AgNP y se adicionó a

500µL del péptido (1 mg/L). Posteriormente, los espectros de absorción UV-Vis de los biocunjugados fueron tomados en un espectrofotómetro Shimadzu 1800 con un ancho de rejilla de 1 cm realizando un barrido desde 300 nm hasta 600 .Adicionalmente, se determinó la concentración del péptido en la suspensión por espectroscopía UV-Vis a una $\lambda=230$ nm usando la Ley de Lambert Beer. Seguidamente, a esta solución se le ajustó el pH con una solución de NaOH 1M alrededor del punto isoeléctrico del péptido, consecutivamente se centrifugó, y se realizaron tres lavados sucesivos al precipitado con tampón fosfato 1mM a pH=7.0. Finalmente, el precipitado fue secado en atmósfera de N_2 y resuspendido en tampón fosfato 1mM a pH=7.0. Los espectros de absorción UV-Vis de los biocunjugados resuspendidos en el tampón fosfato fueron tomados en un espectrofotómetro Shimadzu 1800 con un ancho de rejilla de 1 cm realizando un barrido desde 300 nm hasta 600 y finalmente la concentración del péptido en el sobrenadante fue determinada por espectroscopía UV-Vis a 230 nm usando la Ley de Lambert Beer. La concentración final del péptido funcionalizado fue determinada como la diferencia entre la concentración de la suspensión y el sobrenadante.

Figura 19. Metodología de funcionalización de péptidos y nanopartículas de plata.



3.7 CARACTERIZACIÓN DEL BIOCONJUGADO *PAM*-AgNPs

La AgNP funcionalizada con el péptido antimicrobiano que exhibió la mayor actividad antibacteriana fue caracterizada por dispersión de luz dinámica (DLS), potencial Z, Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y espectroscopia IR. La metodología de caracterización fue la misma que se siguió en el apartado 3.6.

3.8 DETERMINACIÓN DE LA CMI y CMB de *LFampB*, *LfampH*, ANÁLOGOS, AgNPs Y EL BIOCONJUGADO *PAMs*-AgNPs frente a *E. coli* O157:H7

Para determinar el efecto antibacteriano de los péptidos antimicrobianos de *LFampB*, *LFampH* y sus análogos, las AgNPs y el bioconjugado *PAMs*-AgNPs sobre *E. coli* O157:H7 se emplearon dos metodologías:

- **Método de micro-dilución en caldo.** El método de microdilución para la estimación de los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) fue realizado en placas de 96 pozos de acuerdo con los protocolos descritos por varios autores [184,185].

Inicialmente, se preparó un preinóculo de *E. coli* O157:H7 en caldo Luria-Bertani (LB), durante 14h a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una concentración bacteriana de $4,6 \times 10^8$ unidades formadoras de colonia /mL (UFC/mL). Posteriormente, se hizo el seguimiento de la cinética de crecimiento empleando 100 µL de este inóculo bacteriano durante 8h, en microplacas que previamente contenían diluciones seriadas de *LFampB*, *LFampH* y sus análogos (0.25, 0.5, 1, 5, 25, 50 y 100 µM), de las AgNPs (0.25, 1.0, 5, 10, 25, 50, 80 y 100 µg/mL) y del bioconjugado *PAMs*-AgNPs (0.5, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 µM) a 37°C con una agitación de 200rpm. Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro lector de microplaca ELISA (Biorad, imarck) a 595 nm. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue definida como la menor concentración

de AgNPs que produce una inhibición en el crecimiento de la bacteria. Los valores de CMI₉₉, CMI₉₀ CMI₅₀ corresponde a las dosis que inhibe el 99%, 90% y 50% del crecimiento bacteriano, respectivamente.

Posterior a la cinética de crecimiento, se tomó una alícuota de 100 µL de cada pozo que contenía las diferentes concentraciones de los PAMs y se incubó en 900 µL de medio Infusión Cerebro Corazón (BHI, por sus siglas en inglés) en tubos eppendorf a 37°C durante 24 horas. Seguidamente, se tomó una alícuota de 10 µL de cada tubo y se transfirió a placas de agar BHI con el fin de corroborar el efecto bactericida en aquellas donde no hubo crecimiento de colonias bacterianas. El valor de la concentración mínima bactericida (CMB) se determinó como aquella donde el 100% del crecimiento bacteriano fue inhibido completamente en comparación con el control positivo (sin tratamiento con los péptidos antimicrobianos).

- **Método de difusión de disco.** Se realizó el ensayo de actividad antibacteriana en medio sólido empleando placas de agar Muller-Hilton (MH) como se ha descrito por el método de difusión de disco . Inicialmente, se preparó un inóculo que alcanzara una absorbancia entre 0,08-0,1 que en la escala 0,5 McFarland corresponde a 10^8 UFC/mL [186] e inoculó en las placas para luego adicionar diferentes concentraciones de LFampB, LFampH y sus análogos (0.25-100 µM), las AgNPs (0.25-100 µg/mL) y el bioconjugado PAMs-AgNPs (0.5-100 µM) impregnadas en papel de filtro Microclar (0,45 mm) de diámetro 5 mm. Después de la incubación a 37°C durante 24 horas, las diferentes zonas de inhibición fueron medidas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3.9 ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE LA LFampB, LFampH Y SUS ANÁLOGOS

La actividad hemolítica de LFampB y sus análogos fue realizada de acuerdo con un protocolo descrito previamente [187], pero con algunas modificaciones. Cinco

mL de sangre humana se centrifugaron a 75xg por 15 min para obtener los eritrocitos. Las células fueron lavadas tres veces en tampón fosfato isotónico 1mM de glucosa a pH=7.0. La concentración de hemoglobina fue normalizada en la suspensión celular a una concentración de 2mM en tampón fosfato isotónico de glucosa. 100 µL de esta suspensión celular fue adicionada a 100 µL a cada una de las concentraciones del péptido. Después de una hora de incubación a 37°C, los tubos fueron centrifugados a 550xg durante 5 min, y la absorbancia del sobrenadante fue medida a 450 nm. La hemólisis se completó adicionando Tween-20 al 1%. El porcentaje de hemólisis se calculó como sigue:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{A_{450} (\text{muestra tratada con el péptido}) - A_{450} \text{ de la muestra}}{A_{450} (\text{muestra tratada con Tween 20}) - A_{450} \text{ de la muestra}} * 100\%$$

3.10 ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL BIOCONJUGADO PAMs-AgNPs

La determinación de la actividad hemolítica de las AgNP funcionalizada con el péptido antimicrobiano que exhibió la mayor actividad antimicrobiana sobre *E. coli* O157:H7 se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.10. para los PAMs. Las concentraciones de AgNPs-PAM fueron: 0.25, 0.5, 1, 5, 25, 50 y 100 µM.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DISEÑO Y SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

El alineamiento múltiple de secuencia de la LFampB y LFampH se realizó en la base de datos NCBI comparando diferentes proteínas que presentaban una alta homología. Los números de acceso de las proteínas alineadas se encuentran documentados en la Tabla 4. El programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) se utilizó para alinear las secuencias y realizar el análisis de las regiones conservadas.

Tabla 4. Alineamiento múltiple de secuencias (Clustal W) de LFampB y LFampH contra diferentes proteínas. (la tabla no se ve)

N° Acceso GENBANK	Origen	Análogo 1	Análogo 2	Análogo 3
ACY01187.1	India	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR
ACU32889.1	China	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR
ACF17931.1	México	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR
ACB29795.1	China	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR
ABQ08182.1	India	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR
CAA38572.1	EU	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR
NP851341.1	EU	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR
1BLF	EU	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR
CAA40366.1	Francia	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSR
ABF69103.1	India	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSG	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSG	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSG
1BIY	EU	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSG	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSG	GKEDIWKLLSKAQEFGKNKSG
AAA21722.1	EU	AKEDIWKLLRKAQEFGKNKSR	AKEDIWKLLRKAQEFGKNKSR	AKEDIWKLLRKAQEFGKNKSR
LFampB	EU	WKLLSKAQEFGKNKSR	WKLLSKAQEFGKNKSR	WKLLSKAQEFGKNKSR
		. * ***** *****	**** *****	. * ***** *****
<i>SECUENCIAS SINTETIZADAS</i>		GK LIWKLLSKAQEFGKNKSR	WKLLRKAQEFGKNKSR	GK LIWKLLRKAQEFGKNKSR

N° Acceso GENBANK	Origen	Análogo
NP_001186078.1	EU	DAIWNLLRQAQEKFQKDKSP
ACF19793.1	India	DAIWNLLRQAQEKFQKDKSP
BAG52774.1	Japón	DAIWNLLRQAQEKFQKDKSP
ACC95967.1	Francia	DAIWNLLRQAQEKFQKDKSP
BAF83548.1	Japón	DAIWNLLRQAQEKFQKDKSP
1HSE A	Nueva Zelanda	DAIWNLLRQAQEKFQKDKSP
2PMS A	EU	DAIWNLLRQAQEKFQKDKSP
EAW64767.1	EU	DAIWNLLRQAQEKFQKDKSP
LFampH	Holanda	WNLLRQAQEKFQKDKSP
		*****.***
SECUENCIAS SINTETIZADAS		DAIWNLLRQAQEKFQKDKSPK

Nota. [*] Mismo aminoácido en todas las secuencias comparadas; [:] se observan sustituciones conservadas (Aa con las mismas propiedades); [.] se observan sustituciones no conservadas (Aa con distintas propiedades).

Las modificaciones de LFampB incluyeron: la adición de una secuencia de aminoácidos de Glicina-Lisina-Leucina-Isoleucina (GKLI) en el extremo N-terminal de la LFampB, el cambio de un residuo Serina (S) ubicado en la posición 291 por uno de Arginina (R), y una nueva adición de GKLI sobre el análogo anterior (figura 20 a).

En el alineamiento múltiple de secuencia para el péptido de LFampH (figura 20 b) el aminoácido de asparagina (N) ubicado en la posición 301 fue remplazado por el aminoácido ácido aspártico (D). Adicionalmente, el extremo N-terminal de la LFampH presenta una α -hélice anfipática que se estabilizó con la adición de una secuencia de ácido aspártico-alanina-isoleucina (DAI) mientras que en su extremo C-terminal se adicionó un residuo de lisina (K) para aumentar la carga neta en este extremo implicado en la actividad antimicrobiana [188].

Las características fisicoquímicas, tales como carga neta positiva, hidrofobicidad, volumen, momento hidrofóbico (μ) y tiempo de retención de los péptidos de LFampB, LFampH y sus análogos se encuentran registrados en la Tabla 5. Los

análogos 1 y 3 de LFampB obtuvieron la mayor carga neta positiva e hidrofobicidad, respectivamente, mientras que el análogo 2 de la LFampB obtuvo el menor volumen, características fundamentales para la formación de los péptidos antimicrobianos [189].

Figura 20. Alineamiento múltiple de secuencia: a) LFampB y b) LFampH.

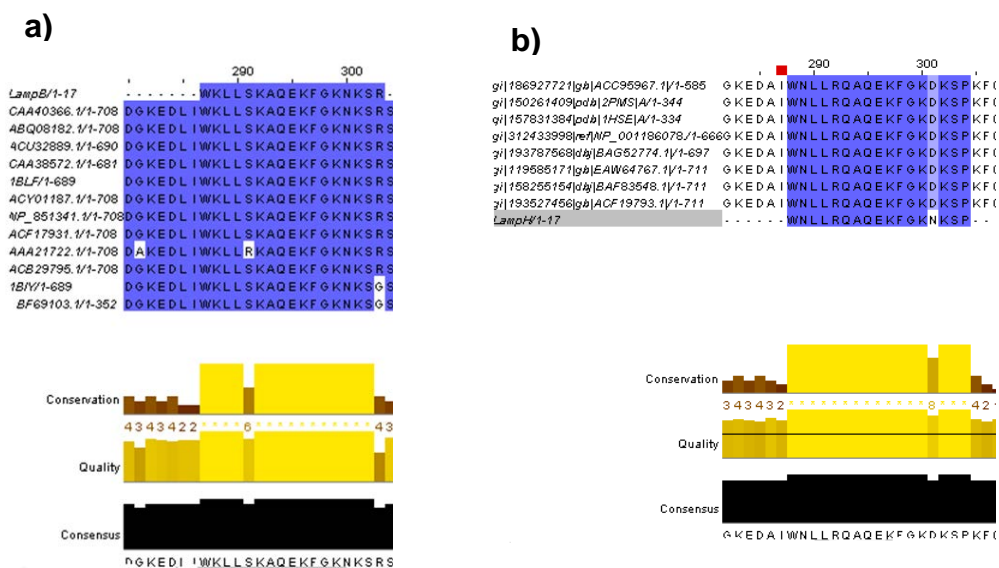


Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de LFampB, LFampH y sus análogos.

PEPTIDO	PM (Da)	N° AA	CARGA (+) ^a	<μ> ^b	VOLUMEN (Å)	<H> ^c	Tiempo de retención (min)
<i>LFampB</i>							
WKLLSKAQEKF G KNKSR	2048.4	17	5	0.7	2479	-3.17	15.182
<i>Análogo 1</i>							
G KLIWKLLSKAQEKF G KNKSR	2459.94	21	6	0.5	2977	-2.27	6.158
<i>Análogo 2</i>							
WKLLRKAQEKF G KNKSR	2117.51	17	7	0.9	2563	-3.5	5.183
<i>Análogo 3</i>							
G KLIWKLLRKAQEKF G KNKSR	2529.05	21	7	0.8	3060	-2.54	11.125
<i>LFampH</i>							
WNLLRQAEKF G KNKSP	2044.33	17	3	0.4	2473	-2.53	6.333
<i>Análogo</i>							
D AIWNLLRQAEKF G KDKSPK	2472.82	21	2	0.6	2992	-2.61	18.633

^a Carga neta positiva a pH neutro

^b Momento hidrofóbico

^c Hidrofobicidad calculada de la suma de los valores de la hidrofobicidad.

El análogo 2 obtuvo el mayor valor de momento hidrofóbico, lo que indica que presenta una estructura anfipática. Sin embargo, eluyó más rápidamente que los análogos 1 y 3 de LFampB. El análogo 1 obtuvo el menor valor de momento hidrofóbico, sin embargo su tiempo de retención fue menor que el análogo 3, lo que indica que este último presentó una disminución en la anfipaticidad por su alto tiempo de retención [189]. El análogo de LFampH presentó un tiempo de retención casi tres veces mayor que LFampH, estos resultados fueron acordes con el momento hidrofóbico. Adicionalmente, LFampB, LFampH y el análogo 2 fueron los péptidos de menor longitud (17 AA).

4.2 CARACTERIZACIÓN DE LA LFampB, LFampH Y SUS ANÁLOGOS

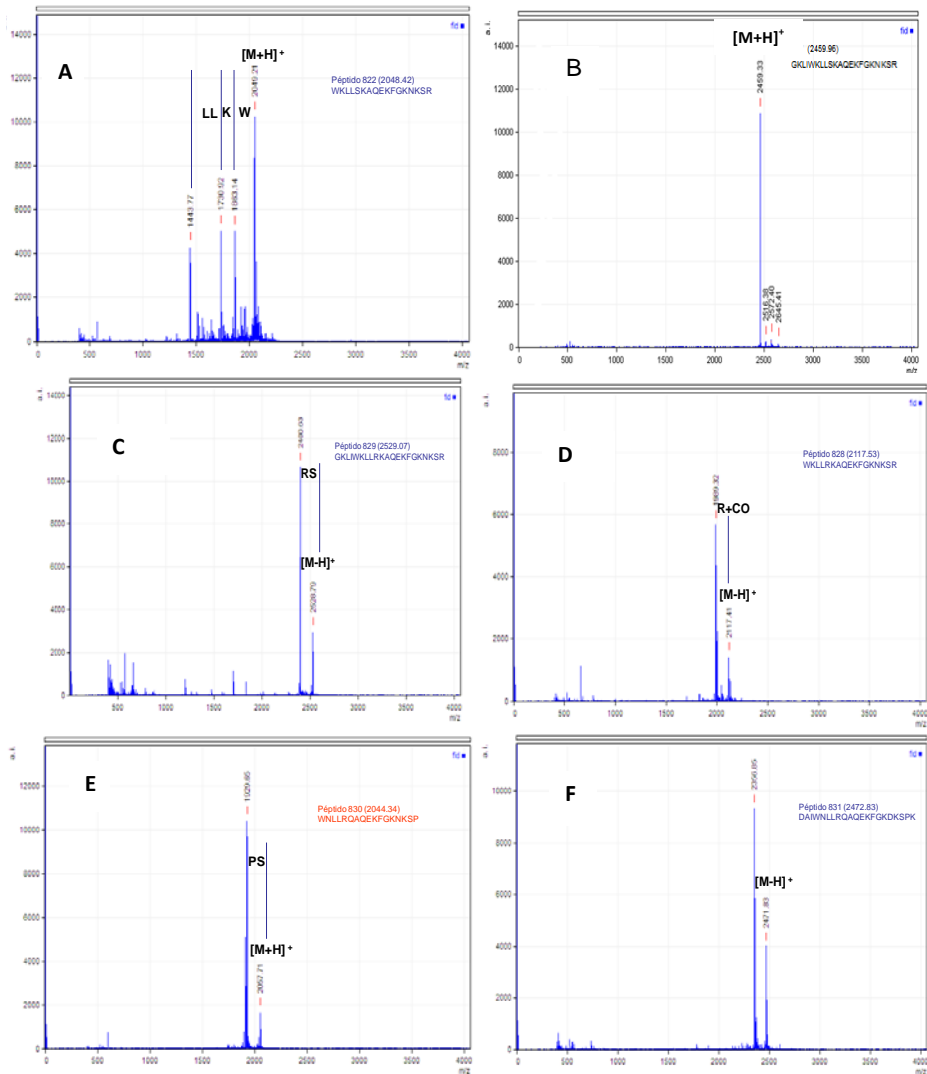
4.2.1 Cromatografía líquida. Los péptidos sintetizados fueron purificados por RP-HPLC obteniéndose en todos los cromatogramas una señal principal, sin presencia de deleciones (Anexo 5). El producto final se obtuvo con un grado de pureza del 95-98%. Se presentaron diferentes tiempos de retención indicando que los péptidos interactuaban de forma diferentes con la fase estacionaria de la columna C₁₈.

4.2.2 Análisis de espectrometría de masas. En todos los casos fue posible confirmar la secuencia primaria de los péptidos de LFampB, LFampH y sus análogos mediante el análisis de los de masas MALDI-TOF como se muestra en la Figura 21.

Los resultados obtenidos a partir del análisis por Maldi-Tof son presentados en la tabla 6, los datos experimentales de m/z (unidades de masa) para cada péptido fueron acordes con sus respectivas masas moleculares obtenidas teóricamente [39].

Por ejemplo, el péptido de LFampB obtuvo una señal del ión molecular a 2049.21 y tres señales más que corresponden a la ionización de sus aminoácidos del lóbulo N-terminal. Inicialmente, la primera fragmentación corresponde al aminoácido de triptófano, seguido de lisina y los dos aminoácidos de leucinas. De la misma manera, se evaluaron las diferentes señales obtenidas en los espectros de masas de los análogos de LFampB y la LFampH correspondientes a la ionización de sus aminoácidos (Figura 21).

Figura 21. Espectros de masas..



Nota. A) LFampB, B) Análogo 1, C) Análogo 2, D) Análogo 3, E) LFampH y F) Análogo

Tabla 6. Masa experimental y calculada por MALDI-TOF de LFampB, LFampH y sus análogos.

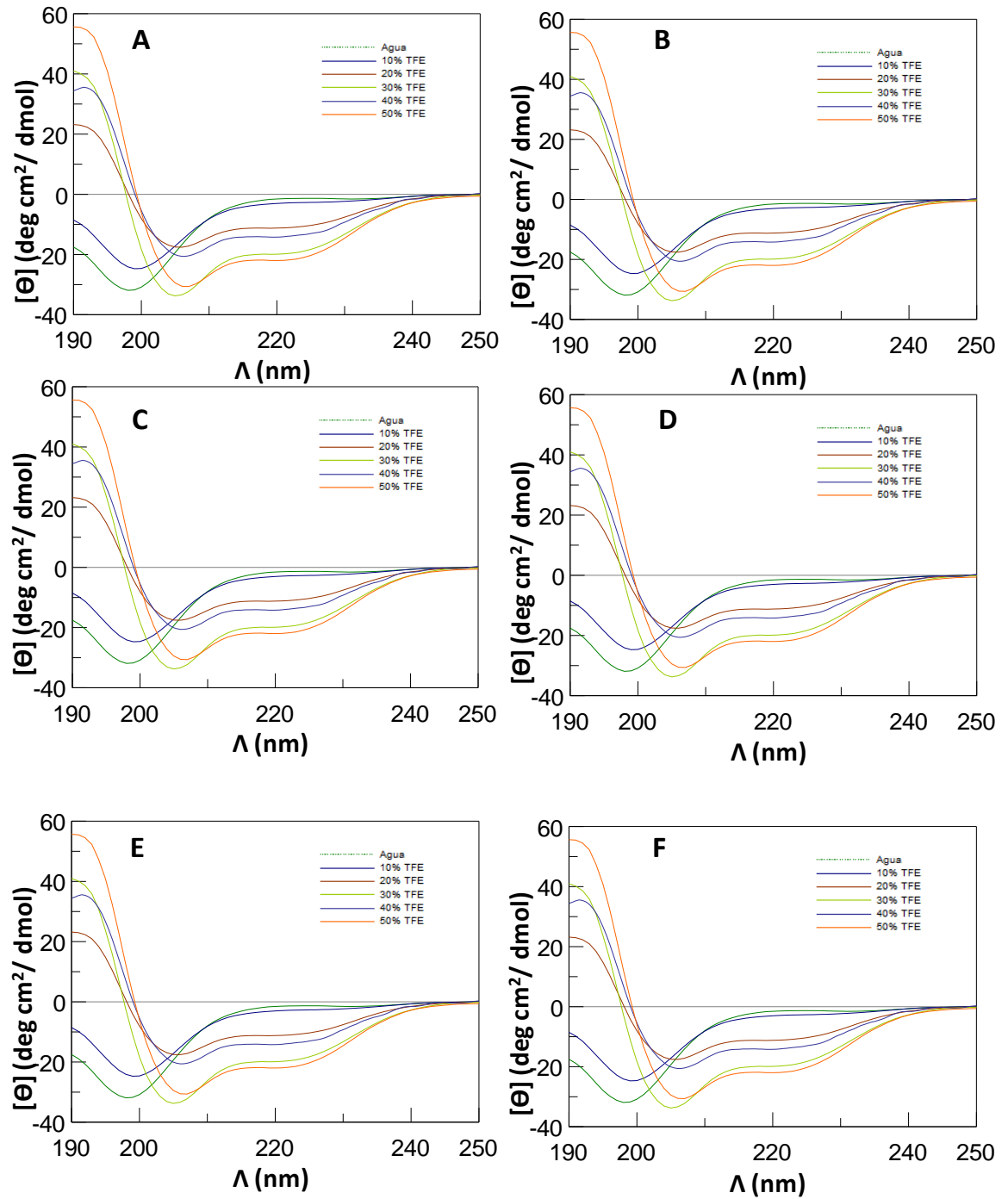
PEPTIDO	PM (Da)	m/z
<i>LFampB</i>		
WKLLSKAQEKFGKNKSR	2048.4	2049.21
<i>Análogo 1</i>		
GKLIWKLLSKAQEKFGKNKSR	2459.94	2459.33
<i>Análogo 2</i>		
WKLRLKAQEKFGKNKSR	2117.51	2117.41
<i>Análogo 3</i>		
GKLIWKLLRLKAQEKFGKNKSR	2529.05	2528.79
<i>LFampH</i>		
WNLLRQAQEKFGKNKSP	2044.33	2057.71
<i>Análogo</i>		
DAIWNLLRQAQEKFGDKSP	2472.82	2471.83

*m/z= masa/carga

PM= Peso molecular

4.2.3 Dicroísmo Circular. Para determinar la estructura secundaria de la LFampB, LFampH y sus análogos se determinó el espectro de DC en condiciones simuladas de membrana en presencia de TFE/H₂O a diferentes %v/v (10, 20, 30 40 y 50%). LFampB, LFampH y sus análogos no presentaron una estructura típica definida en solución acuosa (Figura 22). Sin embargo, al aumentar el porcentaje de TFE hasta un 20%, la LFampB, LFampH y sus análogos adoptaron una estructura α -hélice, Los espectros de DC de los análogos 1, 2 y 3 y el análogo de LFampH exhibieron un mínimo de dos bandas negativas a 205 y 215 nm, lo que indica que adoptan una estructura α -hélice bien definida como se ha registrado en investigaciones previas [38]. La estructura secundaria se ha establecido como un prerrequisito para la actividad antimicrobiana [18].

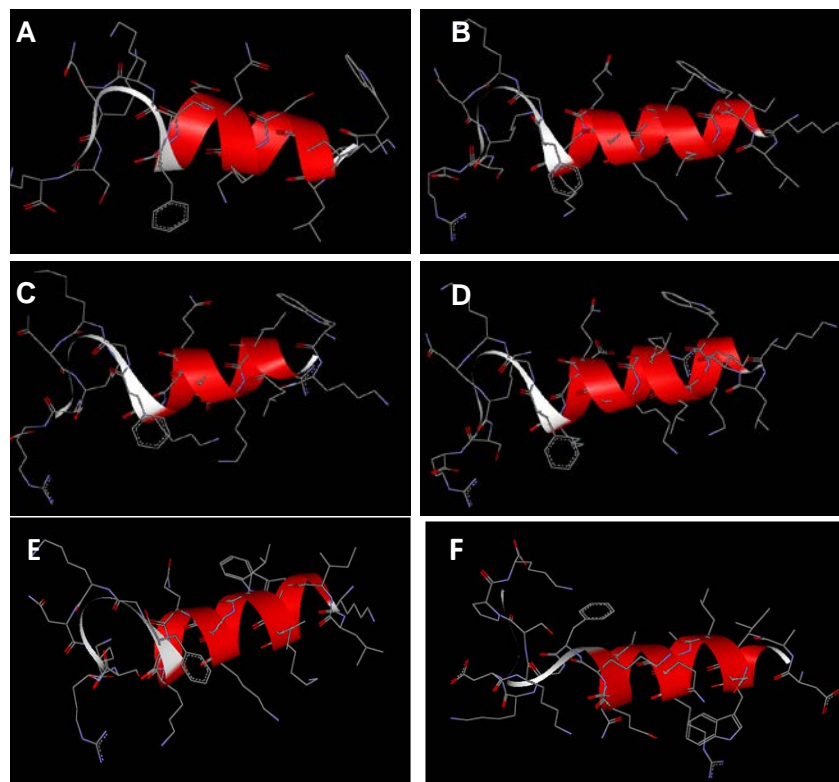
Figura 22. Espectros de DC y efecto del TFE en la estructura helicoidal.



Nota. A) LFampB, B) Análogo 1, C) Análogo 2, D) Análogo 3, E) LFampH y F) Análogo.

4.2.4 Simulación teórica de la estructura secundaria. El modelo molecular de los péptidos que fue obtenido de la base de datos ACBS, y su visualización estructural se realizó utilizando el software WebLab ViewerPro (Figura 23), los resultados demuestran que la LFampB, LFampH y sus análogos presentan una estructura secundaria α -hélice y una región anfipática en sus extremos N y C-terminal. Además, se observa, la distribución de los residuos hidrofílicos sobre la cara de la hélice (KQGRN) y los hidrofóbicos formando la estructura α -hélice (LAF). La región GKLI posee una estructura helicoidal anfipática extendida para los análogos 1 y 3 que es la encargada de estabilizar el lóbulo N-terminal, que para el análogo de LFampH corresponde a la secuencia DAI. El análisis teórico de la predicción de la estructura secundaria fue acorde con los resultados obtenidos experimentalmente por los espectros de DC [38, 39, 188].

Figura 23. Estructura secundaria simulada



A) LFampB, B) Análogo 1, C) Análogo 2, D) Análogo 3, E) LFampH y F) Análogo.

4.3 SÍNTESIS DE AgNPs

Se obtuvieron 81 tipos de AgNPs en soluciones coloidales variando los tres parámetros: concentración del agente precursor, relación agente reductor/precursor de Ag (1,2 y 3) ($\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$, $\text{NaBH}_4/\text{AgClO}_4$, $\text{NaBH}_4/\text{AgBF}_4$), y el uso de agentes estabilizantes (PVA y PVP) bajo las condiciones descritas en el apartado 3.4.

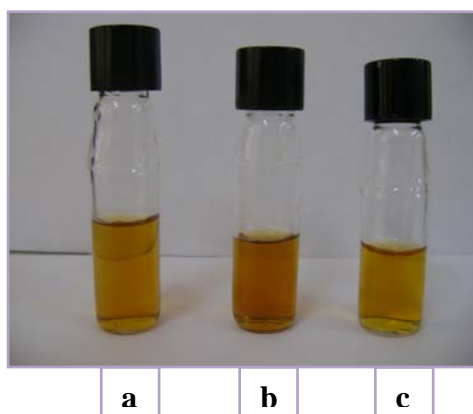
Las AgNPs sintetizadas inicialmente exhibieron una coloración amarilla, pero después de un período de 5 meses las AgNPs sintetizadas a partir de los precursores de AgBF_4 y AgClO_4 en presencia de PVA y en ausencia de agente estabilizante cambiaron a un color gris y verde, respectivamente. Esto se debe a un fenómeno conocido como absorción de plasmones. Esta propiedad se debe a que la luz incidente genera oscilaciones de los electrones de conducción en la superficie de las nanopartículas y la radiación electromagnética es absorbida [189]. El color de las nanopartículas de plata depende de las condiciones experimentales, es decir, la naturaleza del agente reductor, el método de preparación, agitación, la acidez de la mezcla de reacción y la ausencia o presencia de agentes estabilizantes (polímeros, surfactantes, ligandos, proteínas) [190]

Por otra parte se estudió el efecto de diferentes estabilizantes (PVP y PVA) y de la relación agente reductor/precursor de Ag, sobre la estabilidad de las AgNPs. El PVA fue el agente que estabilizó mejor las nanopartículas de plata evitando su sedimentación hasta por 9 meses, seguido del PVP y las nanopartículas sin agente estabilizante, las cuales fueron estables en un período de 7 y 6 meses.

Adicionalmente, la relación agente reductor/precursor de $\text{Ag}=3$ para los tres precursores en presencia de PVA fueron las AgNPs más estables, y conservaron su coloración amarilla durante un período de tiempo más prolongado respecto a

las demás síntesis. Esto se podría atribuir a una mayor eficiencia en la reacción para la formación de nanopartículas de plata (Ag^0). La imagen que se representa en la figura 24 fue tomada después de 9 meses de síntesis.

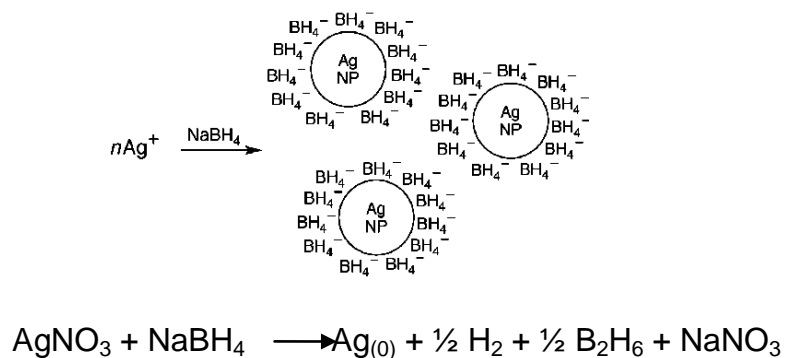
Figura 24. Nanopartículas de plata sintetizadas a partir de una concentración 3 mM de los precursores de Ag, usando el PVA como agente estabilizante, utilizando una relación agente reductor/precursor de 3 con diferentes precursores



Nota. a) AgNO_3 , b) AgBF_4 y c) AgClO_4 .

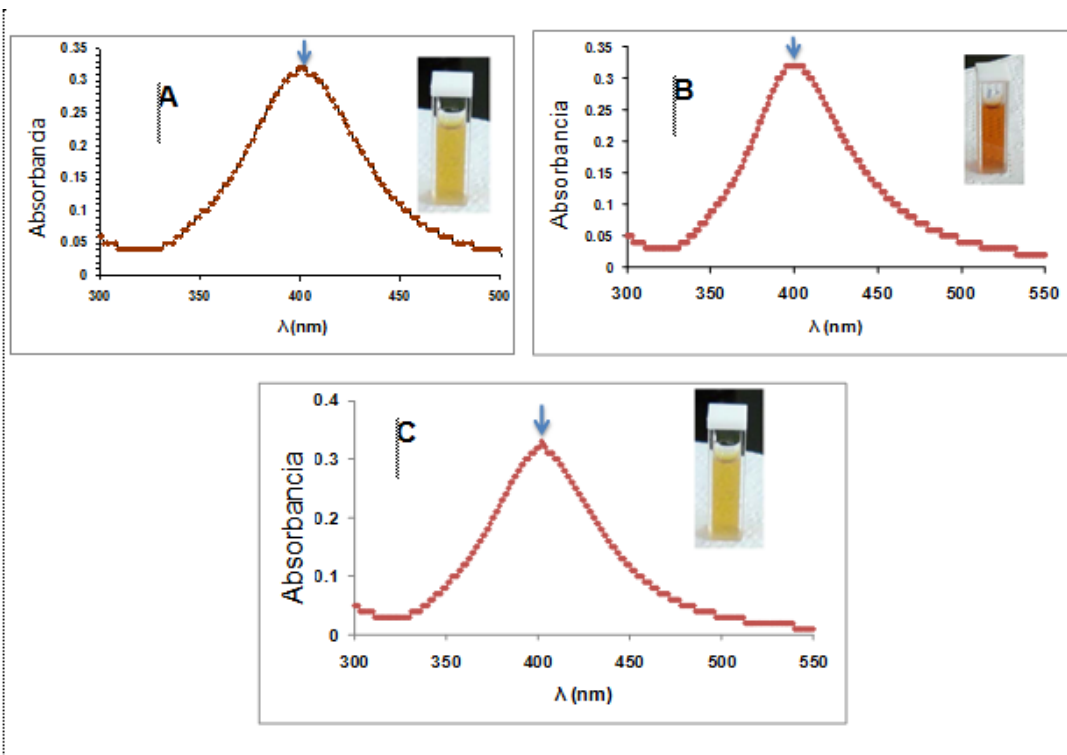
La reacción química propuesta para la reducción de AgNO_3 con NaBH_4 se representa en la figura 25. Sin embargo, el mecanismo de formación de las AgNPs a partir de los precursores de AgBF_4 y AgClO_4 aún no se ha descrito en la literatura.

Figura 25. Reacción de la síntesis de nanopartículas formadas usando el AgNO_3 como precursor. [181]



Los espectros de absorción UV-Vis característicos de las AgNPs sintetizadas se presentan en la Figura 26. El espectro UV-Vis de una muestra de AgNP formada a partir de cada precursor de AgNO_3 , AgClO_4 y AgBF_4 se muestra en la figura 32 A, 32 B y 32 C, respectivamente.

Figura 26. Espectros de absorción de las nanopartículas en solución.



Nota. A) AgNO_3 , B) AgClO_4 y C) AgBF_4 . Relación NaBH_4 /precursor.

Las AgNPs sintetizadas presentaron un máximo de absorción a diferentes longitudes de onda entre 390 a 406 nm. La absorción de las AgNPs a diferentes longitudes de onda se debe a un fenómeno conocido como Superficie de resonancia de plasmones (SRP) que produce un desplazamiento a mayores longitudes de onda con el aumento de tamaño de la partícula [191]. Además, se sabe que la absorción de las nanopartículas de plata depende principalmente del tamaño, forma y la constante dieléctrica del medio circundante [192]. En general,

el número de señales de SPR disminuye a medida que la simetría de las nanopartículas aumenta [193].

Debido a que las AgNPs formaron sólo una banda de SPR es posible sugerir que las NPs que se formaron presentan una forma esférica. Además se descarta la presencia de nanopartículas de plata agregadas y polidispersas. Esto es consistente con los reportes de Schultz y col. [194], quienes determinaron que existe una correlación entre los espectros de absorción y la forma y tamaño de partícula, caracterizadas por TEM. En este estudio encontraron que las partículas más o menos esféricas o esféricas, decaedrales o pentagonales, triangulares o en forma de agujas absorben en la parte azul, verde y roja del espectro, respectivamente.

Las AgNPs sintetizadas a partir de los precursores de AgNO_3 y AgBF_4 presentaron un máximo de SRP entre 390 a 402 nm, longitudes de onda menores que las AgNPs sintetizadas a partir de AgClO_4 que presentaron un máximo de SRP entre 402 a 406 nm (desplazamiento hacia el rojo). En consecuencia, las AgNPs provenientes de los precursores de AgNO_3 y AgBF_4 son más pequeñas que las AgNPs provenientes del precursor AgClO_4 . La absorción de plasmon superficial a estas longitudes de onda fue consistente con otros estudios llevados a cabo previamente [195-198].

4.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS AgNPs

A fin de establecer una buena correlación entre la actividad antibacteriana y propiedades de nanomateriales, es necesario conocer la morfología, tamaño, carga superficial y la composición química de la superficie de los nanomateriales. Este es un punto clave para las AgNPs, ya que sus propiedades están determinadas principalmente por su tamaño y morfología, incluso cuando tienen la misma composición química [199,200]

Las AgNPs que exhibieron la mayor actividad para cada precursor fueron caracterizadas por TEM, DLS, potencial Z y espectroscopía IR. En la tabla 7 se encuentra relacionada la morfología, el tamaño y el potencial Z de cada una de estas AgNPs.

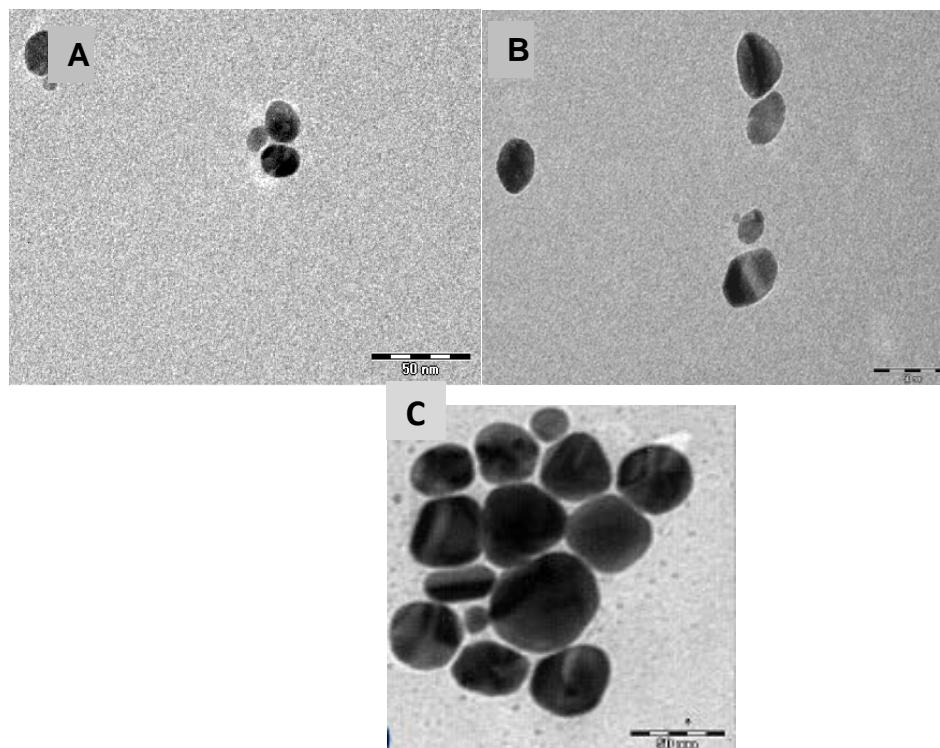
Tabla 7. Resumen de las características del tamaño y carga de las AgNPs.

AgNPs (Características de síntesis)	TEM (nm)	Tamaño promedio DLS (en agua) (nm)	Potencial Z (en agua) (mV)
Precursor: AgNO₃ NaBH₄/AgNO₃= 3 [AgNO₃]= 3 mM	Esférica 10 ±5 nm	18.58	-8.72
Precursor: AgClO₄ NaBH₄/AgNO₃= 3 [AgClO₄]= 3 mM	Esférica 18 ± 9.1 nm	20.62	-24.7
Precursor: AgBF₄ NaBH₄/AgNO₃= 3 [AgNO₃]= 3 mM	Esférica 10 ±2 nm	15.82	-0.391

4.4.1 Microscopía de transmisión electrónica. Se realizó la caracterización de las AgNPs empleando microscopía de transmisión electrónica (TEM) con el fin de observar tanto el tamaño y forma de las nanopartículas sintetizadas. Las imágenes de microscopía se obtuvieron para tres tipos de AgNPs teniendo en cuenta la estabilidad en el tiempo de las mismas para cada precursor.

Los tres tipos de AgNPs mostraron similitud en su morfología (forma esférica) y se encuentran dispersas sin formación de aglomerados como se puede observar en la figura 27. La actividad antimicrobiana de las nanopartículas también depende de su forma, esto se ha confirmado mediante el estudio de la inhibición del crecimiento bacteriano de las nanopartículas en diferentes formas [92].

Figura 27. Microscopía electrónica de las AgNPs que exhibieron la mayor estabilidad para cada precursor.

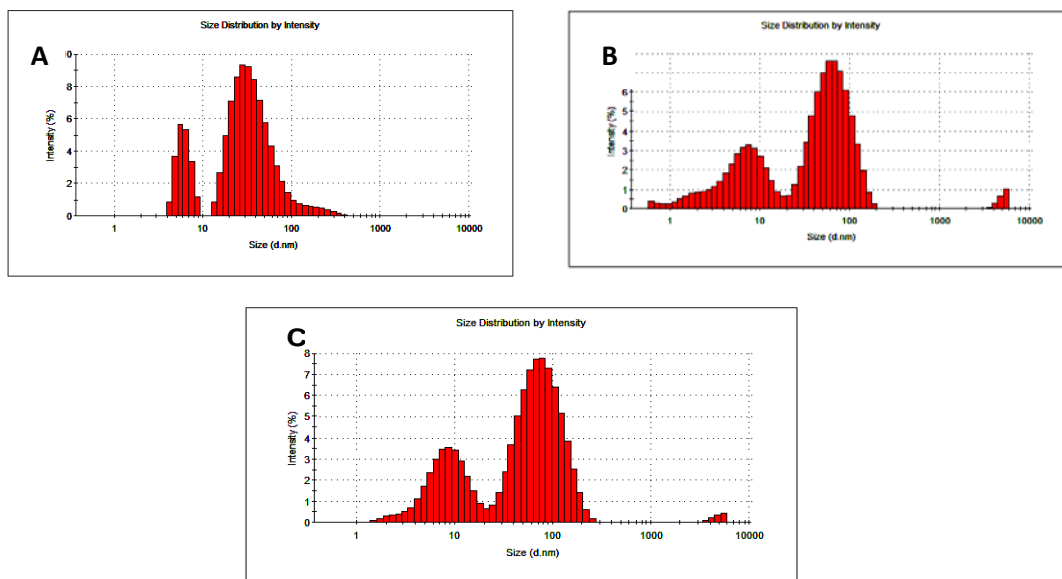


Nota. A) AgNO_3 , B) AgClO_4 y C) AgBF_4 .

4.4.2 Dispersión de luz en modo dinámico. En la figura 28 A, B y C se presentan los histogramas de la distribución de tamaño de las AgNPs sintetizadas (DLS) a partir de una relación $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3=3$ y una concentración de 3mM de los precursores AgNO_3 , AgClO_4 y AgBF_4 , respectivamente.

Las AgNPs provenientes del precursor AgNO_3 alcanzaron un tamaño promedio de 18.58 nm, formando una distribución bimodal de tamaños como se ilustra en el histograma (figura 28 A), la primera con tamaños entre 3 y 9 nm, y la segunda con diámetros entre 15 a 100 nm. Estos resultados confirman una buena estabilización de las AgNPs usando esta metodología como ya se ha documentado en la literatura obteniendo tamaños de ± 12 nm [181].

Figura 28. DLS de las AgNPs que exhibieron la mayor actividad para cada precursor.



Nota. A) $AgNO_3$, B) $AgClO_4$ y C) $AgBF_4$.

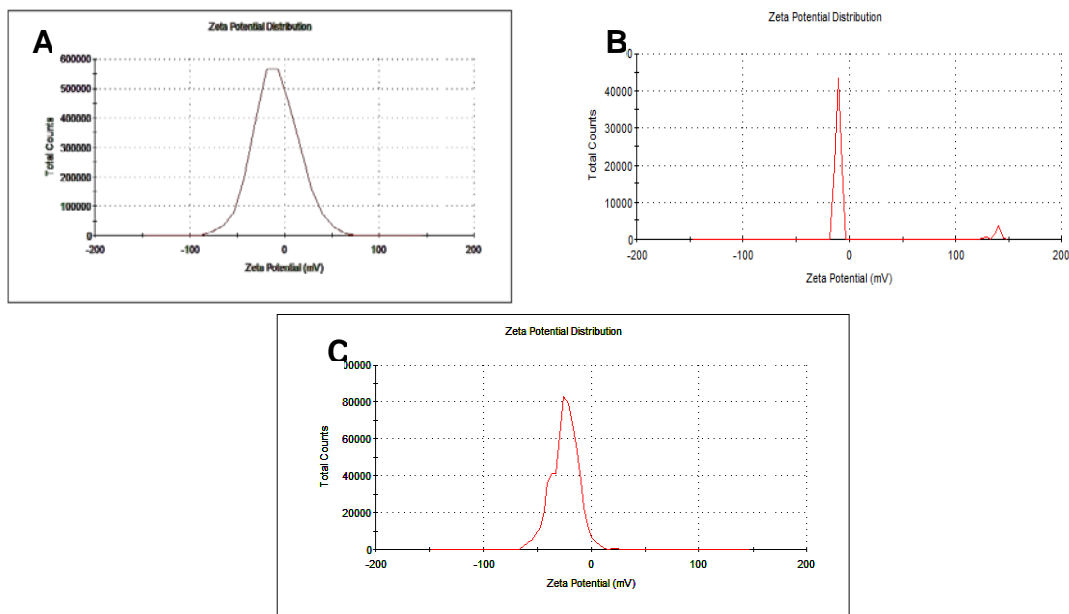
Por otro lado, las AgNP provenientes del precursor $AgClO_4$ presentaron un tamaño promedio de 20.62 nm, formando una distribución bimodal de tamaños como se ilustra en el histograma (figura 28 B), la primera distribución con tamaños tan pequeños de 0.62 y 20 nm, y la segunda con diámetros entre 21 a 190 nm. Estos resultados fueron coherentes con los documentados obteniendo AgNPs con tamaños entre ± 17 y 6.5 nm usando DMF como disolvente [180].

Por último, las AgNPs sintetizadas a partir del precursor $AgBF_4$ presentaron un tamaño promedio de 15.82 nm, formando una distribución bimodal de tamaños como se ilustra en el histograma (figura 28 C), la primera con tamaños entre 2 y 25 nm, y la segunda con diámetros entre 25 a 295 nm. Estos resultados fueron coherentes con los documentados obteniendo AgNPs con tamaños entre ± 15 y 20 nm [179].

4.4.3 Potencial Zeta. El potencial zeta es una medida de la estabilidad de una partícula e indica el potencial que se requiere para penetrar la capa de iones circundante en la partícula para desestabilizarla. Por lo tanto, el potencial zeta es la potencia electrostática que existe entre la separación de las capas que rodean a la partícula [201].

En la figura 29, se aprecian los picos en conteos totales del potencial zeta medido para las AgNPs sintetizadas empleando tres diferentes precursores de plata. Las AgNPs presentaron una carga superficial promedio de -8.72, -24.7 y -0.391 mV para las AgNPs provenientes de los precursores AgNO_3 , AgClO_4 y AgBF_4 , respectivamente. En este sentido, la medida de potencial indicó que las AgNPs eran inestables y con tendencia a agregarse, ya que como se ha documentado previamente las AgNPs con potenciales más positivos a + 30 mV o más negativos a -30 mV se consideran como estables [202]. Adicionalmente, se logró establecer que las AgNPs se encontraban reducidas (Figura 29)

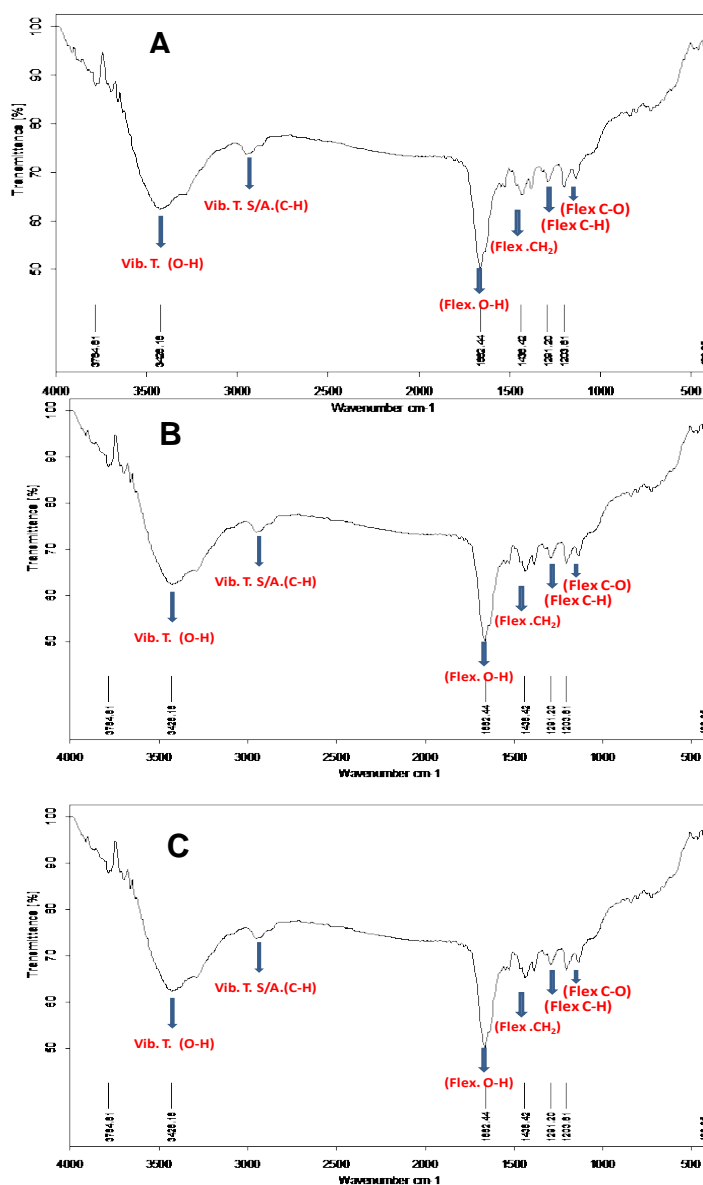
Figura 29. Potencial Z de las AgNPs que exhibieron la mayor actividad para cada precursor.



Nota. A) AgNO_3 , B) AgClO_4 y C) AgBF_4 .

4.4.4 Espectroscopía IR. Las AgNPs que exhibieron la mayor estabilidad para cada precursor se caracterizaron por espectroscopía IR. En todos los espectros se encontraron las bandas de absorción características del PVA, comprobando de esta manera que se encontraba adsorbido sobre la superficie de las AgNPs.

Figura 30. Espectro IR de las AgNPs que exhibieron la mayor actividad para cada precursor.



Nota. A) $AgNO_3$, B) $AgClO_4$ y C) $AgBF_4$.

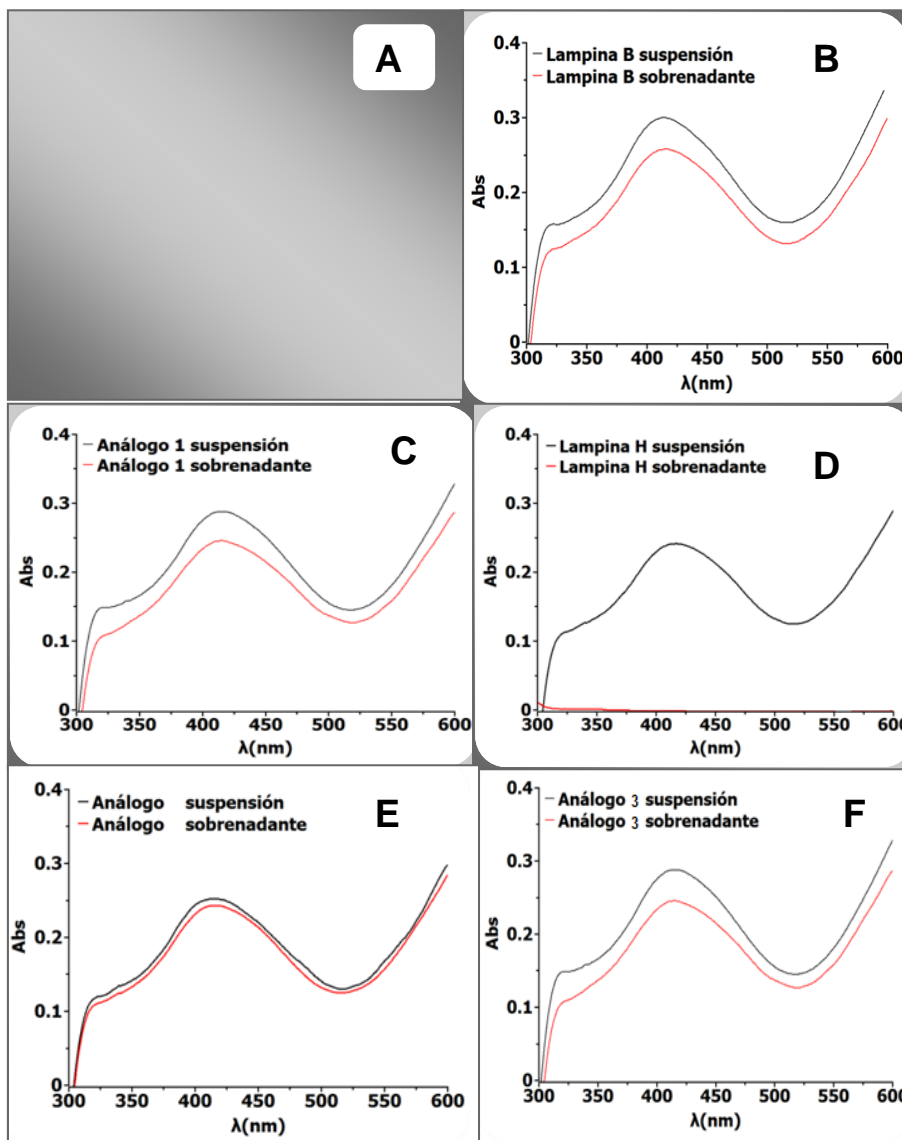
Los espectros de IR (Figura 30) presentaron varias bandas características de las vibraciones de estiramiento y flexión debidas a la presencia de los grupos O-H, C-H, y C-O. Se observó una banda ancha muy marcada a 3428.18 cm^{-1} , la cual surge de la vibración de tensión superficial del grupo O-H, indicando la presencia de grupos hidroxilo. Se observó otra banda marcada a 2938 cm^{-1} , indicando un modo de tensión asimétrico del grupo CH_2 . La observación de un pico de absorción moderado a 1662.44 cm^{-1} puede ser atribuida a la flexión vibracional de C-OH. Se observó en el espectro otra banda a 1436.42 cm^{-1} , la cual se ha asignado al modo de flexión vibracional correspondiente al grupo CH_2 . Adicionalmente, dos bandas de absorción moderada se observaron a 1291.20 cm^{-1} y 1203.61 cm^{-1} , las cuales han sido atribuidas a la extensión del grupo C-H y C-O, respectivamente. Estos resultados son acordes con los obtenidos por otras investigaciones [203, 204].

4.5 FUNCIONALIZACIÓN DE AgNPs-LFamp Y SUS DERIVADOS

Los péptidos antimicrobianos de LFampB, LampH y sus derivados fueron funcionalizados por autoensamble con las AgNPs que exhibieron la mayor actividad para cada precursor sobre *E. coli* O157:

La concentración del péptido autoensamblado fue determinada por espectroscopía UV-Vis realizando la diferencia de la concentración del péptido en suspensión y en el sobrenadante [205]. Los resultados de los espectros de absorción de la suspensión y el sobrenadante del proceso de formación de los bioconjugados AgNP-AMPs se muestran en la figura 31.

Figura 31. Espectros de absorción de la suspensión y sobrenadante de los péptidos en el proceso de autoensamble con la nanopartícula de plata proveniente del precursor AgNO_3 .



Nota. A) *LFampB*, B) *Análogo 1*, C) *Análogo 2*, D) *Análogo 3*, E) *LFampH* y F) *Análogo*.

De la misma manera, se tomaron los espectros de absorción de la suspensión y el sobrenadante de las AgNPs funcionalizadas con los PAMs provenientes de los precursor AgClO_4 y AgBF_4 , lo cual permitió determinar la concentración del PAM autoensamblado. Los resultados se presentan en la tabla 8.

El análogo 2 de LFampB bioconjugado con las AgNPs fue el péptido que exhibió la mayor concentración de funcionalización (Aprox. 500 μM) ya que este péptido presenta una carga neta positiva alta (+6) que favorece el autoensamble. Adicionalmente, podemos observar en la figura 45 D que la concentración de AgNPs en el sobrenadante es muy baja, lo que sugiere una alta concentración de formación del bioconjugado.

Tabla 8. Concentración del PAM funcionalizado con las AgNPs.

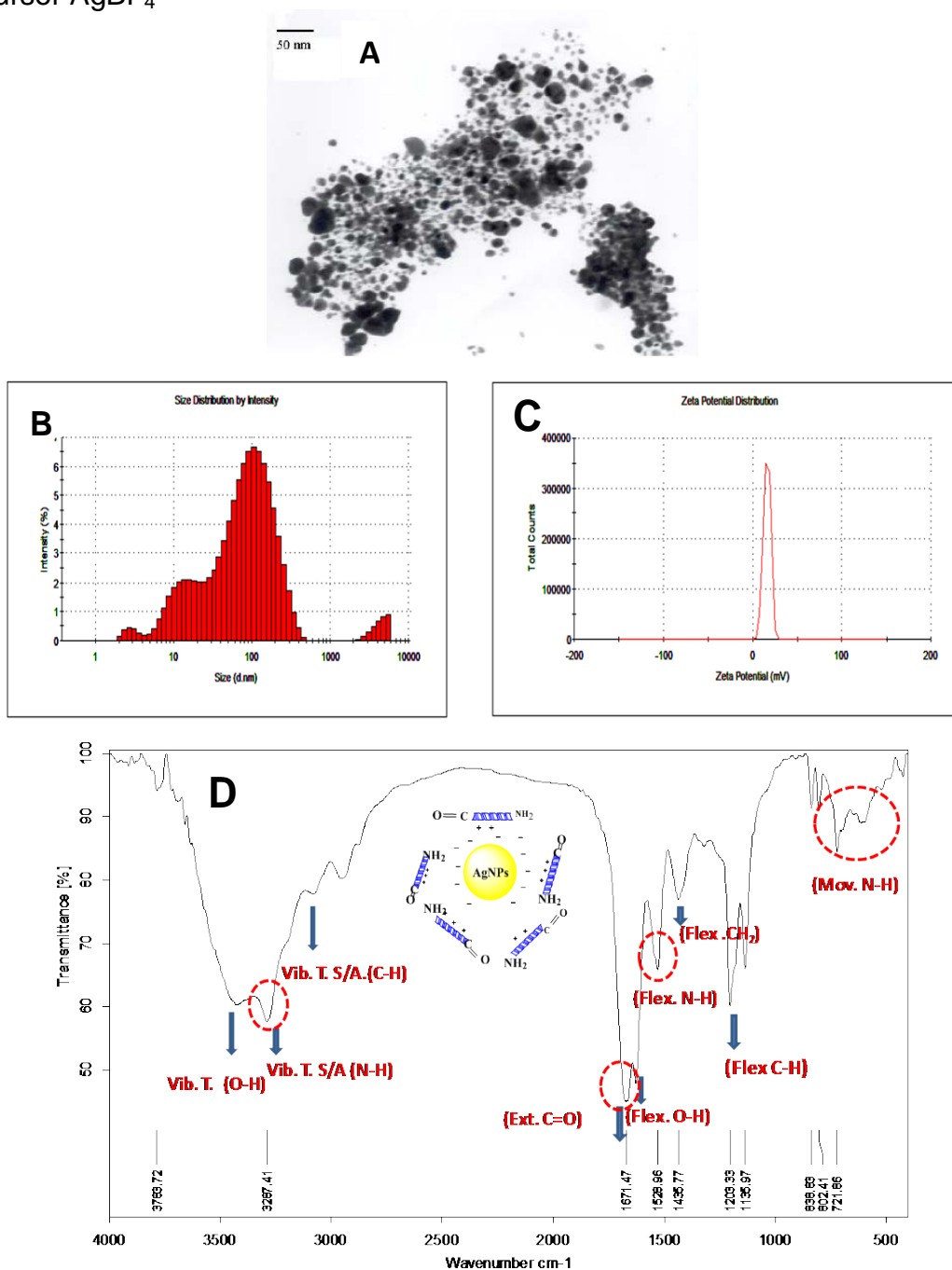
Péptido antimicrobiano	[Péptido funcionalizado] (μM)	[Péptido funcionalizado] (μM)	[Péptido funcionalizado] (μM)
	precursor Ag : AgNO ₃	precursor Ag : AgClO ₄	precursor Ag : AgF ₄
LFampB	45	205	170
Análogo 1	219	321	245
Análogo 2	490	498	493
Análogo 3	234	379	260
LFampH	50	210	100
Análogo	150	275	190

Las concentraciones de los análogos de LFampB y LFampH fueron mayores que del respectivo péptido de origen como se puede observar en la tabla 8. El autoensamble de los péptidos en la nanopartículas tiene que ver con el dipolo que se forma entre la carga neta positiva del péptido y la carga superficial negativa de las AgNPs. De esta forma, los análogos que presentaron las mayores cargas positivas poseían una mayor atracción hacia la AgNP.

Los péptidos autoensamblados con las AgNPs provenientes del precursor AgClO₄ presentaron mayores actividades que los péptidos autoensamblados con las AgNPs sintetizadas con los precursores de AgNO₃ y AgBF₄ debido a que esta AgNp presenta una carga superficial más negativa. La formación del bioconjugado se comprobó al observar la formación de un precipitado gris y una solución transparente (sobrenadante), estos resultados fueron acordes a los documentados por Golubeva y col. previamente [171].

4.6 CARACTERIZACIÓN DEL BIOCONJUGADO PAM-AgNPs

Figura 32. Caracterización del bioconjugado Anál.2-AgNPs proveniente del precursor AgBF₄



Nota. A) TEM, B) DLS, C) Potencial Z y D) espectro IR.

El bioconjugado PAM-AgNPs que exhibió la mayor actividad bactericida fue caracterizado por TEM, (DLS), potencial Z y espectroscopía IR. Los resultados de la morfología, el tamaño, el potencial Z y el espectro IR se presenta en la figura 32.

El tamaño del bioconjugado formado por el autoensamble del análogo 2 de LFampB y la AgNPs proveniente del precursor de AgBF₄ fueron determinados por DLS (figura 32B) obteniendo un tamaño promedio de 50 nm. El tamaño del bioconjugado superó tres veces el tamaño de la AgNPs proveniente del precursor AgBF₄ (15.82 nm) con lo cual se comprobó que el péptido se encontraba funcionalizado.

Adicionalmente, se determinó por la medida del potencial Z (figura 32C) del bioconjugado, obteniéndose un valor de +16 mV. El resultado indica que la carga superficial neta del bioconjugado PAM-AgNPs es positiva, lo que confirma el autoensamblaje y adsorción del péptido sobre las AgNPs.

El bioconjugado anal.2-AgNPs que exhibió la mayor actividad antimicrobiana también fue caracterizado por espectroscopía IR. En la figura 32D se presenta el espectro de absorción IR, el cual se caracterizó por la aparición de nuevas bandas de absorción (líneas rojas punteadas) comparado con el espectro IR de la AgNP. Estas nuevas bandas aparecen debido a la presencia del grupo amino (-NH₂) y el grupo carbonilo (-C=O) presente en el PAM. Además, se observó una banda ancha muy marcada de alta frecuencia 3287.41 cm⁻¹, indicando un modo de tensión simétrica y asimétrica del grupo amino (-NH₂) característico de aminas primarias. Otra banda muy marcada de alta frecuencia se observó a 1671.47cm⁻¹ indicando una extensión del grupo carbonilo (-C=O). Adicionalmente, se observa una banda a 1528.96 cm⁻¹ debida a la flexión del grupo amino. Finalmente, las bandas de absorción que aparecen en 838.83, 802.41 y 721.96 cm⁻¹ son características del movimiento del grupo amino.

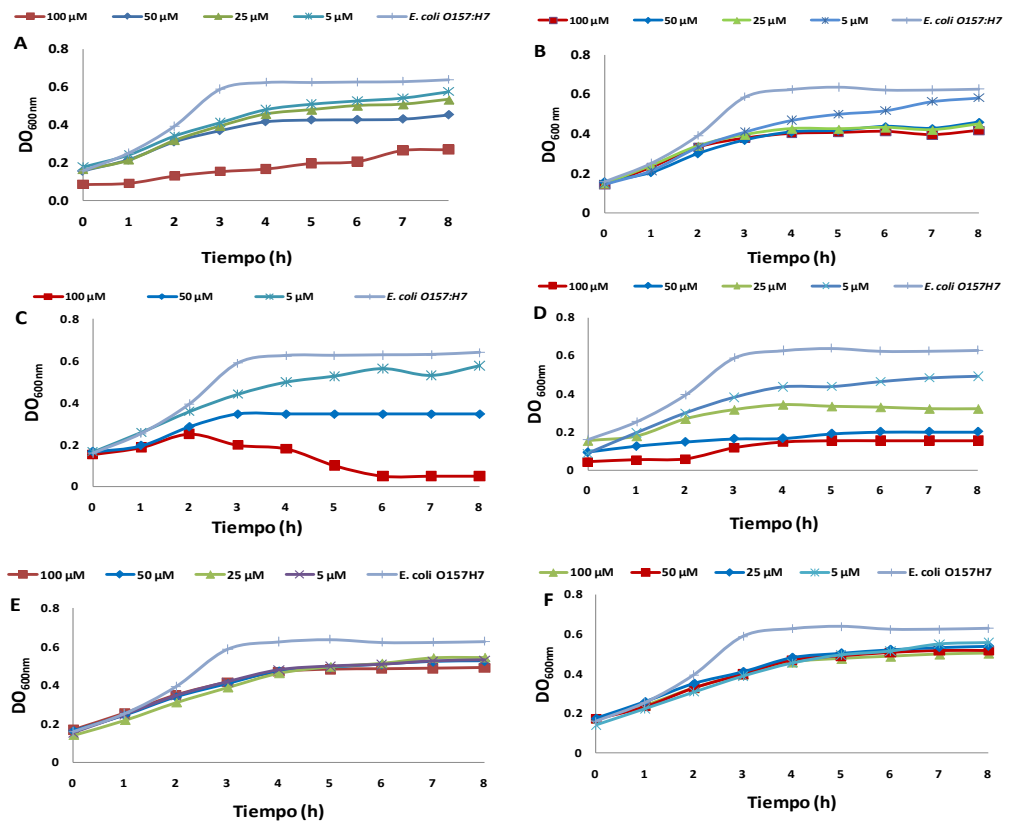
4.7 DETERMINACIÓN DE LA CMI y CMB DE LFampB, LFampH, ANÁLOGOS, AgNPs Y EL BIOCONJUGADO PAMs-AgNPs FRENTE A *E. coli* O157:H7.

Se realizó la evaluación de las propiedades antibacterianas de LFampB, LFampH, análogos, AgNPs y el bioconjugado PAMs-AgNPs frente a *E. coli* O157 como modelo de bacteria Gram-negativa. La determinación del efecto antibacteriano se llevó a cabo empleando dos diferentes métodos: por microdilución y por difusión de disco (método de Kirby-Bauer). A continuación, se presentan los resultados obtenidos de inhibición del crecimiento bacteriano.

4.7.1 Actividad antimicrobiana de LFampB, LFampH y sus análogos. Se evaluó la cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en presencia de diferentes concentraciones de LFampB, LFampH y sus análogos. La figura 33 muestra que a medida que se aumentó la concentración de LFampB, LFampH y sus análogos, es mayor el efecto inhibitorio frente a *E. coli* O157:H7.

En la figura 33 se observa que el análogo 2 fue el péptido con la mayor actividad antimicrobiana, obteniéndose un valor de CMI del 99% de 100 μ M después de 6 horas de exposición de la cepa *E. coli* O157:H7 al péptido. A este porcentaje de inhibición (99%) los demás péptidos evaluados presentaron CMI mayores que 100 μ M (Figura 33). Esto se puede atribuir a que al remplazar un residuo de neutro de Ser por un residuo básico de Arg en el análogo 2 de la LFampB, su carga neta y momento hidrofóbico aumentó respecto a LFampB y fue mayor que el análogo 1 de LFampB y el análogo de LFampH. A pesar que el análogo 3 presenta la misma carga neta, su actividad no fue similar que el análogo 2, produciéndose una disminución en la actividad antimicrobiana producto de la adición de la secuencia GKLI.

Figura 33. Efecto antimicrobiano de los péptidos sobre el crecimiento de *E. coli* O157:H7.



Nota. A) *LFampB*, B) *Análogo 1*, C) *Análogo 2*, D) *Análogo 3*, E) *LFampH* y F) *Análogo*.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. El error fue del 1%. La densidad óptica del cultivo se determinó cada hora a 595 nm durante 8 horas de incubación.

Las curvas de crecimiento bacteriano se dividen en cuatro fases: fase de latencia, donde las células bacterianas aumentan de tamaño para comenzar la división celular; la fase logarítmica, donde las células doblan su población a un ritmo constante y exponencial; la fase estacionaria, donde algunas células mueren y otras siguen creciendo y dividiéndose, por lo tanto no hay aumento o disminución en el número de células; y la fase de muerte, donde la velocidad de muerte celular es cada vez mayor a medida que transcurre el tiempo [206].

Se ha determinado que las cargas positivas son esenciales para la atracción electrostática inicial entre los PAMs y la membrana bacteriana. A su vez, se ha demostrado que esta propiedad está correlacionada con el aumento de la actividad antimicrobiana en los péptidos [207-211]. La presencia de aminoácidos como arginina y lisina es fundamental para aumentar la carga neta del péptido y por ende su actividad antimicrobiana [212]. La arginina, por ejemplo, por su carga positiva de la cadena lateral provee un medio efectivo para atraer los péptidos hacia la membrana, facilitando las interacciones iónicas con superficies cargadas negativamente, tales como lipopolisacáridos (LPS), ácido teicoico o fosfolípidos presentes en la membrana de las bacterias Gram negativas como *E. coli* O157:H7. Otro aminoácido importante en la actividad de un PAM es el triptófano, el cual se encuentra presente en el extremo N-terminal del análogo 2. El Trp presenta una nube electrónica π en el anillo aromático Indol, que da lugar a un momento cuadrupolar significativo en la medida en que se introduce más en el núcleo de hidrocarburos presentes en la bicapa lipídica, lo cual interrumpe las interacciones hidrofóbicas altamente favorable de las cadenas de acil-lípidos [213]. Por ejemplo, una simulación del péptido Dermaseptina S3 muestra la inserción del residuo de Trp por la región N-terminal penetrando en la capa interfacial de la membrana. Otras simulaciones de pentapéptidos muestran que el residuo de Trp puede asociarse con las cargas positivas de las cabezas de grupos de colina de la bicapa lipídica [214]. La adición de una secuencia GKLI en el extremo N-terminal de los análogos 1 y 3 pudo haber minimizado el efecto del residuo Trp por impedimento estérico y en consecuencia haber disminuido la actividad respecto al análogo 2 [215].

Adicionalmente en la tabla 9 se registran los valores de las CMI al 50, 90 y 99% y la CMB de cada péptido. El análogo 3 fue el siguiente péptido- después del análogo 2- en presentar la mayor actividad antibacteriana inhibiendo el 90% de crecimiento de *E. coli* O157:H7 a una concentración de 60 μ M. Para este porcentaje de inhibición la LampB, LampH, el análogo 1 y el análogo de LFampH

siguieron presentando CMI mayores a 100 μM .

Tabla 9. Actividad antimicrobiana de LFampB, LFampH y sus derivados sobre *E. coli* O157:H7.

Peptide	Actividad antimicrobiana sobre <i>E. coli</i> O157:H7			
	CMI ₅₀ (μM) \pm DS	CMI ₉₀ (μM) \pm DS	CMI ₉₉ (μM) \pm DS	CMB (μM)
LFampB	50 \pm 0.2	>100	>100	>100
Analogue 1	25 \pm 0.3	>100	>100	>100
Analogue 2	25 \pm 0.5	50 \pm 0.5	100 \pm 0.2	100 \pm 0.2
Analogue 3	25 \pm 0.4	60 \pm 0.2	>100	>100
LFampH	100 \pm 0.3	>100	>100	>100
Análogo	50 \pm 0.7	>100	>100	>100

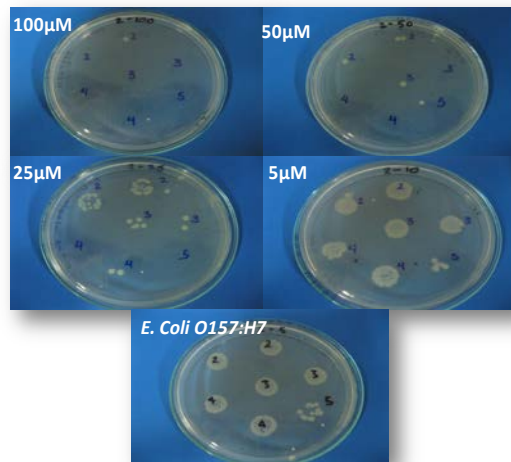
Los análogos 1, 2 y 3 presentaron una actividad antimicrobiana frente a *E. coli* O157:H7 mayor que la LFampB, inhibiendo el 50% de crecimiento microbiana con una concentración de 25 μM (CMI₅₀). De la misma manera, el análogo de LFampH presentó una actividad mayor (50 μM) que la LFampH. Estos resultados son similares a los documentados por varios autores, en los que la modificación estructural de un PAM natural o sintético se constituye como una posible alternativa en el diseño de nuevos agentes terapéuticos [20, 28,216-220].

La LFamp fue tomada como péptido modelo no sólo porque presentaba actividad antimicrobiana, sino por los parámetros estructurales como hidrofobicidad, momento hidrofóbico, estructura anfifílica, y un ángulo subtendido por un dominio helicoidal hidrofóbico, el cual es comparable a otros péptidos antibacterianos [65, 67, 221]. La LFampB presentó una CMI de 50 μM . Estos resultados fueron acordes con la actividad de LFampB encontrada por Van der Kraan y col. sobre la cepa de *E. coli* O157:H7 [11]. La LFampH fue el péptido menos activo sobre *E. coli* O157:H7, presentando una CMI de 100 μM .

En relación con la evaluación de la CMB sobre *E. coli* O157:H7, el análogo 2 fue el péptido que presentó mayor actividad a una concentración de 100 μM . En la figura

34, se presentan los resultados obtenidos. Los péptidos de LFampB, el análogo 1 y 3, la LFampH y su derivado presentaron una CMB mayor a 100 μM .

Figura 34. Efecto bactericida de la concentración del análogo 2 sobre *E. coli* O157:H7.



Nota. *E. coli* O157:H7 fue utilizada como control positivo.

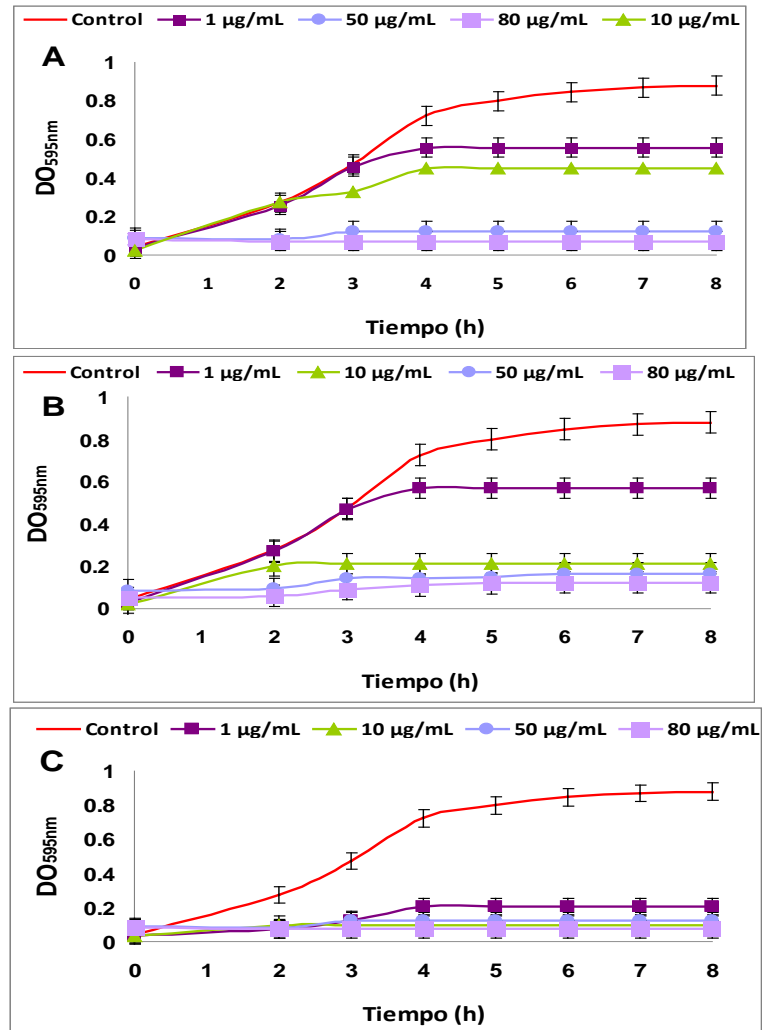
Adicionalmente, la actividad antimicrobiana de la LFampB, LFampH y sus derivados se puede atribuir a que presentan una estructura secundaria α -hélice, la cual ha sido ampliamente documentada en la relación estructura-actividad en PAMs [29, 31, 222]. En el diagrama de helicidad (figura 35) se observa la distribución de los residuos hidrofóbicos e hidrofílicos de los aminoácidos presentes en cada uno de los péptidos mostrando su naturaleza anfipática.

4.7.2 Actividad antimicrobiana de las AgNPs

4.7.2.1 Efecto de la naturaleza del agente precursor en la actividad antimicrobiana. Las AgNPs que presentaron la mayor actividad sobre *E. coli* O157:H7 por el método de microdilución en caldo para cada precursor se

Los residuos hidrofílicos se presentan como círculos, los residuos hidrofóbicos como cuadrados, posiblemente con carga negativa en forma de triángulos, y, potencialmente, de carga positiva como pentágonos.

Figura 36. Efecto de la naturaleza del precursor de plata en la actividad antimicrobiana de las AgNPs sobre *E. coli* O157:H7..



Nota. A) **AgClO₄**, B) **AgNO₃** C) **AgBF₄**, NaBH₄/Precursor=3. Todas las síntesis fueron estabilizadas con PVA

Las AgNPs que presentaron la mayor actividad antimicrobiana fueron las AgNPs provenientes del precursor AgBF_4 , seguido del precursor AgNO_3 y AgClO_4 . El efecto del agente precursor en la actividad antimicrobiana está relacionado con la tamaño y carga de la AgNP.

Ha sido ampliamente publicado que el efecto antibacteriano de las AgNPs depende, entre otros factores, del tamaño de las mismas [223-226]. Por tanto se ha establecido que las nanopartículas de tamaños más pequeños tienen mayor superficie disponible para la interacción con la superficie de la membrana, lo que podría generar una alteración de algunas funciones primarias como la permeabilidad y la respiración [227].

La formación del tamaño de partícula se puede relacionar con su velocidad de formación. Las AgNPs provenientes del precursor AgBF_4 fueron más pequeñas debido a que su velocidad de formación es más rápida, esto se puede atribuir a el hecho que el anión tetrafluoroborato proveniente del precursor AgBF_4 (BF_4^- anión tetrafluoroborato) por su tamaño, no produce un impedimento estérico entre el agente reductor/iones plata, permitiendo la formación de muchos más átomos de plata reducidos que en el caso de los precursores AgClO_4 y AgNO_3 .

Otro factor que influye significativamente sobre las propiedades antibacterianas de las AgNPs es la carga superficial. Existen publicaciones en la literatura que muestran que la atracción electrostática entre la carga negativa de la membrana exterior de la bacteria y la carga positiva de las nanopartículas es crucial para la actividad antibacteriana [228-230]. La carga global de las células bacterianas es negativa a valores de pH biológicos, lo cual se debe al exceso en número de grupos carboxílicos, y además, a la presencia de residuos de varios aminoácidos (especialmente arginina) cuyas cargas no están neutralizadas por residuos ácidos [231]. Como se puede observar en la figura 36, los resultados de actividad antibacteriana guardan esta misma relación, pues las AgNPs sintetizadas a partir

del precursor de AgBF_4 presentaron una carga superficial más positiva, y fueron las AgNPs que exhibieron el mayor potencial tanto inhibitorio frente a la cepa de interés.

Los resultados mostraron que al aumentar la concentración de las AgNPs provenientes de cada precursor (AgBF_4 , AgNO_3 y AgClO_4) se disminuyó el crecimiento de *E. coli* O157:H7. Por lo tanto, a una concentración de 80 $\mu\text{g/mL}$ las AgNPs provenientes de cada precursor inhibieron el crecimiento bacteriano en un 100%, seguido de las concentraciones de 50, 10 y 1 $\mu\text{g/mL}$, que inhibieron el crecimiento a diferentes porcentajes según el agente precursor usado. A una concentración de 50, 10 y 1 $\mu\text{g/mL}$ las AgNPs provenientes del AgBF_4 inhibieron el crecimiento de un 100 a 80%, seguido de las AgNPs provenientes del AgNO_3 de un 30 a 80% y por último de las nanopartículas provenientes del AgClO_4 inhibiendo el crecimiento entre un 20 a 80%.

Las AgNPs que exhibieron las mejores actividades para cada precursor fueron: las AgNPs sintetizadas a partir de una concentración 3mM de AgBF_4 y una relación de agente reductor/precursor=3 presentando un efecto inhibitorio a 1 $\mu\text{g/mL}$. Le siguieron las AgNPs sintetizadas a partir de AgNO_3 a una misma concentración de precursor y relación agente reductor/ precursor inhibiendo un 99% del crecimiento a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, y por último de las AgNPs sintetizadas a partir de una concentración 3 mM de AgClO_4 con una relación agente reductor/ precursor=1 (50 $\mu\text{g/mL}$).

En la literatura aún no se ha documentado que las AgNPs provenientes de los precursores de AgClO_4 y AgBF_4 hayan sido sensibles a un amplio espectro de microorganismos. Por su parte, se ha demostrado que las AgNPs sintetizadas a partir de AgNO_3 usando el NaBH_4 son sensibles contra diferentes microorganismos [232]. Se utilizó un rango de concentración de AgNPs entre 0.25 y 100 $\mu\text{g/mL}$ y 3 mM del precursor AgNO_3 , los cuales son valores mayores a los

utilizados por otros autores. En nuestro caso se presentó una inhibición del 100% de crecimiento de *E. coli* O157:H7.

Para el caso de determinación de la actividad en placas de agar por el método de difusión de disco, se observaron halos de inhibición muy similares con diámetros en un rango de 13 a 13.5 mm para las AgNPs sintetizadas a partir del AgClO_4 , AgNO_3 y AgBF_4 , respectivamente. Estos resultados muestran correlación con los obtenidos por el método de microdilución en caldo (Tabla 10), siendo más sensible éste último. Debido a que los halos de inhibición fueron medidos sobre las placas de agar con una precisión de 1mm de resolución, existe la posibilidad de errores relativos a la medida. Sin embargo, el método ilustra el efecto potencial de las nanopartículas sobre la cepa de estudio. Ciertos estudios de actividad antibacteriana de AgNPs han empleado estos dos métodos, encontrando resultados similares a los señalados en el presente estudio [233].

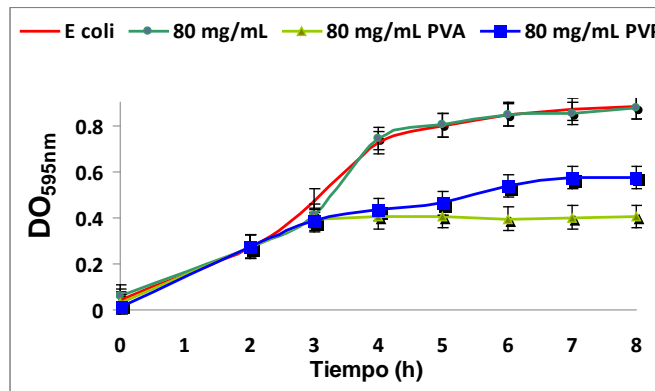
Al comparar los dos métodos, se puede inferir que la mayor sensibilidad del método de microdilución se debe a que en medio líquido existe una mayor interacción entre las células bacterianas y las AgNPs teniendo en cuenta que el ensayo se lleva a cabo a una agitación constante de 200 rpm. Mientras que en los estudios con placas de agar, la baja difusión en el medio sólido dificulta la interacción entre las AgNPs y las bacterias.

Tabla 10. CMI de las AgNPs sobre *E. coli* O157:H7 mediante el método de microdilución en caldo y difusión de disco para cada precursor.

Precursor	Método en caldo	Método de difusión de disco
	CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
3mM- AgNO_3 PVA	5	10
3mM- AgBF_4 PVA	1	1
3mM- AgClO_4 PVA	10	10

4.7.2.2 Efecto de la naturaleza del agente estabilizante en la actividad antimicrobiana. Los resultados demuestran que las AgNPs estabilizadas con PVA exhibieron el mayor efecto inhibitorio contra *E. coli* O157:H7. Se determinó que la estabilidad de los coloides está directamente relacionada con la actividad antibacteriana, ya que los coloides de Ag formados en presencia de PVA como agente estabilizante no sedimentaron y conservaron su color durante más tiempo. Adicionalmente, se deduce que los agentes estabilizantes no inducen un efecto estérico en la actividad antimicrobiana de las AgNPs sobre el microorganismo [234]. A manera de ejemplo para evaluar este efecto se tomó la síntesis de AgNPs a partir de una concentración 1mM de AgNO_3 y una relación de $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3=3$ con y sin agentes estabilizantes (PVA y PVP) (Ver Figura 37).

Figura 37. Efecto de la naturaleza del agente estabilizante en la actividad antimicrobiana de las AgNPs sobre *E. coli* O157:H7. AgNPs sintetizadas a partir de una concentración 1mM de AgNO_3 a una relación de $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3=3$.



Estos resultados coinciden con los publicados por Wang, Tiwari y col. [235,236] sintetizaron AgNPs usando el Nitrato de plata, glucosa e hidróxido de sodio como precursor, agente reductor y catalizador, respectivamente, y compararon el efecto estabilizante del PVA y PVP como agentes estabilizantes determinando que las AgNPs fueron más estables usando el PVA como agente estabilizante.

Los resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de difusión de disco fueron acordes con los determinados por el método de microdilución en caldo para evaluar el efecto del agente estabilizante sobre la actividad antimicrobiana.

En la tabla 11 se presentan los valores de la CMI de la AgNPs sintetizada a partir de una concentración 1mM de AgNO₃ a una relación de NaBH₄/AgNO₃=3 evaluando el efecto del estabilizante.

Tabla 11. Concentración mínima inhibitoria de las AgNPs sobre *E. coli* O157:H7 mediante diferentes metodologías evaluando el efecto del agente estabilizante.

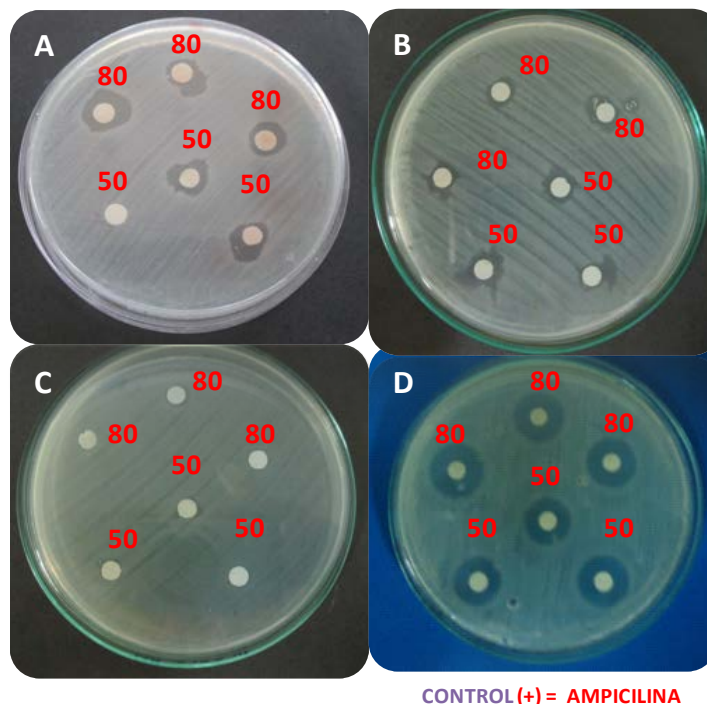
1mM-AgNO ₃ NaBH ₄ /AgNO ₃ =3	Método de difusión de disco	
	Método en caldo	
CMI (µg/mL)		
Sin agente estabilizante	50	50
PVA	10	10
PVP	20	20

Según los datos de la tabla 11, se obtuvieron iguales CMI mediante el método de microdilución en caldo y difusión de disco, lo cual indica que se presentó la misma sensibilidad de las AgNPs sobre *E. coli* O157:H7 a partir de una concentración 1mM de AgNO₃ a una relación de NaBH₄/AgNO₃=3 con y sin PVA. En este caso, las dos metodologías son sensibles y reproducibles para determinar la CMI.

En la figura 38 se presentan los resultados de la actividad antimicrobiana de las AgNPs sintetizadas a partir de una concentración 1mM de AgNO₃ a una relación de NaBH₄/AgNO₃=3 evaluando el efecto del estabilizante por el método de difusión de disco. A una concentración de 80 µg/mL sólo las AgNPs estabilizadas

con PVA presentaron diámetros de inhibición sobre *E. coli* O157:H7 comparables a los del control de ampicilina (12.5 mm), seguido de las AgNPs estabilizadas con PVP (11 mm) y de las AgNPs sin agente estabilizante (No se presentó inhibición).

Figura 38. Fotografías representativas de la actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata a una concentración de 80 y 50 µg/mL, respectivamente.



Nota. AgNPs sintetizadas a partir de una concentración 1mM de AgNO_3 a una relación de $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3=3$ evaluando el efecto del estabilizante A) PVA, B) PVP, C) sin agente estabilizante y D) control positivo de Ampicilina.

4.7.2.3 Efecto de la naturaleza de la relación agente reductor/ precursor de plata en la actividad antimicrobiana. Por otra parte, se evaluó el efecto de la relación agente reductor/ precursor de plata en la actividad antimicrobiana sobre *E. coli* O157:H7 ($\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$, $\text{NaBH}_4/\text{AgClO}_4$ y $\text{NaBH}_4/\text{AgBF}_4$). Los resultados se pueden observar en la tabla 12, donde se especifican todas las actividades antibacterianas obtenidas.

Tabla 12. Resumen de los valores de CMI y CMB obtenidos para todas las metodologías de síntesis de AgNPs frente a *E. coli* O157:H7.

Precursor	Síntesis	CMI ₉₉ y CMB (µg/mL) de las AgNPs contra la <i>E. coli</i> O157:H7					
		NaBH ₄ /Precursor=1		NaBH ₄ /Precursor=2		NaBH ₄ /Precursor=3	
AgNO ₃	1mM	50.0	>100	80.0	>100	50.0	>100
	2mM	80.0	>100	50.0	>100	20.0	>100
	3mM	80.0	>100	50.0	>100	50.0	>100
	1mM PVA	20.0	>100	20.0	>100	10.0	>100
	2mM PVA	20.0	>100	20.0	>100	10.0	>100
	3mM PVA	50.0	100.0	20.0	50.0	5.0	5.0
	1mM PVP	50.0	>100	20.0	>100	20.0	>100
	2mM PVP	50.0	>100	20.0	>100	20.0	20.0
	3mM PVP	50.0	>100	20.0	50.0	20.0	20.0
AgBF ₄	1mM	80.0	>100	50.0	>100	20.0	>100
	2mM	80.0	>100	50.0	>100	20.0	>100
	3mM	50.0	>100	50.0	>100	50.0	>100
	1mM PVA	50.0	80.0	10.0	50.0	10.0	10.0
	2mM PVA	50.0	80.0	10.0	50.0	10.0	10.0
	3mM PVA	10.0	20.0	10.0	10.0	1.0	1.0
	1mM PVP	50.0	>100	20.0	>100	10.0	>100
	2mM PVP	20.0	>100	20.0	>100	10.0	>100
	3mM PVP	20.0	>100	10.0	10.0	10.0	10.0
AgCLO ₄	1mM	100.0	>100	100.0	>100	100.0	>100
	2mM	100.0	>100	100.0	>100	100.0	>100
	3mM	100.0	>100	80.0	>100	80.0	>100
	1mM PVA	80.0	>100	50.0	>100	10.0	>100
	2mM PVA	80.0	>100	80.0	>100	10.0	>100
	3mM PVA	80.0	100.0	80.0	50.0	10.0	80.0
	1mM PVP	50.0	>100	20.0	>100	10.0	>100
	2mM PVP	20.0	>100	20.0	>100	80.0	>100
	3mM PVP	20.0	>100	10.0	50.0	80.0	25.0

En estos ensayos, se determinó que al aumentar la relación agente reductor/ precursor la inhibición también aumentó. Estos resultados pueden deberse a que una mayor concentración de agente reductor permite un mayor rendimiento en la síntesis de AgNPs. Estos resultados se encuentran acordes con los publicados por Solomon y col [237] quienes al aumentar la relación la relación reductor/precursor hasta un valor de 2, los coloides presentaron una mayor estabilidad y una mayor actividad.

En la tabla 13, se muestran los resultados de las CMI que se obtuvieron mediante el método de difusión de disco. Cabe resaltar que éstas concentraciones son menores ya que éste método es cualitativo, y no se puede dar con precisión el porcentaje de inhibición cómo se puede realizar por el método en caldo.

Tabla 13. Resumen de los valores de la CMI obtenidos para todas las metodologías de síntesis de AgNPs sobre *E. coli* O157: H7 por el método de difusión de disco.

Precursor	Síntesis	CMI ($\mu\text{g/mL}$) de las AgNPs sobre <i>E. coli</i> O157:H7		
		NaBH ₄ /Precursor=1	NaBH ₄ /Precursor=2	NaBH ₄ /Precursor=3
AgNO ₃	1mM	50	50	10
	2mM	50	20	20
	3mM	50	10	5
	1mM PVA	10	5	10
	2mM PVA	20	10	10
	3mM PVA	10	20	10
	1mM PVP	10	20	10
	2mM PVP	20	20	10
	3mM PVP	20	10	5
AgBF ₄	1mM	5	5	20
	2mM	5	5	20
	3mM	5	1	20
	1mM PVA	10	5	1
	2mM PVA	5	1	1
	3mM PVA	10	10	1
	1mM PVP	20	10	5
	2mM PVP	20	20	10
	3mM PVP	20	10	10
AgClO ₄	1mM	50	20	20
	2mM	20	20	10
	3mM	10	10	10
	1mM PVA	10	5	10
	2mM PVA	20	20	10
	3mM PVA	20	10	10
	1mM PVP	50	20	10
	2mM PVP	20	20	10
	3mM PVP	20	10	10

Adicionalmente, a partir de concentraciones más bajas, alrededor de 20 µg/mL a 10 µg/mL los halos de inhibición tuvieron diámetros aproximadamente de 6 y 7 mm. Estos resultados fueron acordes con los reportados por Sondi y col [90] y por Kim y col. [232]. Sin embargo, se obtuvieron valores de CMI más bajas que estos reportes, o que el reporte reciente para la cepa de *E. coli* con el serotipo O157:H7 [141].

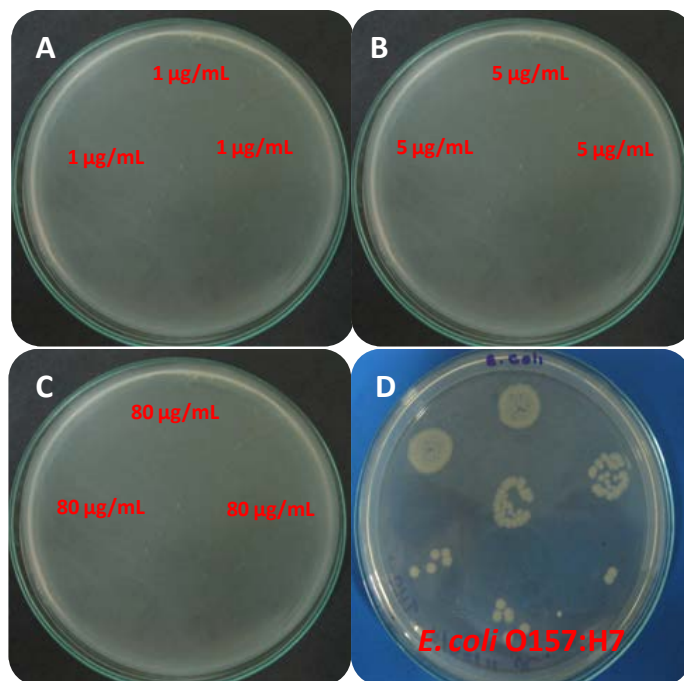
En general los valores de CMI para las diferentes AgNPs sintetizadas presentaron la misma tendencia que las obtenidas por el método en caldo, siendo las AgNPs provenientes del precursor AgBF_4 las que presentaron la mayor actividad, seguidas del AgNO_3 y finalmente de las AgNPs provenientes del precursor AgClO_4 .

Por último, las AgNPs presentaron una buena difusión, lo que las convierte en candidatos promisorios como agentes antimicrobianos

En general, las AgNPs sintetizadas presentaron un efecto bacteriostático, pero no bactericida, ya que se observó un crecimiento bacteriano en las placas de agar BHI.

La AgNP que presentó el mayor efecto bactericida fue la sintetizada a partir de una concentración 3mM de AgBF_4 estabilizada con PVA y a una relación reductor/precursor=3, obteniendo una concentración mínima bactericida (CMB) de 1 µg/mL, seguido de las AgNPs sintetizadas a partir del precursor de AgNO_3 y AgClO_4 que presentaron una CMB de 5 µg/mL y 80 µg/mL, respectivamente. Estos resultados guardaron la misma relación que el efecto inhibitorio. En la figura 39 A, B y C se puede observar el efecto bactericida de las AgNPs sobre *E. coli* O157:H7y en la figura 39 D se observa el control positivo.

Figura 39. Concentración mínima bactericida de las AgNPs sobre *E. coli* O157:H7 para cada precursor.



Nota. A) AgBF_4 , B) AgNO_3 C) AgClO_4 , $\text{NaBH}_4/\text{Precursor}=3$ y D) Control positivo. Todas las síntesis fueron estabilizadas con PVA.

4.7.3 Actividad antimicrobiana de las AgNPs-LFamp. En los ensayos de actividad antimicrobiana, se determinó que la funcionalización de los PAMs de LFampB, LFampH y sus análogos con las AgNPs presentaron un efecto sinérgico y una potente actividad antimicrobiana frente a *E. coli* O157:H7.

En la tabla 14, se presentan y comparan los resultados de la CMI al 99% de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en presencia de los péptidos de LFampB, LFampH, análogos, AgNPs y funcionalizados de PAMs-AgNPs.

Tabla 14. Actividad antimicrobiana de los PAM funcionalizados con las AgNPs. sobre *E. coli* O157:H7.

Péptido antimicrobiano	CMI _{99%} de los PAMs funcionalizados con AgNPs sobre <i>E. coli</i> O157:H7				
	PAM- Ag : AgNO ₃	PAM-Ag : AgClO ₄	PAM- Ag : AgBF ₄	PAM sin AgNPs	Ag sin PAM
LFampB	25 ± 0.4 µM	50 ± 0.1 µM	25 ± 0.2 µM	>100 µM	—
Análogo 1	10 ± 0.5µM	25 ±0.5 µM	5 ± 0.25 µM	>100 µM	—
Análogo 2	5 ±0.3 µM	10 ±0.2 µM	1 ± 0.7 µM	100±0.2 µM	—
Análogo 3	10 ± 0.25 µM	25 ±0.3 µM	5 ± 0.5 µM	>100 µM	—
LFampH	25 ± 0.5 µM	50 ± 0.5µM	25 ± 0.3 µM	>100 µM	—
Análogo	10 ± 0.7 µM	50 ± 0.7 µM	5 ± 0.2 µM	>100 µM	—
AgNPs (AgNO ₃)	—	—	—	—	46.3 ± 0.1 µM o 5 µg/mL
AgNPs (AgClO ₄)	—	—	—	—	92.7 ± 0.3 µM o 10 µg/mL
AgNPs (AgBF ₄)	—	—	—	—	9.27 ± 0.25 µM o 1 µg/mL

En la tabla 14 podemos observar que los bioconjugados PAM-AgNPs presentan un efecto antibacteriano mucho mayor sobre *E. coli* O157:H7 que el efecto antibacteriano que se presenta cuando tenemos el PAM o la AgNPs de forma individual. Los bioconjugados formados a partir del análogo 2 de LFampB con las AgNPs provenientes de los diferentes precursores de plata fueron los que presentaron los resultados más relevantes de actividad antimicrobiana.

El bioconjugado que presentó la mayor actividad antimicrobiana fue en el cual se autoensambló el análogo 2 de LFampB con la AgNPs derivada del precursor AgBF₄ con un valor de 1 ± 0.7µM. Cabe resaltar que el análogo 2 y la AgNP proveniente del precursor de AgBF₄ fue el que presentó la mayor actividad cuando sobre *E. coli* O157:H7 de forma individual con una CMI de 100 y 9.27 µM. Es por ello que la formación de estos conjugados con AgNPs mejoró la actividad antimicrobiana del péptido 100 veces.

Adicionalmente los bioconjugados formados del análogo 2 con las AgNPs provenientes de los precursores de AgNO₃ y AgClO₄ presentaron una actividad antimicrobiana sobre *E. coli* O157:H7 de 5 ± 0.3 µM y 10 ± 0.2 µM, mejorando la actividad diez y cuatro veces más en el PAM, y en la AgNP cinco y diez veces más, respectivamente.

Por otra parte, los bioconjugados PAM-AgNPs formados a partir de los análogos de LFampB y LFampH presentaron una mayor actividad que los bioconjugados PAM-AgNPs formados a partir de la LFampB y LFampH. Estos resultados presentaron la misma relación de actividad antimicrobiana sobre *E. coli* O157:H7 que cuando se probaron los péptidos de manera individual. En este contexto, se puede relacionar que la formación del bioconjugado no afecta las propiedades fisicoquímicas, ni produce una distorsión de la estructura secundaria del PAM. Adicionalmente, la secuencia de los aminoácidos en el péptido tampoco afectó la formación del bioconjugado, ni su acción sobre *E. coli* O157:H7, porque las interacciones intercadena (de los AA) pueden afectar principalmente el autoensamble por efectos estéricos cerca de la superficie de la AgNPs.

Los bioconjugados formados a partir de las AgNPs provenientes del precursor AgBF_4 presentaron un efecto antibacteriano mayor que los bioconjugados formados a partir de las AgNP provenientes de los precursores AgNO_3 y AgClO_4 . Esto posiblemente a que las AgNPs provenientes del precursor AgBF_4 por tener un tamaño menor que las AgNPs provenientes de AgNO_3 y AgClO_4 , presentan una mayor área superficial, de ahí que el número de moléculas de PAM que se pueda autoensamblar es mucho mayor. Adicionalmente, se produciría un efecto estérico en la formación del bioconjugado PAM-AgNPs menor.

El aumento en la actividad antimicrobiana de los bioconjugados PAM-AgNPs se puede asociar a las ventajas de la gran área superficial que presentan las AgNPs. Por ejemplo, las ventajas de usar nanopartículas como portadoras de biomoléculas incluye la posibilidad de conectar varios (cientos o miles) de PAM por nanopartícula, permitiendo optimizar el rendimiento de nuevos materiales nanoestructurados. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros investigadores [155, 163, 170]

Adicionalmente, aunque aún no se conoce de forma exacta el mecanismo de

acción de éstos bioconjugados, Orlov y col. [238] propusieron que su acción antimicrobiana se relacionaba con su capacidad de inhibir procesos metabólicos en las células bacterianas. El bioconjugado AgNP-PAM no ejerce una acción membranolítica inherente como la mayoría de los PAMs. Dado que la destrucción de la membrana es la base de sus efectos tóxicos, su conjugación con las nanopartículas pueden ser considerados como un enfoque prometedor para evaluación como antibióticos naturales con características óptimas. La actividad biológica de conjugados de PAM-AgNPs puede ser el objeto de estudio para investigaciones posteriores.

En la tabla 15, se muestran los resultados de las CMI's que se obtuvieron mediante el método de difusión de disco de los bioconjugados PAM-AgNPs sobre *E. coli* O157:H7. Los valores de CMI's obtenidos mediante esta metodología fueron mayores o iguales que las que se obtuvieron por el método en caldo.

Al igual que el método en caldo, el bioconjugado que presentó la mayor actividad antibacteriana fue cuando se autoensambló el análogo 2 de LFampB con la AgNPs derivada del precursor AgBF₄, alcanzando un valor de CMI de $5 \pm 0.7\mu\text{M}$. La actividad antimicrobiana sobre *E. coli* O157:H7 fue mejorada dos veces respecto a la AgNPs proveniente del precursor AgBF₄. De la misma manera, se presentó un efecto sinérgico de los bioconjugados de PAM-AgNPs aumentando la actividad antimicrobiana sobre *E. coli* O157:H7 comparada con los PAMs o las AgNPs cuando fueron probados de manera individual.

Tabla 15. Actividad antimicrobiana de los PAM funcionalizados con las AgNPs. sobre *E. coli* O157:H7 por difusión de disco.

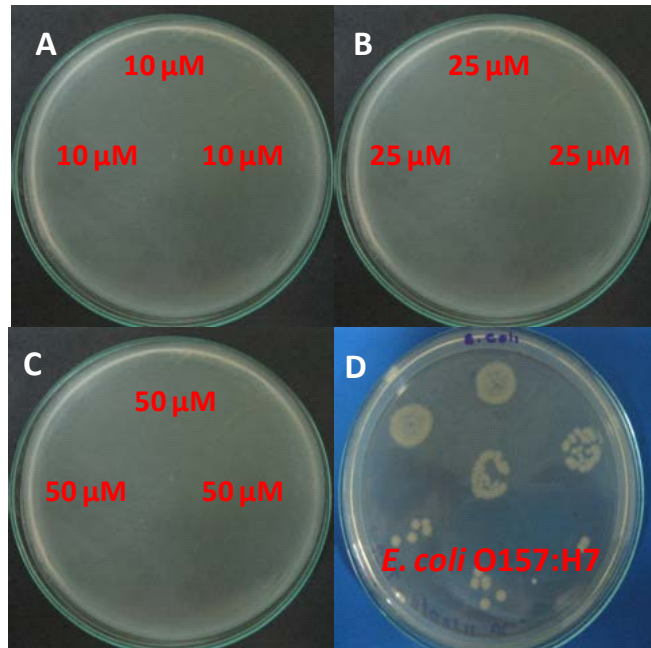
Péptido antimicrobiano	CMI _{99%} de los PAMs funcionalizados con AgNPs sobre <i>E. coli</i> O157:H7				
	PAM- Ag : AgNO ₃	PAM-Ag : AgClO ₄	PAM- Ag : AgBF ₄	PAM sin AgNPs	Ag sin PAM
LFampB	50 ± 0.4 µM	100 ± 0.1 µM	50 ± 0.2 µM	Inactivo	
Análogo 1	25 ± 0.5µM	25 ±0.5 µM	5 ± 0.25 µM	Inactivo	
Análogo 2	5 ±0.3 µM	10 ±0.2 µM	5 ± 0.7 µM	Inactivo	
Análogo 3	10 ± 0.25 µM	25 ±0.3 µM	5 ± 0.5 µM	Inactivo	
LFampH	50 ± 0.5 µM	100 ± 0.5µM	50 ± 0.3 µM	Inactivo	
Análogo	25 ± 0.7 µM	100 ± 0.7 µM	25 ± 0.2 µM	Inactivo	
AgNPs (AgNO ₃)					92.7 ± 0.3 µM o 10 µg/mL
AgNPs (AgClO ₄)					92.7 ± 0.3 µM o 10 µg/mL
AgNPs (AgBF ₄)					9.27 ± 0.25 µM o 1 µg/mL

En general los resultados obtenidos por pruebas de difusión de disco con bioconjugados PAM-AgNPs formados con las AgNPs presentaron la misma tendencia de inhibición de crecimiento microbiano que las de caldo, siendo las AgNPs provenientes del precursor AgBF₄ quienes presentaron la mayor actividad, seguidas del AgNO₃ y finalmente de las AgNPs provenientes del AgClO₄.

Por último, cabe resaltar que la formación de bioconjugados de PAMs-AgNPs mejoró notablemente el proceso de difusión de los PAMs, y por ende su actividad, ya que anteriormente habían sido inactivos por esta metodología, lo que las convierte en candidatos promisorios como agentes antimicrobianos.

Los bioconjugados formados a partir del análogo 2 de LFampB con las AgNPs provenientes de los diferentes precursores de plata fueron los que presentaron actividad bactericida sobre *E. coli* O157:H7. Los bioconjugados formados a partir del análogo 2 de LFampB con los precursores de plata AgBF₄, AgClO₄ y AgNO₃ presentaron una CMB de 10, 25 y 50 µM, respectivamente, mejorando la actividad diez, cuatro y dos veces respecto a los péptidos que presentaban una CMB de 100 µM. En la figura 40 se puede observar el efecto bactericida de los bioconjugados anál.2-AgNPs proveniente de los precursores AgBF₄, AgClO₄ y AgNO₃ que exhibieron la mayor CMB para cada precursor sobre *E. coli* O157:H7.

Figura 40. Concentración mínima bactericida de los bioconjugados Análogo 2-AgNPs sobre *E. coli* O157:H7 para cada precursor.



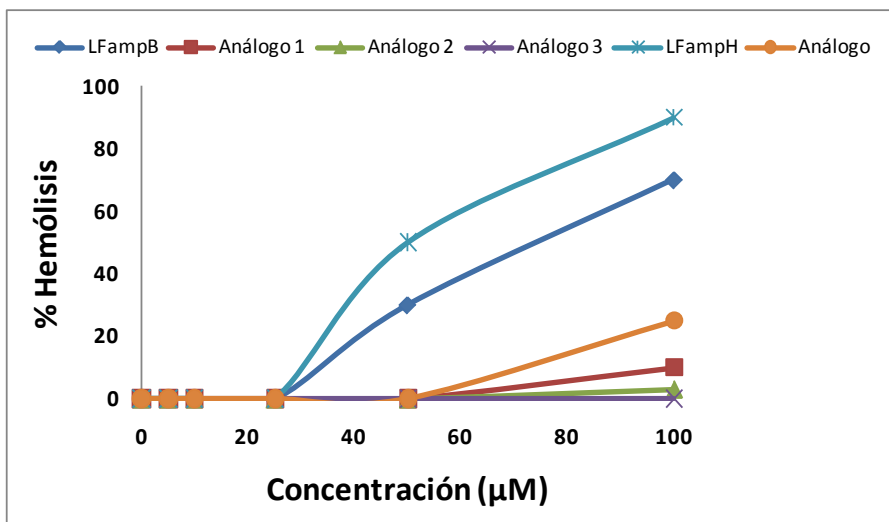
Nota. A) AgBF_4 , B) AgNO_3 C) AgClO_4 , $\text{NaBH}_4/\text{Precursor}=3$. Todas las síntesis fueron estabilizadas con PVA.

4.8 ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE LA LFampB, LFampH Y SUS ANÁLOGOS

La actividad hemolítica de la LFampB, LFampH y sus análogos aumentó a medida que se incrementó la concentración de los péptidos de LFampB, LFampH y sus análogos. El péptido que presentó el mayor porcentaje de actividad hemolítica fue la LFampB con un 70% a una concentración de 100 μM . Estos resultados fueron acordes con los previamente determinados por otros investigadores [32] y fueron tomados como control positivo, mientras que los análogos 1, 2 y 3 de la LFampB exhibieron a esta misma concentración 10, 3 y 1% de hemólisis, respectivamente (Figura 41). Estos valores de hemólisis son aceptables según la literatura (<20%) [239]. El análogo de LFampH presentó un 25%, mientras que LFampH presentó una hemólisis del 90%, hemólisis no aceptable

De acuerdo con los resultados obtenidos de la actividad hemolítica de la LFampB, LFampH y sus análogos, los análogos sintetizados son candidatos potenciales como agentes antimicrobianos.

Figura 41. Actividad Hemolítica de *E. coli* O157:H7 en presencia de péptidos antimicrobianos.



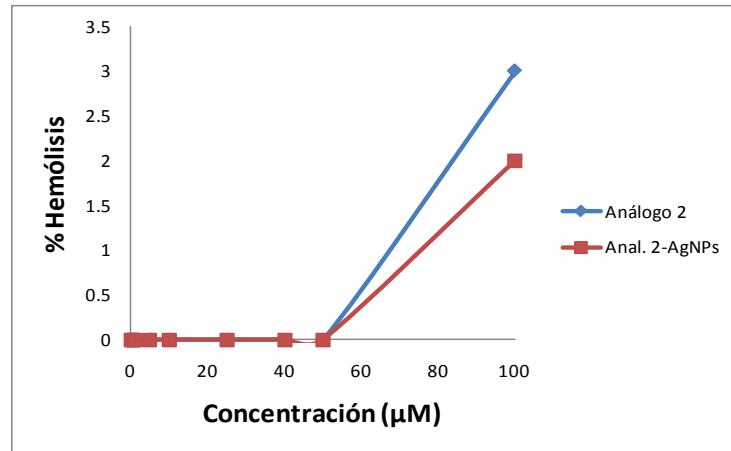
Nota. a) LFampB, b) Análogo 1, c) Análogo 2, d) Análogo 3, e) LFampH y f) Análogo. Eritrocitos humanos se incubaron durante 1 hora a 37 C con diluciones seriadas de péptidos LFampB, LFampH y sus derivados. La Hemólisis se determinó midiendo la absorbancia de hemoglobina a 450 nm en el sobrenadante presenta como hemólisis porcentaje obtenido con el 1% de Tween 20.

4.9 ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL BIOCONJUGADO PAM-AgNPs PROVENIENTE PRECURSOR AgBF₄.

Los resultados indicaron que la actividad hemolítica aumenta a medida que aumenta la concentración del bioconjugado Anal.2-AgNPs (figura 42). El análogo 2 de LFampB sin funcionalizar fue tomado como control. Los resultados de la actividad hemolítica del Análogo 2 sin funcionalizar y funcionalizado con la AgNP fueron muy similares, determinando un porcentaje de hemólisis de 3 y 2%, respectivamente, a una concentración de 100 μM, valores aceptables según la

literatura [239]. En este contexto, la funcionalización del PAM con la AgNPs favoreció una disminución en el porcentaje de hemólisis en un 1% con respecto al péptido libre (análogo 2).

Figura 42. Actividad hemolítica del bioconjugado Anál.2-AgNPs proveniente del precursor AgBF₄.



De acuerdo con los resultados obtenidos, el bioconjugado Anal.2-AgNPs es un candidato muy promisorio como agentes antibacteriano contra *E.coli* O157:H7.

5. CONCLUSIONES

Se logró la síntesis de péptidos análogos de LFampB y LFampH en fase sólida, con rendimientos del 95%.

Los péptidos análogos de LFampB y LFampH fueron dos veces más activos frente a *E. coli* O157:H7 que los péptidos originales. A su vez, el análogo 2 (**WKLLRKAQEKF~~G~~KNKSR**) presentó la mayor actividad antibacteriana inhibiendo el crecimiento en un 99 y 50 % una concentración mínima bactericida e inhibitoria de 100 y 25 μ M, respectivamente.

El aumento en la actividad antimicrobiana de los análogos 1 y 3 de LFampB sobre *E. coli* O157:H7 dependió de la adición de una secuencia GKLI la cual favoreció la estabilidad respecto al péptido original de la LFampB.

El estudio conformacional de la estructura secundaria de los péptidos de LFampB, LFampH y sus análogos demostraron que en un ambiente simulado de membrana son capaces de formar α -hélices anfipáticas, requisito indispensable para presentar actividad antimicrobiana.

Los péptidos análogos 1, 2 y 3 de LFampB, el análogo LFampH y el bioconjugado anal2-AgNPs presentaron un menor grado de hemólisis que los péptidos originales, aumentando la posibilidad de ser utilizados como agentes antimicrobianos contra diferentes enfermedades infecciosas y en especial las producidas por la *E. coli* O157:H7.

Mediante la técnica de reducción química se logró obtener nanopartículas homogéneas de forma esférica con tamaño promedio entre 15.82 y 20.62 nm a partir de diferentes precursores de plata.

Las AgNPs con mayor actividad antimicrobiana frente a *E. coli* 0157:H7 fueron las sintetizadas a partir de AgBF_4 (3mM), utilizando PVA como agente estabilizante y una relación de agente reductor/agente precursor de 3, alcanzando una CMI, CMB de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y estabilidad de 9 meses.

La funcionalización de los PAMs de la LFampB, LFampH y sus análogos con las AgNPs presentó un efecto sinérgico y un aumento en la actividad antimicrobiana frente a *E. coli* O157:H7 en comparación con la actividad antimicrobiana de la LFampB, LFampH y sus análogos o las AgNPs evaluados de forma individual.

Los bioconjugados formados a partir del análogo 2 de LFampB con las AgNPs provenientes de los diferentes precursores fueron los que presentaron las más altas actividades antimicrobianas.

El bioconjugado del análogo 2 de LFampB presentó la mayor actividad antimicrobiana frente a *E. coli* 0157:H7, alcanzando valores de $1 \pm 0.7 \mu\text{M}$ de CMI siendo hasta 9 y 100 veces mejor que la AgNP o el péptido sin conjugador respectivamente, y menores que los publicados en la literatura.

El método de microdilución en caldo fue más sensible que el método por difusión de disco (Kirby-bauer) para determinar la actividad antibacteriana de las AgNPs y los bioconjugados PAMs-AgNPs.

6. RECOMENDACIONES

Diseñar nuevos análogos de LFampB y LFampH intensificando la carga catiónica en el extremo C-terminal con Aa como Arginina o Lisina, eliminando la capa cap en su región N-terminal y ensayando actividad *in vitro* en *E. coli* O157:H7.

Sintetizar NPs de otros metales como Hierro (Fe), Oro (Au), Silicio (Si) u Óxido de Titanio (TiO₂) y autoensamblarlas con los PAMs producidos. Adicionalmente, evaluar su efecto antimicrobiano sobre *E. coli* O157:H7, comparar el efecto de cada NP metálica, evaluar actividad sobre diferentes líneas celulares y determinar su citotoxicidad.

Realizar el proceso de autoensamble *in situ* PAM-AgNP, en el cual el PAM reduce el precursor de plata. Determinar la actividad sobre *E. coli* O157:H7 para compararla con la metodología de autoensamble en la cual la AgNPs ha sido previamente formada.

Usar un marcador de fluorescencia en los bioconjugados PAM-AgNPs y determinar se mecanismo de acción o blanco celular mediante microscopía de fluorescencia.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Kolář M, Urbánek K, Látal, T. Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *Int J Antimicro Ag* 2001;17 (5):357–63.
- [2] Rai M, Yadav A. Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotech. Adv* 2009;27(1):76-83.
- [3] Panáček A, Kvítek L, Pucek R, Kolář M, Večeřová R, Pizúrová N, et al. Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J. Phys. Chem. B* 2006;110(33):16248-53.
- [4] Toke O. Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers Pept Sci* 2005;80(6):717–35.
- [5] Schabes-Retchkiman PS, Canizal G, Herrera-Becerra R, Zorrilla C, Liu HB, Ascencio JA. Biosynthesis and characterization of Ti/Ni bimetallic nanoparticles. *Opt. Mater.* 2006;29(1):95–99.
- [6] Gu H, Ho PL, Tong E, Wang L, Xu B. Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities. *Nano Lett* 2003;3(9):1261–3.
- [7] Ahmad Z, Pandey R, Sharma S, Khuller GK. Alginate nanoparticles as antituberculosis drug carriers: Formulation development, pharmacokinetics and therapeutic potential. *Ind J Chest Dis Allied Sci* 2006;48(3): 171-6.
- [8] Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatisky M. Synthetic therapeutic peptides: Science and market. *Drug Discovery Today* 2010;15(1-2): 40-56.

- [9]** Bisht GS, Rawat DS, Kumar A, Kumar R, Pasha S. Antimicrobial activity of rationally designed amino terminal modified peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2007;17(15), 4343-46.
- [10]** Brogden NK, Brogden KA. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals?. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38(3):217-25.
- [11]** Van Der Kraan MIA, Groenink J, Nazmi K, Veerman ECI, Bolscher JGM, Nieuw Amerongen AV. Lactoferrampin: A novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides* 2004;25(2):177-83.
- [12]** Van Der Kraan MIA, Nazmi K, Van't Hof W, Nieuw Amerongen AV, Veerman ECI, Bolscher JGM. Distinct bactericidal activities of bovine lactoferrin peptides LFampin 268-284 and LFampin 265-284: Asp-leu-ile makes a difference. *Biochem. Cell Biol.* 2006;84(3):358-62.
- [13]** Algar WR, Prasuhn DE, Stewart MH, Jennings TL, Blanco-Canosa JB, Dawson PE, et al. The controlled display of biomolecules on nanoparticles: A challenge suited to bioorthogonal chemistry. *Bioconjugate Chem.* 2011;22(5): 825-58.
- [14]** Sapsford KE, Tyner KM, Dair BJ, Deschamps JR, Medintz IL. Analyzing nanomaterial bioconjugates: A review of current and emerging purification and characterization techniques. *Anal. Chem.* 2011;83(12): 4453-88.
- [15]** Baltzer SA, Brown MH. Antimicrobial peptides-promising alternatives to conventional antibiotics. *J Mol Microb Biotech* 2011;20(4):228-35.

- [16]**. De Lucca AJ, Walsh TJ. Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother* 1999;43(1): 1–11.
- [17]** Theis T. Stahl U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004;61(4):437–55.
- [18]** Papo N and Shai Y. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005;62(7-8):784–90.
- [19]** Povey JF, Mark J, Howard MJ, Richard A, Williamson RA, Smales M. The effect of peptide glycation on local secondary structure. *J Struct Biol* 2008; 161(2): 151-61.
- [20]** Tossi A, Tarantino C, Romeo D. Design of synthetic antimicrobial peptides based on sequence analogy and amphipathicity. *Eur J Biochem* 1997;250(2):549–58.
- [21]** Brogden NK, Brogden KA. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals?. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;38(3):217-25.
- [22]** Arenas G, Guzmán F, Cárdenas C, Mercado L, Marshall SH. A novel antifungal peptide designed from the primary structure of a natural antimicrobial peptide purified from *Argopecten purpuratus* hemocytes. *Peptide* 2009;30(8):1405-11.
- [23]** Maróti G, Kereszt A, Kondorosi E, Mergaert P. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Res Microbiol* 2011;162(4):363-74.

- [24]** Lamberty M, Caille A, Landon C, Tassin-Moindrot S, Hetru C, Bulet P, Vovelle F. Solution structures of the antifungal heliomicin and a selected variant with both antibacterial and antifungal activities. *Biochem* 2001; 40(40):11995–12003.
- [25]** Haney F, Hunter H, Matsuzaki K, Vogel H. Solution NMR studies of amphibian antimicrobial peptides: Linking structure to function?. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1788(8):1639-55.
- [26]** Koradi R, Billeter M, Wuthrich K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph* 1996;14(1):29–32.
- [27]** Mor A. Peptide based antibiotics: a potential answer to raging antimicrobial resistance. *Drug Dev Res* 2000;50(3-4):440–7.
- [28]** Zelezetsky I, Tossi A. Alpha-helical antimicrobial peptides—Using a sequence template to guide structure–activity relationship studies. *Biochim Biophys Acta* 2006;1758(9): 1436 –49.
- [29]** Hocquellet A, Odaert B, Cabanne C, Noubhani A, Dieryck W, Joucla G, et al. Structure–activity relationship of human liver-expressed antimicrobial peptide 2. *Peptides* 2010; 31: 58-66.
- [30]** Porkony A, Almeida PF. Permeabilization of raft-containing lipid vesicles by delta-lysin: a mechanism for cell sensitivity to cytotoxic peptides. *Biochemistry* 2005; 44(27): 9538-44.
- [31]** Matsuzaki K, Sugishita K, Ishibe N, Ueha M, Nakata S, Miyajima K, et al. Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. *Biochemistry* 1998;37(34):11856–63.

[32] González-Chávez SA, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. Lactoferrin: Structure, function and applications. *Int J Antimicro Ag* 2009;33(4): 301.e1-301.e8.

[33] Lewis LA, Rohde K, Gipson M, Behrens B, Gray E, Toth SI, et al. Identification and molecular analysis of LbpBa, which encodes the two-component meningococcal lactoferrin receptor. *Infect. Immun.* 1998;66(6); 3017–23.

[34] van der Kraan MI, van Marle J, Nazmi K, Groenink J, van 't Hof W, Veerman EC, et al. Ultrastructural effects of antimicrobial peptides from bovine lactoferrin on the membranes of *Candida albicans* and *Escherichia coli*. *Peptides* 2005; 26(9):1537-42.

[35] Van der Kraan MIA, Van der Made C, Nami K, Van't Hof W, Groenink J, Veerman EC, et al. Effect of amino acid substitutions on the candidacidal activity of Lfampin 265-284. *Peptides* 2005; 26(11): 2093-2097.

[36] Van der Kraan MIA, Nazmi K, Teeken A, Groenink J, Van't Hof W, Veerman EC, et al. Lactoferrampin, an antimicrobial peptide of bovine lactoferrin, exerts its candidacidal activity by a cluster of positively charged residues at the C-terminus in combination with a helix-facilitating N-terminal part. *Biol. Chem.* 2005; 386(2): 137-42.

[37] Van der Kraan MIA, Nazmi K, Van't Hof W, Amerongen AVN, Veerman ECI, Bolscher JGM. Distinct bactericidal activities of bovine lactoferrin peptides Lfampin 268-284 and LFampin 265-284: Asp-Leu-Ile makes a difference. *Biochem Cell Biol.* 2006;84(3):358-62.

[38] Haney EF, Lau F, Vogel HJ. Solution structures and model membrane interactions of Lactoferrampin, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 2007; 1768(10): 2355-64.

[39] Haney EF, Nazmi K, Lau F, Bolscher JGM, Vogel HJ. Novel lactoferrampin antimicrobial peptides derived from human lactoferrin. *Biochimie* 2009; 91(1):141-54.

[40] Flores H, Canizalez A, Reyes M, Nazmi K, De la Garza M, Zazueta J, León N, Bolscher JGM. Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFcin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biomaterials* 2010; 23:569–578.

[41] Adão R, Nazmi K, Bolscher JGM, Bastos M. C- and N-truncated antimicrobial peptides from LFampin 265 – 284: Biophysical versus microbiology results. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011; 3(1): 60–69.

[42] Merrifield RB. Solid Phase Peptide Synthesis. Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 1963;85, 2149.

[43] Therton E, Sheppard RC. Solid Phase peptide synthesis: a practical approach 1989. Oxford, England.

[44] Chan WC, White PD. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. Oxford University Press, Oxford, UK 2000: 303–327.

[45] Fields G. Noble R. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acid. *Int J Pept Protein Res* 1990; 35(3):161–214.

[46] Barlos K; Chatzi O; Gatos D. Stavropoulos G. 2-Chlorotriyl chloride resin. Studies on anchoring of Fmoc-amino acids and peptide cleavage. *Int J Pept Protein Res.* 1991;37(6):513-20.

[47] Canne LE; Botti P; Simon RJ.; Chen Y; Dennis EA. Kent SB. Chemical protein synthesis by solid phase ligation of unprotected peptide segments. *J. Am. Chem. Soc* 1999;121(38): 8720-27.

[48] König W. Geiger R. A New Method for Synthesis of Peptides. Activation of Carboxyl Group with Dicyclohexylcarbodiimide using 1-Hydroxybenzotriazoles As additives. *Chem Ber.* 1970;103(3):788-98.

[49] Martínez J, Bali JP, Rodríguez M, Castro B, Magous R, Laur J. et al. Synthesis and Biological-Activities of some Pseudo-Peptide Analogs of Tetragastrin the Importance of the Peptide Backbone. *J Med Chem.* 1985; 28(12):1874-9.

[50] Guzmán F, Barberis S, Illanes A. Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology* 2006;10(2):279-314.

[51] Houghten RA. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen–antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(15):5131–35.

[52] Navarrete E. Métodos fisicoquímicos en biotecnología. Universidad nacional autónoma de México 2007.

[53] Richard JW, Spencer BA, McCoy LF, Carina E, Washington J, Edgar P, et al. Acticoat versus silverlon: the truth. *J Burns Surg Wound Care* 2002;1:11–20.

[54] Castellano JJ, Shafii SM, Ko F, Donate G, Wright TE, Mannari RJ. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *Int Wound J* 2007;4(2):114–22.

[55] Klasen HJ. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. Part I early uses. *Burns* 2000;26(2):117-30.

[56] Landsdown ABG. Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care* 2002;11(4):125–38.

[57] Moyer CA, Brentano L, Gravens DL, Margraf HW, Monafó WW. Treatment of large human burns with 0.5% silver nitrate solution. *Arch Surg* 1965;90(6):812–67.

[58] Bellinger CG, Conway H. Effects of silver nitrate and sulfamylon on epithelial regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1970;45(6):582–5.

[59] Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Ramírez JT, Holt K, Kouri JB, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2005;16(10):2346–53.

[60] Kim YS, Kim JS, Cho HS, Rha DS, Kim JM, Park JD, et al. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol.* 2008;20(6):575-83.

[61] Choi J, Reipa V, Hitchins VM, Goering PL, Malinauskas RA. Physicochemical Characterization and in vitro hemolysis evaluation of silver nanoparticles. *Toxicol Sci* 2011;123(1):133-43.

[62] Khan SS, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Studies on interaction of colloidal silver nanoparticles (SNPs) with five different bacterial species. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011;87(1):129-38.

- [63]** Egorova EM. Interaction of silver nanoparticles with biological objects: Antimicrobial properties and toxicity for the other living organisms. *J. Phys.: Conf. Ser.* 2011; 291(1):1-8.
- [64]** He, Baolin. Tan, Juei. Liew, Kong. Liu, Hanfan. Synthesis of size controlled Ag nanoparticles. *J Mol Catal A: Chem.* 2004; 221, 121-26.
- [65]** Seney, Caryn. Gutzman, Brittany. Goddard, Rusell. Correlation of Size and Surface-Enhanced Raman Scattering Activity of Optical and Spectroscopic Properties for Silver Nanoparticles. *J Phys Chem C.* 2009; 113(1), 74-80
- [66]** Nagarajan, R. Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization. Chapter 1: Nanoparticles: Building Blocks for Nanotechnology. ACS Symposium Series, Vol. 996. (2008).
- [67]** Cubillo A, Pecharroman C, Aguilar E, Santaren J, Moya J. Antibacterial activity of copper monodispersed nanoparticles into sepiolite. *J Mater Sci* 2006; 41:5208–5212.
- [68]** Desai V, Kowshik M. Highly bacterial resistant silver nanoparticles: synthesis and antibacterial activities. *Res J Microbiol* 2009; 4:97–103.
- [69]** Qourzal S, Tamimi M, Assabbane A, Bouamrane A, Nounah A, Laanab L, Ait-Ichou Y. Preparation of TiO₂ Photocatalyst Using TiCl₄ as a Precursor and its Photocatalytic Performance. *J Appl Sci* 2006;6:1553–1559.
- [70]** Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Yadav R, Kalaichelvan PT, Venketesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: A study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine.* 2010;6(1):103-9.

[71] Bönnemann H, Richards R. Nanoscopic metal particles – synthetic methods and potential applications. *Eur J Inorg Chem* 2001;10: 2455–80.

[72] Yeo SY, Lee HJ, Jeong SH. Preparation of nanocomposite fibers for permanent antibacterial effect. *J. Mater. Sci.* 2003;38(10); 2143-47.

[73] Zhang J, Chen P, Sun C, Hu X. Sonochemical synthesis of colloidal silver catalysts for reduction of complexing silver in DTR system. *Appl. Catal. A* 2004;266(1): 49-54.

[74] Liu J, Li X, Zeng X. Silver nanoparticles prepared by chemical reduction-protection method, and their application in electrically conductive silver nanopaste. *J. Alloy. Comp.* 2010;494(1-2): 84–7.

[75] Kashiwagi Y, Yamamoto M, Nakamoto M. Facile size-regulated synthesis of silver nanoparticles by controlled thermolysis of silver alkylcarboxylates in the presence of alkylamines with different chain lengths. *J. Colloid Interface Sci.* 2006;300(1);169–75.

[76] Navaladian S, Viswanathan B, Viswanath RP. Varadarajan TK. Thermal decomposition as route for silver nanoparticles Thermal decomposition as route for silver nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* 2007; 2(1):44–48.

[77] Lu C , Lin P, Lin HC, Wang SF. Effects of Metallo-Organic Decomposition Agents on Thermal Decomposition and Electrical Conductivity of Low-Temperature-Curing Silver Paste. *Jpn. J. Appl. Phys.* 2006;45:6987-92.

[78] Dallas P, Bourlinos AB, Komninou P, Karakassides M. Niarchos D. Silver Nanoparticles and Graphitic Carbon Through Thermal Decomposition of a Silver/Acetylenedicarboxylic Salt. *Nanoscale Res Lett* 2009;4:1358–64.

- [79]** Bae C. H., Nam S. H., Park S. M., Formation of silver nanoparticles by laser ablation of a silver target in NaCl solution. *Applied Surface Science* 2002;197: 628-34.
- [80]** Lee, I., Han, S.W., and Kim, K. Simultaneous preparation of SERS-active metal colloids and plates by laser ablation. *J Raman Spectrosc* 2001;32:947–52.
- [81]** V. Amendola and M. Meneghetti, “Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles,” *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2009; 11(20):3805–21.
- [82]** Pyatenko A, Yamaguchi M, Suzuki M. Mechanisms of size reduction of colloidal silver and gold nanoparticles irradiated by Nd: YAG laser. *J. Phys. Chem. C* 2009;113(21):9078–85.
- [83]** Xie Y, Ye R, Liu H. Synthesis of silver nanoparticles in reverse micelles stabilized by natural biosurfactant, *Colloids and Surfaces A* 2006; 279:175-78.
- [84]** Solomon SD, Bahadory M, Jeyarajasingam AV, Rutkowsky SA, Boritz C, Mulfinger L. Synthesis of silver nanoparticles. *J. Chem. Educ.* 2007; 84:322-5.
- [85]** Song KC, Lee SM, Park TS, Lee BS. Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method. *Korean J. Chem. Eng* 2009;26(1):153-5.
- [86]** Pal T, Sau TK, Jana NR. Reversible formation and dissolution of silver nanoparticles in aqueous surfactant media. *Langmuir* 1997;13 (6):1481–5.
- [87]** Dong X, Ji X, Jing J, Li M, Li J. Yang W. Synthesis of Triangular Silver Nanoprisms by Stepwise Reduction of Sodium Borohydride and Trisodium Citrate *J. Phys. Chem. C* 2010;114 (5):2070–4.

[88] Mansouri SS, Ghader S. Experimental Study on Effect of Different Parameters on Size and Shape of Triangular Silver Nanoparticles Prepared by a Simple and Rapid Method in Aqueous Solution. *Arabian J. Chem.* 2009;2(1):73-88.

[89] Li Y, Wu Y, Ong BS. Facile Synthesis of Silver Nanoparticles Useful for Fabrication of High-Conductivity Elements for Printed Electronics. *J. Am. Chem. Soc.* 2005;127 (10):3266–7.

[90] Gulrajani ML, Gupta D, Periyasamy S, Muthu SG. Preparation and application of silver nanoparticles on silk for imparting antimicrobial properties. *J Appl Polym Sci.* 2008;108(1):614-23.

[91] Nickel U, Castell A, Pöpl K, Schneider S. A silver colloid produced by reduction with hydrazine as support for highly sensitive surface-enhanced Raman spectroscopy. *Langmuir* 2000;16 (23): 9087–91.

[92] Cozzoli PD, Comparelli R, Fanizza E, Curri ML, Agostiano A, Laub D. Photocatalytic synthesis of silver nanoparticles stabilized by TiO₂ nanorods: A semiconductor/metal nanocomposite in homogeneous non polar solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004;126 (12):3868–79.

[93] Lee PC, Meisel DJ. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols *Phys. Chem.* 1982;86(17): 3391-5.

[94] Creighton JA, Blatchford CG, Albrecht MG. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II* 1979;**75**: 790–8.

- [95]** Kurihara LK, Chow GM, Schoen PE. Nanocrystalline Metallic Powders and Films Produced by the Polyol Method. *Nanostruct. Mater.*, 1995;5:607–13.
- [96]** Raveendran P, Fu J, Wallen SL. Completely “green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2003;125:13940–1.
- [97]** Yin YD, Li ZY, Zhong ZY, Gates B, Xia YN. Synthesis and Characterization of Stable Aqueous Dispersions of Silver Nanoparticles through the Tollens Process *J.Mater. Chem.*, **2002**;12: 522–7.
- [98]** Pastoriza-Santos I, Liz-Marzán LM. Reduction of silver nanoparticles in DMF. Formation of monolayers and stable colloids. *Pure Appl. Chem* 2000;72:83–90.
- [99]** Brust M, Kiely CJ. Some Recent Advances in Nanostructure Preparation from Gold and Silver: A Short Topical Review. *Colloids Surf. A Phys. Eng. Aspects.* **2002**; 202:175–86.
- [100]** Yamamoto M, Nakamoto M. Novel preparation of mono-dispersed silver nanoparticles via amine adducts derived from insoluble silver myristate in alkylamine. *J Mater Chem* 13:2064–2065.
- [101]** Nath S, Praharaj S, Panigrahi S , Kundu S, Ghosh SK, Basu S, et al. Hexadecylamine capped silver organosol: a substrate for surface enhanced Raman Scattering. *Colloids Surf. A Phys. Eng. Aspects*, 2006; 274:145–9.
- [102]** Hiramatsu H, Osterloh FE. A Simple Large Scale Synthesis of Nearly Monodisperse Gold and Silver Nanoparticles with Adjustable Sizes and with Exchangeable Surfactants. *Chem. Mater.*, 2004, 16, 2509–11.

[103] Bunge SD, Boyle TJ, Headley TJ. Synthesis of Coinage-Metal Nanoparticles from Mesityl Precursors. *Nano Lett.* 2003;3:901–5.

[104] Jana NR, Gearheart L, Murphy CJ. Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Cylindrical Gold Nanorods. *Chem. Commun.* 2001;105(19):617–8.

[105] Pileni MP. Fabrication and physical properties of self-organized silver nanocrystal. *Pure Appl. Chem.* 2000;72(1-2): 53–65.

[106] Zhang ZQ, Patel RC, Kothari R, Johnson CP, Friberg SE, Aikens PA. Stable silver clusters and nanoparticles prepared in polyacrylate and inverse micellar solutions. *J. Phys. Chem. B*, **2000**;104: 1176–82.

[107] Mallick K, Witcomb J, Scurrill MS. Self-assembly of silver nanoparticles: Formation of a thin silver film in a polymer. *Mater. Sci. Eng. C*. **2006**;26:87–91.

[108] Fernández EJ, García-Barrasa J, Laguna A, López-de-Luzuriaga JM, Monge M, Torres C. The preparation of highly active antimicrobial silver nanoparticles by an organometallic approach. *Nanotechnology*, 2008, 19(18):185602 (6pp).

[109] Oliveira MM, Ugarte D, Zanchet D, Zarbin AJG. Influence of synthetic parameters on the size, structure, and stability of dodecanethiol-stabilized silver nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 2005;292:429–35.

[110] Bauer CA, Stellacci F, Perry JW. Relationship Between Structure and Solubility of Thiol-Protected Silver Nanoparticles and Assemblies. *Catal.*, **2008**;47:32–41.

[111] Green M, Allsop N, Wakefield G, Dobson PJ, Hutchison JL. Trialkylphosphine oxide/amine stabilised silver nanocrystals—the importance of

steric factors and Lewis basicity in capping agents *J. Mat. Chem.*, **2002**;12: 2671–74.

[112] Murphy CJ, Jana NR. Controlling the Aspect Ratio of Inorganic Nanorods and Nanowires *Adv. Mat.*, **2002**;14.:80–2.

[113] Maillard M, Giorgio S, Pileni MP. Tuning the size of silver nanodisks with similar aspect ratio: synthesis and optical properties *J. Phys. Chem. B.*, **2003**;107: 2466–70.

[114] Zhang W , Qiao X, Chen J, Wang H. Preparation of silver nanoparticles in water-in-oil AOT reverse micelles. *J. Colloid Interface Sci.* 2006;302:370–3.

[115] Huang JY, Ning YS, Yong KS, Cai YH, Tang HH, Shao YX. The binding of glycine and L-cysteine on Si(111)-7x7. *Langmuir*, 2007;23:6218-22.

[116] Jana NR, Gearheart L, Murphy CJ. Wet Chemical Synthesis of Silver Nanorods and Nanowires of Controllable Aspect Ratio. *Chem. Commun.* **2001**;18: 617–8.

[117] Cason JP, Khanbaswadkar K, Roberts CB. Supercritical Fluid and Compressed Solvent Effects on Metallic Nanoparticle Synthesis in Reverse Micelles. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2000;39:4749–55.

[118] Wiley B, Sun Y, Mayers B, Xia Y. Shape Controlled Synthesis of Metal Nanostructures: The Case of Silver. *Chem. Eur. J.* 2005;11:454–63.

[119] Sun Y, Xia Y. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science*. 2002;298(5601):2176-9

[120] Sun X, Dong S, Wang E. One-step preparation and characterization of poly(propyleneimine) dendrimer-protected silver nanoclusters. *Macromolecules* **2004**;37:7105–8.

[121] Yang Q, Wang F, Tang KB, Wang CR, Chen ZW, Qian YT. The formation of fractal Ag nanocrystallites via γ -irradiation route in isopropyl alcohol. *Mater. Chem. Phys.* 2003;78(2):495–500.

[122] Lesniak W, Bielinska AU, Sun K, Janczak KW, Shi X, Baker JR Jr, et al. Silver/dendrimer nanocomposites as biomarkers: fabrication, characterization, in vitro toxicity, and intracellular detection. *Nano Lett.* 2005;5:2123–30.

[123] Singh M, Singh S, Prasada S, Gambhir I. Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. *Digest J. Nanomat. Biostruct.* 2008;3: 115-22.

[124] Neal A. What can be inferred from bacterium nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles?. *Exotoxicobiology* 2008;7:362-71.

[125] Sondi J, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gramnegative bacteria. *J. Colloid Interface* 2004; 275: 177-82.

[126] Lok Ch-M, Ch-M H, Chen R, He Q-Y, Yu WY, et al. Proteomic analysis of the mode of antimicrobial action of silver nanoparticles. *J. Prot. Res.* 2006;5: 916-24.

[127] Morones J, Elechigerra J, Camacho A, Ramirez J. The bacterial effect of silver nanoparticles. *Nanotech* 2005; 16:2346-53.

[128] Feng Q, Wu J, Chen G, Cui F, Kim T, Kim J. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater* 2000; 52: 662-8.

[129] Klasen, H. Historical review of the use of silver in the treatment of burns I. Early uses. *Burns*. 2000; 26, 117-130.

[130] Baker C, Pradhan A, Pasktis L, Pochan DJ, Shah SI. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *J. Nanosci. Technol.* 2005; 2:244-9.

[131] Shahverdi AR, PharmD AF, Shahverdi HR, Minaian S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia Coli*. *Nanomedicine: Nanotechnol. Biol. Med.* 2007; 3: 168-71.

[132] Yamanaka M, Hara K, Kudo, J. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy and Proteomic Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71(11), 7589-93.

[133] Atiyeh B, Costagliola M, Hayek S, Dibo S. Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. *Burns*. 2007; 33, 139-48.

[134] Chaloupka K, Yogeshkumar M, Seifalian A. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*. 2010; 28 (11), 580-8.

[135] Sharma V, Yangard R, Lin Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antibacterial and antifungal activities. *Adv. Colloid. Interface. Sci.* 2009;145: 83-96.

[136] Ayala-Nuñez N, Lara H, Ixtepan L, Rodríguez C. Silver Nanoparticles Toxicity and Bactericidal Effect Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Nanoscale Does Matter. *Nanobiotechnol.* 2009; 5, 2–9.

[137] Maturana R. Síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas [Tesis de pregrado] Universidad Industrial de Santander, escuela de ingeniería química, 2009.

[138] Kim KJ, Sung WS, Moon SK, Cho JS. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2008;18(8):1482-4.

[139] Sanpui P, Murugados A, Prasad PVD, Ghosh SS, Cattopadhyay A. The antibacterial properties of a novel chitosan-Ag-nanoparticle composite. *International J. Food.Mic.* 2008;124: 142-6.

[140] Fernández E, García J, Laguna A, López-de-Luzuriaga J, Monge M, Torres C. The preparation of highly active antimicrobial silver nanoparticles by an organometallic approach. *Nanotech* 2008;19:185602-8.

[141] Rastogi S, Rutledge V, Charlene G, Newcombe D, Branen J, Larry A. Ag colloids and Ag clusters over EDAPTMS-coated silica nanoparticles: synthesis, characterization, and antibacterial activity against *Escherichia coli*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2011; 7:305-314.

[142] Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara HH, et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J. Nanobiotechnology* 2005;3:6.

[143] Tian J, Wong K, Ho C, Lok C, Yu W, Che C, et al. Topical Delivery of Silver nanoparticles Promotes Wound Healing. *ChemMedChem* 2007; 2: 129–36.

- [144] Roe D, Karandikar B, Bonn-Savage N, Gibbins B, Rouillet J. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *J. Antimicrob. Chemother* **2008**;61:869–76.
- [145] Chen W, Liu Y, Courtney HS, Bettenga M, Agrawal C, Bumdgardner J. In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver containing hydroxyapatite coating. *J. L. Ong Biomaterials* 2006;27:5512–17.
- [146] Lee HY, Park HK, Lee YM, Kim K, Park SB. A practical procedure for producing silver nanocoated fabric and its antibacterial evaluation for biomedical application. *Chem. Commun.*, 2007;2959–61.
- [147] Vigneshwaran N, Kathe AA, Varadarajan PV, Nachane RP, Balasubramanya RH. Functional finishing of cotton fabrics using silver nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2007;7(6):1893-7.
- [148] Erathodiyil N, Ying J. Y. Functionalization of inorganic nanoparticles for bioimaging applications. *Acc. Chem. Res.* 2011;44(10):925-35.
- [149] Shankar SS, Deka S. Metal nanocrystals and their applications in biomedical systems. *Science of Advanced Materials* 2011;3(2):169-95.
- [150] Algar WR, Prasuhn DE, Stewart MH, Jennings TL, Blanco-Canosa JB, Dawson PE, et al. The controlled display of biomolecules on nanoparticles: A challenge suited to bioorthogonal chemistry. *Bioconjugate Chem.* 2011;22(5):825-58.
- [151] Crommelin DJA, Storm G, Jiskoot W, Stenekes R, Mastrobattista E, Hennink WE. Nanotechnological approaches for the delivery of macromolecules. *Journal of Controlled Release* 2003;87(1–3):81–8.

[152] Heredia KL, Maynard HD. Synthesis of Protein-Polymer Conjugates. *Organic & Biomol. Chem.* **2007**;5:45-53.

[153] Kim J, Grate W, Wang P. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem Eng Sci* 2006;61(3):1017–26.

[154] Ye Z, Houssein HSH, Mahato RI. Bioconjugation of oligonucleotides for treating liver fibrosis. *Oligonucleotides* 2007;17(4):349-404

[155] Eby DM, Farrington KE, Jhonson GR. Synthesis of Bioinorganic Antimicrobial Peptide Nanoparticles with Potential Therapeutic Properties. *Biomacromolecules* 2008;9:2487-94.

[156] Delehanty JB, Boeneman K, Bradburne CE, Robertson K, Bongard JE, Medintz IL. Peptides for specific intracellular delivery and targeting of nanoparticles: Implications for developing nanoparticle-mediated drug delivery. *Therapeutic Delivery*, 2010;1(3):411-33.

[157] Esmaeili F, Dinarvand R, Ghahremani MH, Ostad SN, Esmaily H, Atyabi F. Cellular cytotoxicity and in-vivo biodistribution of docetaxel poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles, *Anti-Cancer Drugs*, 2010;21(1):43-52.

[158] Grace N; Pandian K. Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles - A brief study. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2007;297:63-70.

[159] Zhang YW, Peng HS, Huang W, et al. Facile preparation and characterization of highly antimicrobial colloid Ag or Au nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 2008;325(2):371-6.

[160] Vertegel AA, Siegel RW, Dordick JS. The Size of Nanoparticles Influences the Structure and Enzymatic Activity of Adsorbed Lysozyme. *Langmuir* 2004;20(16):6800–7.

[161] Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J: Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys D: Appl Phys* 2003;36:R167-R181

[162] Ahamed M, Alsalhi MS, Siddiqui MK. Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta*. 2010;411(23-24):1841-8.

[163] Eby DM, Schaeublin NM, Farrington KE, Hussain SM, Jhonson GR. Lysozyme Catalyzes the Formation of Antimicrobial Silver Nanoparticles. *Am. Chem. Soc. Nano* 2009; 3(4):984-94.

[164] Qu LW, Luo PG, Taylor S, Lin Y, Huang WJ, Anyadike N, et al. Visualizing adhesion-induced agglutination of *Escherichia coli* with mannosylated nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2005;5:319-22.

[165] Luo PJG, Tzeng TR, Qu LW, Lin Y, Caldwell E, Latou RA, et al. Quantitative analysis of bacterial aggregation mediated by bioactive nanoparticles. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2005;1(3):291–6.

[166] Wang H, Xu K, Liu L, Tan JP, Chen Y, Li Y, et al. The efficacy of self-assembled cationic antimicrobial peptide nanoparticles against *Cryptococcus neoformans* for the treatment of meningitis. *Biomaterials*. 2010;31(10):2874-81.

[167] Suri SS, Fenniri H, Singh B. Nanotechnology-based drug delivery systems. *Int J Occup Med Tox* 2007;2:16

- [168]** Costantino L, Gandolfi F, Tosi G, Rivasi F, Vandelli MA, Forni F: Peptide-derivatized biodegradable nanoparticles able to cross the blood-brain barrier. *J Control Release* 2005;108(1):84-96.
- [169]** Brannon-Peppase L, Blanchette JQ. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56(11):1649-59.
- [170]** Ruden S, Hilpert K, Berditsch M, Wadhvani P, Ulrich AS. Synergistic Interaction between Silver Nanoparticles and Membrane-Permeabilizing Antimicrobial Peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(8):3538-40
- [171]** Golubeva OY, Shamova OV, Orlov DS, Pazina TY, Boldina AS , Drozdova IA, et al. Synthesis and study of antimicrobial activity of bioconjugates of silver nanoparticles and endogenous antibiotics. *Glass Phys. Chem* 2011;37(1):78-84.
- [172]** Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. ClustalW and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007; 23:2947–8.
- [173]** Lloyd-Williams P, Albericio F, Giralt E. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, CRC Press, Boca Raton, 1997
- [174]** Andreu D, Albericio F, Solé NA, Munson MC, Ferrer M, Barany G. *Peptide Synthesis Protocols. Methods in Molecular Biology* 1994;35.
- [175]** Krchnák V, Wágner J, Šafář P, Lebl M. Noninvasive continuous monitoring of solid-phase peptide synthesis by acid–base indicator. *Collect Czech Chem Commun* 1988; 53:2542–8.

[176] Mant CT, Kondejewski LH, Cachia PJ, Monera OD, Hodges RS. Analysis of synthetic peptides by high-performance liquid chromatography. *Methods in Enzymology* 1997; 289:426-469.

[177] Standing KG. Peptide and protein de novo sequencing by mass spectrometry. *Current Opinion in Structural Biology* 2003; 13:595–601.

[178] Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005;1751:119–139.

[179] Douglas F, Yañez R, Ros J, Marín S, Escosura-Muñiz A, Alegret S, Merkoci A. Silver, gold and the corresponding core shell nanoparticles: synthesis and characterization. *J Nanopart Res* 2008; 10(1): 97-106.

[180] Dirk L, Hyning V, Zukoski CL. Formation mechanisms and aggregation behavior of borohydride reduced silver particles. *Langmuir* 1998; 14: 7034-7046.

[181] Creighton JA, Blatchford CG, Albrecht MG. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. *J Chem Soc Faraday Trans II* 1979; 75:790- 8.

[182] Wayne P. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standards M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards: 2002.

[183] Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodriguez-Tudela JL . International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida*

spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3884-9.

[184] Wayne, P. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standards M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards: 2002.

[185] Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodriguez-Tudela JL . International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3884-3889.

[186] (CLSI) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test: M2-A9. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighteenth informational supplement: M100-S18. 2008.

[187] Helmerhorst EJ, Reijnders IM, van't Hof W, Veerman ECI, Nieuw Amerongen AV. A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Lett* 1999; 449:105–10.

[188] Jiang Z, Vasil AI, Hale JD, Hancock RE, Vasil ML, Hodges RS. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers.* 2008;90(3):369-83.

[189] Yagcia Y, Sahin O, Turan Ozturk, Marchi S, Grassini S, Sangermano M. Synthesis of silver/epoxy nanocomposites by visible light sensitization using highly conjugated thiophene derivatives. *Reactive & Functional Polymers* 2011; 71:857–62.

[190] Zielinska, Anna. Skwarek, Ewa. Zaleska, Adriana. Gazda, Maria. Hupka, Jan. Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size. *Proc Chem* 1. 2009; 11, 1560-66.

[191] Brause R., Moeltgen H., Kleinermanns K., Characterization of laser ablated and chemically reduced silver colloids in aqueous solution by UV/VIS spectroscopy and STM/SEM microscopy, *Applied Physics B: Lasers and Optics* 2002; 75: 711-716.

[192] Martin J, Cardamone J, Irwin P, Brown E. Keratin capped silver nanoparticles – Synthesis and characterization of a nanomaterial with desirable handling properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2011; 88:354–361.

[193] Che Lah N, Johan M. Facile shape control synthesis and optical properties of silver nanoparticles stabilized by Daxad 19 surfactant. *Applied Surface Science* 2011; 257: 7494–7500.

[194] Mock J, Barbic M, Smith D, Schultz D, Schultz S. Shape effects in Plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *Journal of Chemical Physics* 2002; 116:15: 6755-60.

[195] Pillai ZS, Kamat PV. What factors control the size and shape of silver nanoparticles in citrate ion reduction method?, *J. Phys.Chem.B.* 2004; 108: 945-51.

[196] Chaudhari VR, Haram SK, Kulshreshtha SK. Micelle assisted morphological evolution of nanoparticles, *Colloids and Surfaces A* 2007; 301: 475-80.

[197] Li D. G., Chen S. H., Zhao S. Y., Hou X. M., Ma H. Y., Yang X. G., Simple method for preparation of cubic Ag nanoparticles and their self-assembled films, *Thin Solid Films* 2004; 460: 78-82.

[198] Kumar A, Joshi H, Pasricha R, Mandale AB, Sastry M. Phase transfer of silver nanoparticles from aqueous to organic solutions using fatty amine molecules, *Journal of Colloid and Interface Science* 2003; 264: 396-401.

[199] Bhui, Dipak. Bar, Harekrishna. Sarkar, Priyanka. Sahoo, Gobinda. Prasad, Sankar. Misra, Ajay. Synthesis and UV–vis spectroscopic study of silver nanoparticles in aqueous SDS solution. *J Mol Liq.* 2009;145, 33-37.

[200] Dadosh, Tali. Synthesis of uniform silver nanoparticles with a controllable size. *Mater Lett.* 2009; 63, 2236-38.

[201] Herr AE, Molho JI, Santiago JG, Mungal MG, Kenny TW. Electroosmotic Capillary Flow with Nonuniform Zeta Potential. *Anal. Chem.*, 2000;72(5):1053–7.

[202] Xu R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. *Particuology* 2008;6: 112–115.

[203] Hemantha Kumar G N, Lakshmana Rao J, Gopal NO, Narasimhulu KV, Chakradhar RPS and Varada Rajulu A. Spectroscopic investigations of Mn⁺² ions doped polyvinylalcohol films. *Polymer* 2004;45:5407-15.

[204] Raju CL, Rao JL, Reddy BCV and Braham KV. Thermal and IR studies on copper doped polyvinyl alcohol. *Bull. Mater. Sci.* 2007;30:215–8.

[205] Liu L, Xu K, Wang H, Jeremy PK , Fan W, Venkatraman SS. Self-assembled cationic peptide nanoparticles as an efficient antimicrobial agent. *Nature Nanotechnology* 2009;4: 457-63.

[206] Amin R, Mohamed M, Ramadan M, Verwanger T, Krammer B. Rapid and Sensitive Microplate Assay for Screening the Effect of Silver and Gold Nanoparticles on Bacteria. *Nanomedicine*. 2009; 4(6), 637-643.

[207] Won H, Kang S, Lee B. Action mechanism and structural requirements of the antimicrobial peptides, gaegurins. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009;1788: 1620–9.

[208] Sperstad S, Haug T, Blencke H, Styrvold O, Li C, Stensvåg K. Antimicrobial peptides from marine invertebrates: Challenges and perspectives in marine antimicrobial peptides discovery. *Biotechnology Advances* 2011; 29: 519-530.

[209] Chen H, Yen C, Lu C, Yu C, Chen C. Synthetic porcine lactoferricin with a 20-residue peptide exhibits antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006;54:3277-3282.

[210] Hancock EW, Gill Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology* 200;8:402-410.

[211] Cubellis M, Cailliez F, Lovell S. Secondary structure assignment that accurately reflects physical and evolutionary characteristics. *BMC Bioinformatics* 2005; 6: 1-9.

[212] Su Y, Doherty T, Waring AJ, Ruchala P, and Hong M. Roles of Arginine and Lysine Residues in the Translocation of a Cell-Penetrating Peptide from ^{13}C , ^{31}P , and ^{19}F Solid-State NMR. *Biochemistry* 2009;48:4587–4595.

[213] Chan D, Prenner E, Vogel H. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes* 2006; 1758:1184-1202.

[214] Shepherd CM, Vogel HJ, Tieleman DP. Interactions of the designed antimicrobial peptide MB21 and truncated dermaseptin S3 with lipid bilayers: molecular-dynamics simulations. *Biochem. J* 2003;370:233–43.

[215] Aliste MP, MacCallum JL, Tieleman DP. Molecular dynamics simulations of pentapeptides at interfaces: salt bridge and cation–pi interactions. *Biochemistry* 2003; 42:8976–87.

[216] Lesmes LP, Bohorquez MY, Carreño LF, Patarroyo ME, Lozano JM. A C-terminal cationic fragment derived from an arginine-rich peptide exhibits in vitro antibacterial and anti-plasmodial activities governed by its secondary structure properties. *Peptides* 2009;8:1-11.

[217] Brogden N, Brogden K. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals?. *Int J Antimicro Ag* 2011; 38: 217-25.

[218] Epand R, Maloy L, Ramamoorthy A, Epand R. Amphipathic Helical Cationic Antimicrobial Peptides Promote Rapid Formation of Crystalline States in the Presence of Phosphatidylglycerol: Lipid Clustering in Anionic Membranes. *Biophysical journal* 2010; 98: 2564-73.

[219] Čeřovský V, Slaninová J, Fučík V, Hulačová H, Borovičková L, Jeřek R, Bednářová L. New potent antimicrobial peptides from the venom of Polistinae wasps and their analogs. *Peptides* 2008; 29: 992-1003.

[220] Zarghi A, Javid F, Ghodsi R, Dadrass O, Daraei B, Hedayati M. Design, Synthesis and Biological Evaluation of New 5,5-Diarylhydantoin Derivatives as Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors. *Sci Pharm.* 2011;3:449-60.

[221] Sperstad S, Haug T, Blencke H, Styrvold O, Li C, Stensvåg K. Antimicrobial peptides from marine invertebrates: Challenges and perspectives in marine antimicrobial peptides discovery. *Biotechnology Advances* 2011; 29: 519-30.

[222] Powers JP and Hancock EW. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 2003. 1681-91.

[223] Gogoi SK, Gopinath P, Paul A, Ramesh A, Ghosh SS, Chattopadhyay A. Green Fluorescent Protein-Expressing *Escherichia coli* as a Model System for Investigating the Antimicrobial Activities of Silver Nanoparticles. *Langmuir* 2006;22 (22):9322-8.

[224] Pal S, Tak YK, Song JM. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* March 2007;73(6):1712-20.

[225] Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, et al. Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles. *J Proteome Res.* 2006; 5, 916-24.

[226] Martinez F, Olive P, Banuelos A, Orrantia E, Niño N, Morales E, et al. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. *Nanomedicine: NBM.* 2010; 6(5), 681-8.

[227] Lara, H. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol* 2009;26(4):615-21.

[228] Stoimenov P, Klinger R, Marchin G, Klabunde K. Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents. *Langmuir.*2002; 18, 6679-86.

[229] Hamouda T, Baker J. Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric Gram-negative bacilli. *J Appl microbiol.* 2000; 89, 397-403.

[230] Laban, G. The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. *Ecotoxicology* 2009;19(1):185-95.

[231] Nikaido, Hiroshi. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003; 67(4), 593-656.

[232] Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park S, Lee H, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed: Nanotechnol, Biol Medi* 2007; 3: 95–101.

[233] García P, Lorena P, Curcio D. Estudio de susceptibilidad a tigeciclina: Influencia del agar Mueller-Hinton en el método de difusión en agar y validación del método E-test® para *Acinetobacter baumannii*. *Rev Chil Infect* 2009; 26: 13-16.

[234] Chou KS, Ren CY. Synthesis of nanosized particles by chemical reduction method. *Materials chemistry and physics* 2000;64:241-246.

[235] Wang H, Quiao X, Chen J and Ding S. Colloids Surf A: Physicochem. Eng Aspects 2005; 256: 11-115.

[236] Tiwari PK. Synthesis and Characterization of Nanostructured Materials, M Tech. Dissertation, Banaras Hindu University, Varanasi, 2005.

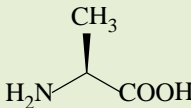
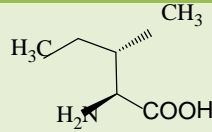
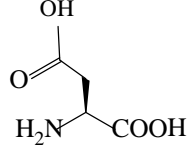
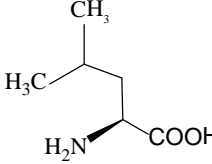
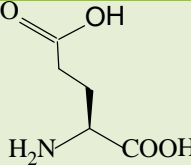
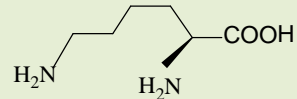
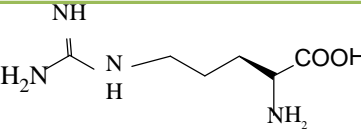
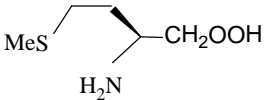
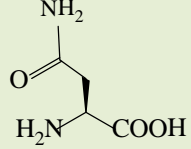
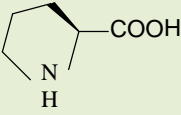
[237] Solomon S, Bahadory M, Jeyarajasingam A, Rutkowsky S and Boritz C. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. Journal of Chemical Education 2007; 84: 322-325.

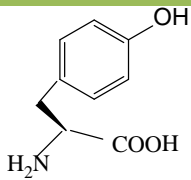
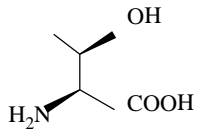
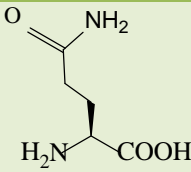
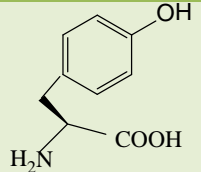
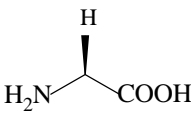
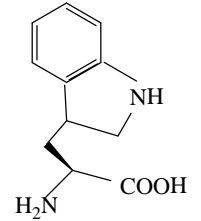
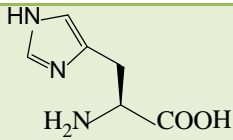
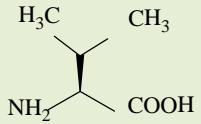
[238] Orlov DS, Shamova OV, Golubeva OY, Pasina TY, Yamschikova EV, Kolodkin NI, et al. Action of complexes of natural antimicrobial peptides and silver nanoparticles on microorganisms. Cytokines and Inflammation. 2010; 9(2):32-36.

[239] Semple JW, Freedman J. Autoimmune pathogenesis and autoimmune hemolytic anemia. Semin Hematol 2005; 42:122-30.

ANEXOS

ANEXO 1. AMINOÁCIDOS, CÓDIGO DE TRES LETRAS, UNA LETRA Y ESTRUCTURA

Aminoácidos	Estructura	Aminoácidos	Estructura
Alanina, ala, A		Isoleucina, Ile, I	
Ácido aspártico, Asp, D		Leucina, Leu, L	
Ácido glutámico, Glu, E		Lisina, Lys, K	
Arginina, Arg, r		Metionina, Met, M	
Asparagina, Asn, N		Prolina, Pro, P	

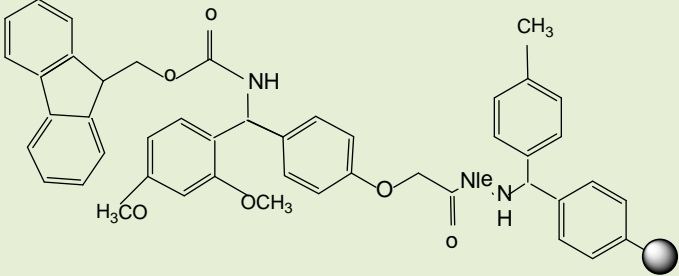
Aminoácidos	Estructura	Aminoácidos	Estructura
Fenilalanina,Phe, F		Treonina, Thr, T	
Glutamina, Gln,Q		Tirosina, Tys, Y	
Glicina,Gly, G		Triptófano, Trp, W	
Histidina,His, H		Valina, Val, V	

ANEXO 2. GRUPOS PROTECTORES EMPLEADOS EN LA ESTRATEGIA

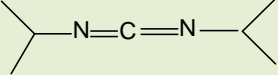
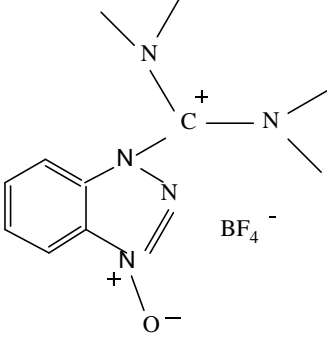
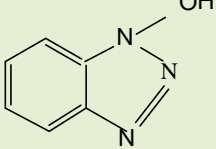
Fmoc/tBu

Protector	Aminoácido	Estructura
Pmc	Arginina, Arg, R	
Trt	Asparagina, Asn, N Cisteína, Cys, C Glutamina, Gln, Q Histidina, His, H	
tBu	Lisina, Lys, K Triptófano, Trp, W	
BocivDde	Lisina, Lys, K	
Dmab	Ácido aspártico, Asp, D	

ANEXO 3. SOPORTES SÓLIDOS UTILIZADOS EN LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE

Nombre	Estructura
Resina Rink amida MBHA	 <chem>Cc1ccc(cc1)NC(=O)OCCOc2ccc(cc2)N(C)C(=O)OCCc3c4ccccc4c5ccccc35</chem>

**ANEXO 4. AGENTE DE CONDENSACIÓN Y ADITIVOS EMPLEADOS EN LA
SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA**

Nombre	Abreviación	Estructura
N,N' di-isopropilcarbodiimida	DIC	
Tetrafluorobato de N-óxido de N-[(1-H- benzotriazol-1-il)-dimetilamino-metilen]-N-metilmetanaminio	TBTU	
1-hidroxibenzotriazol	HOBt	

ANEXO 5. CROMATOGRAMAS DE LFampB, LFampH Y SUS ANÁLOGOS.

