



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC



**CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE UN EXTRACTO EXTRACELULAR DE
*STREPTOMYCES SPP.***

Por:

FRANCISCO JAVIER MONTAÑO LÓPEZ

TESIS PROPUESTA A LA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DE INVESTIGACIÓN

MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

DIRECTOR DE TESIS

DR. JORGE ALBERTO SÁNCHEZ BURGOS

CO-DIRECTOR DE TESIS.

Dra. Bárbara González Acosta

Tepic, Nayarit

Diciembre de 2021



“2021, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria”

Tepic, Nayarit, **30/Noviembre/2021**
CONSEJO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS
No. Oficio CMCA: 128-2021

M.C. Luz del Carmen Romero Islas
JEFE DE LA DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC
P R E S E N T E

Por este conducto comunico a usted que el Consejo de la Maestría en Ciencias en Alimentos ha designado como revisores de la tesis de la alumna I.B.Q. Francisco Javier Montaña López con número de control M13401059, cuyo título es “Caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de un extracto extracelular de *Streptomyces spp.*”, a los miembros que a continuación se enlistan, mismos que han evaluado y aprobado el contenido del manuscrito para obtener el grado de Maestro(a) en Ciencias en Alimentos y que firman de conformidad.

Dr. Jorge Alberto Sánchez Burgos
(Presidente)

Dra. Bárbara González Acosta
(Secretario)

Dra. Sonía Guadalupe Sáyago Ayerdi
(Vocal)

Dra. Rita María Velázquez Estrada
(Vocal suplente)

Por lo anterior, le solicito se sirva elaborar los oficios correspondientes para AUTORIZAR LA IMPRESIÓN DE TESIS. Agradeciendo de antemano la atención prestada a la presente, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®

Dr. Jorge Alberto Sánchez Burgos
Presidente del Consejo de la Maestría en Ciencias en Alimentos

c.c.p. Expediente





Instituto Tecnológico de Tepic

Tepic, Nayarit, **01/diciembre/2021**

No. Oficio: 25-771-2021

Asunto: Constancia Originalidad de Trabajo de Tesis

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente se CERTIFICA que una vez analizado mediante el uso del Software PLAGIARISM v. 1740, el trabajo de tesis "CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UN EXTRACTO EXTRACELULAR DE Streptomyces spp." para obtener el grado de Maestro (a) en Ciencias en Alimentos del C. I.B.Q. FRANCISCO JAVIER MONTAÑO LÓPEZ con numero de control **M13401059** cuenta con un nivel de **originalidad Aceptable** según lo definido en el Procedimiento paraa Verificación de Originalidad, por lo cual se determina que no constituye un plagio.

Es importante mencionar que de los trabajos de tesis se publican articulos en revistas Indizadas y/o arbitradas por lo que las técnicas utilizadas son citadas frecuentemente.

Se extiende la presente para los fines que mejor convengan al interesado.

Sin mas por el momento envío saludos cordiales

ATENTAMENTE

*Excelencia en Educación Tecnológica®
Sabiduría Tecnológica, Pasión de nuestro espíritu®*


MANUEL ANGEL URIBE VÁZQUEZ
DIRECTOR




GGTM/er
Ccp. Archivo DEPI





Instituto Tecnológico de Tepic

Tepic, Nayarit, **06/diciembre/2021**

No. Oficio: 25-782-2021

Asunto: Autorización de impresión

**I.B.Q. FRANCISCO JAVIER MONTAÑO LÓPEZ
PRESENTE**

De acuerdo con el reglamento de los Institutos tecnológicos dependientes de la Dirección General de Educación Superior Tecnológica de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la comisión revisora le hizo a su trabajo de Tesis de Maestría en Ciencias en Alimentos; denominado "CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UN EXTRACTO EXTRACELULAR DE *Streptomyces* spp."

La División de Estudios de Posgrado e Investigación le autoriza para que proceda a la impresión de la misma.

Sin más por el momento quedo de usted.



SECRETARIA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE TEPIC
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica
Sabiduría Tecnológica, Pasión de Nuestro Espíritu.

**LUZ DEL CARMEN ROMERO ISLAS
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

ccp. Archivo DEPI.





TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
POSGRADO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

ASUNTO: CARTA DE SESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Tepic, Nayarit., el mes de diciembre de 2021, el que suscribe alumno Francisco Javier Montaña López del Programa de MAESTRIA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS con número de control M13401059, manifiesta que todos los resultados derivados de sus estudios de posgrado y realizados bajo la dirección del Dr. Jorge Alberto Sánchez Burgos, pertenece al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic, por lo que cedo los derechos de los mismos a este instituto con fines académicos y de investigación. Así mismo manifiesto que es de mi conocimiento que si de estos resultados se originan patentes o publicaciones, participaré como coautor y de los beneficios que se deriven.

Francisco Javier Montaña López

NOMBRE COMPLETO DEL ESTUDIANTE

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a dios por darme la vida, paciencia y sabiduría para poder lograr los objetivos a lo largo de mi existencia, sobre todo en tiempos tan difíciles donde una pandemia arrebató la vida de muchos de nuestros familiares sin previo aviso.

Al Instituto Tecnológico de Tepic por haberme brindado la oportunidad de realizar un posgrado en conjunto con la institución CONACYT, ya que sin su apoyo no hubiese sido posible.

A los maestros del posgrado ciencias en alimentos del instituto tecnológico de Tepic por su contribución en el desarrollo del conocimiento para llevar a cabo esta investigación y particularmente al Dr. Jorge Alberto Sánchez Burgos por todo el apoyo que me brindó durante el proceso correspondiente, contribuyendo en mi desarrollo académico y sobre todo por siempre dar el extra e impulsar el crecimiento personal, sin duda alguna una pieza clave este viaje, así mismo agradezco profundamente a la Dra. Bárbara González Acosta una gran mujer que tiene mucho para enseñar, que durante mi estancia pesé a ser muy corta hizo lo posible para poder Contribuir al máximo en mi formación , gracias por compartirme de su gran calidez humana, a mis asesores muchas gracias por el apoyo y sobre todo por su paciencia y dedicación .

A mis padres Fernando Montaña Carranza que tomaste el reto de estar lejos de tu familia para poder presentarme una mejor oportunidad de vida, a mi madre María Luisa López Aldaz por impulsarme en el día a día con sus consejos y apoyo incondicional, por preocuparse siempre en brindarme todas las herramientas necesarias para poder lograr todas las locuras que me he propuesto en la vida, a mis hermanos por siempre estar ahí listos para apoyar e impulsar mi crecimiento.

A mis abuelos que formaron de mí un niño con los valores que hacen a un hombre de bien y los que se que desde el cielo me brindan su bendición y su orgullo.

Agradezco a mi esposa Monserrat Valencia Estrada por permanecer constante mi vida y siempre apoyar mis decisiones e impulsar los retos que puedo imaginar, gracias por tu amor, paciencia y dedicación.

Contenido

LISTA DE CUADROS	3
LISTA DE FIGURAS	4
RESUMEN	7
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	12
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	14
2.1 Generalidades de <i>Streptomyces spp.</i>	14
2.2 Importancia del género <i>Streptomyces spp.</i> y su ciclo de vida.	15
2.3 Producción de metabolitos secundarios de <i>Streptomyces spp.</i>	16
2.4 Generalidades de péptidos antimicrobianos	17
2.4.1 Péptidos antimicrobianos ribosomales.	17
2.4.2 Péptidos antimicrobianos no ribosomales.	18
2.5 Identificación y purificación de péptidos por cromatografía	18
2.6 Mecanismos de acción de péptidos antimicrobianos.	22
2.6.1 Interacciones con membrana.....	22
2.6.2 Limitaciones del uso de péptidos antimicrobianos.....	22
2.7 Mecanismos de resistencia de péptidos antimicrobianos	22
2.8 Resistencia de las bacterias a los antibióticos	23
2.9 Técnica de antibiósisis	23
2.9.1 Amensalismo.....	24
2.10 Estudio computacional (<i>in silico</i>).....	24
2.11 Generalidades del análisis <i>in silico</i>	25
2.11.1 Análisis de acoplamiento molecular.....	25
2.11.2 Importancia de descriptores moleculares fisicoquímicos.....	28
2.12 Principales objetivos (proteínas) para evaluar efecto antimicrobiano <i>in silico</i>	30
2.12.1 Principales enzimas identificadas como objetivos de acoplamiento molecular en <i>S. aureus</i>	30
CAPÍTULO 5. HIPÓTESIS	33
CAPÍTULO 4. JUSTIFICACIÓN	35
CAPÍTULO 5. OBJETIVOS	37
5.1 Objetivo general.	37
5.2. Objetivos específicos.....	37

CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS	39
6.1 Microorganismos utilizados en el desarrollo del proyecto.....	39
6.2 Microorganismos utilizados para la detección de actividad.....	39
6.3 Medios de cultivo empleados en el desarrollo del proyecto.....	40
6.4 Etapa 1.....	41
6.4.1 Reactivación de actinobacterias de interés.....	41
6.4.2 Siembra en medio líquido:.....	41
6.4.3 Crecimiento de actinobacterias sobre membrana de celofán.....	41
6.4.4 Obtención de un extracto extracelular de actinobacterias del género <i>Streptomyces spp.</i>	42
6.4.5 Técnica de antibiosis.....	42
6.5.1 Digestión enzimática y evaluación de actividad antibacteriana.....	42
6.4.7 Separación de compuestos por electroforesis (SDS-PAGE).....	43
6.5 Autobiografía del perfil electroforético.....	44
6.5.1 Estudio <i>in silico</i> para transglicosilasa y transpeptidasa.....	45
6.5.1 Análisis estadístico:.....	46
CAPÍTULO 7. RESULTADOS	48
7.1 Desarrollo de la prueba de actividad mediante el método de difusión en placa de los productos extracelulares (PEC) de las cepas identificadas con el código 509, 515, 517.....	48
7.2 Análisis de fracciones activas mediante digestión de proteinasa K y tripsina.....	50
7.3 Bioautografía de los PEC cepas 509 y 517 de <i>Streptomyces</i> mediante un perfil de electroforesis G-SDS-PAGE.....	51
7.4 Análisis de acoplamiento molecular <i>in silico</i>	54
7.4.1 Acoplamiento molecular en función de máxima espontaneidad con transglicosilasa (TG).....	54
7.4.2 Propiedades fisicoquímicas de los ligandos durante el acoplamiento molecular.....	55
7.4.3 Acoplamiento molecular del derivado de fosfotoetanoamina en función de máxima espontaneidad con TP.....	62
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES	67

LISTA DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 2.1	Principales técnicas de purificación e identificación de péptidos bioactivos.	21
Cuadro 2.2	Herramientas de simulación de acoplamiento proteína-ligando.	27
Cuadro 2.3	Atributos fisicoquímicos ideales para una alta afinidad de interacción con proteínas de alta lipofilia.	28
Cuadro 6.1	Medios de cultivo empleados en el desarrollo del proyecto.	40
Cuadro 6.2	Condiciones de elaboración de gel de poliacrilamida.	43
Cuadro 7.1	Organismos utilizados en prueba de actividad (<i>L. monocitogenes</i> ATCC 15313, <i>S. typhimurium</i> ATCC 1224, <i>E. coli</i> ATCC 8739, <i>S. aureus</i> ATCC 33862-25923).	48
cuadro 7.1	Acoplamiento molecular expresado como la energía total del complejo de unión (fullfitness).	52
cuadro 7.2	Propiedades fisicoquímicas obtenidas del descriptor molecular SwissADME.	53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 Estructura cristalina de resolución de los dominios de dimerización y transpeptidasa (residuos 39-608) de la proteína 1 de unión a penicilina de *Staphylococcus aureus*. Pág. 30
- Figura 7.1 Prueba de actividad antimicrobiana realizada con los PEC obtenidos de las cepas 509 (A), 515 (B) 517 (C). La cepa blanco utilizada fue *S. aureus* ATCC 25923. Pág. 31
- Figura 7.2 Prueba de actividad realizada con el PEC de la cepa 517 sometida a hidrólisis con Proteinasa K (A) y Tripsina (B) a una concentración final de 1 mg/mL. La cepa blanco utilizada fue *S. aureus* ATCC, las placas se incubaron a 30° C durante 24 h. K proteinasa K; T tripsina; 1:8 y 1:64 la dilución realizada al extracto. Pág. 47
- Figura 7.3 Perfil electroforético del sobrenadante de cultivo de las cepas 509 y 517- Electroforesis SDS-PAGE (figura A). Bioautografía (figura B). Muestra 509. Carril 1.- Marcador; Carril 2.- Albumina sin digerir; Carril 3.- Muestra sin digerir; Carril 4.- Tripsina 1:8; Carril 5.- Proteinasa K 1:8; Carril 6.- Marcador. Muestra 517: Carril 1.- 1:8 Proteinasa K; Carril 2.- 1:8 Tripsina; Carril 3.- Muestra sin digerir; Carril 4.- Albúmina sin digerir; Carril 5.- Marcador Pág. 49
- Figura 7.4 Simulación Acoplamiento molecular de enzima transglucosilasa (TG) para el compuesto activo derivado de fosfatoetanolamina (1-(1Z-hexadecenyl)-2-(6Z,9Z,12Z,15Z-octadecatetraenoyl)-glycero-3-phosphoethanolamine) en estado basal. La interacción está dada bajo el acoplamiento con 4 aminoácidos representados con colores: Rosa Pág. 55

- magenta-arginina (ARG148), kaky-tirosina (Thr258), verde oscuro-acido aspártico (Asp145), azul-Serina (Ser265), azul claro-resto de TG.
- Figura 7.5 Simulación Acoplamiento molecular obtenida de TG para ceftriaxona en estado basal. Interacciones con aminoácidos son representadas por colores: Café-Lisina (LyS 153), azul marino-glicina (Gly 131), salmón-Glutamina (Gln 136): azul claro-resto de TG. Pág. 56
- Figura 7.6 Simulación de Acoplamiento molecular de TG con penicilina obtenida en estado basal. Interacciones con aminoácidos representados por colores: Rosa magenta-arginina (ARG 269), tinto-metionina (MET234), anaranjado-asparagina (ASN 232), kaky-Tirosina (Tyr 196); Azul claro-resto de la TG. Pág. 58
- Figura 7.7 Simulación de acoplamiento molecular de vancomicina con TG en estado basal. Interacciones con aminoácidos son representados por colores: Coral-Isoleucina (ILE 54), arena-fenilalanina (PHE 57), verde limón-leucina (Leu 119)- leucina (Leu 157), azul claro-resto de la TG. Pág. 59
- Figura 7.8 Simulación de Acoplamiento molecular de derivado de fosfatoetanolamina con TP en estado basal. Interacción de los aminoácidos representados por colores: Anaranjado-asparagina (ASN 502), azul-serina (Ser 368), rosa magenta- arginina (ARG 347), treonina (THR 420), azul claro-resto de TP. Pág. 60
- Figura 7.9 Simulación de acoplamiento molecular de ceftriaxona con TP en estado basal. Interacciones de los aminoácidos están representadas por colores: Anaranjado-asparagina (ASN 308), tinto-lisina (Lys 300), gris- resto de TP. Pág. 61
- Figura 7.10 Simulación de acoplamiento molecular de penicilina con TP en estado basal. Interacciones de los aminoácidos están representadas por colores: Purpura-treonina (THR 516,), rojo-triptofano (TRP 351), salmon-glutamina (GLN 518) (GLN 425), azul claro- resto de TP. Pág. 62
- Figura 7.11 Simulación de acoplamiento molecular de Vancomicina con TP en estado basal. Interacciones de los aminoácidos están representadas por colores: Café- lisina (LYS 84), purpura- treonina (THR 143), dorado-

prolina (Pro188), rosa magenta- arginina (ARG 140), azul claro resto de TP.

RESUMEN

Las actinobacterias del género *Streptomyces* se destacan por la diversidad en la producción de compuestos antibacterianos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de productos extracelulares (ECP) obtenidos de tres cepas de *Streptomyces sp.* Los ECP se obtuvieron a partir de cultivos realizados en membranas de celofán. Uno de los extractos fue liofilizado y se realizaron pruebas cualitativas de actividad antibacteriana contra cepas patógenas de interés industrial; *L. monocitogenes* ATCC(15313), *S. typhimurium* ATCC(1224), *E. coli* ATCC(8739), *S. aureus* ATCC (33862), se evaluó el % de actividad en función del diámetro del halo de inhibición, utilizando como control positivo vancomicina. Con los otros dos extractos únicamente se realizaron ensayos de actividad antimicrobiana sobre una cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Las tres cepas produjeron un posible péptido antimicrobiano sensible al tratamiento con proteinasa K y con efecto inhibitoria frente a microorganismos Gram-positivos. Mediante bioautografía SDS-PAGE se observa que el compuesto producido inhibe el crecimiento de *S. aureus*, determinando la presencia de compuestos de naturaleza proteica con un peso de aproximadamente 4.6 kDa. Consecutivamente se realizó una evaluación cuantitativa de la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en ingles) en función de la densidad óptica. Se obtuvo un $87 \% \pm 2.75\%$ de inhibición en función del diámetro del halo de inhibición, presentado por el control positivo vancomicina contra *S. aureus* ATTC (33862), se obtuvo una MIC de 12.5 mg/mL de compuesto activo con un comportamiento similar a ceftriaxona, revelando así la presencia de posibles péptidos de cadenas muy cortas. Se realizó un análisis *in silico* tomando como referencia los resultados obtenidos con otra cepa de *Streptomyces* donde se reporta la presencia de una serie de compuestos derivados y precursores de dinactin nombrado como derivado de fosfatoetanolamina para fines prácticos aducto a aminoácidos como histidina, isoleucina, lisina y arginina en cadenas muy cortas. Se generó un acoplamiento molecular donde los resultados se visualizaron en el programa USCF Chimera y se evaluaron mediante el parámetro de máxima espontaneidad Full Fitness (FF); aquel clúster con FF más favorable se utilizó para determinar los residuos participantes en la generación del complejo. Mediante la simulación de acoplamiento molecular se demostró que existen características e interacciones favorables para inhibir enzimas transferasas y a través de este mecanismo y conseguir la potencial inactivación de bacterias gram positivas, partiendo de *Staphylococcus aureus*.

Palabras clave: actividad antibacteriana, extracto extracelular, *Streptomyces spp.*, acoplamiento molecular.

ABSTRACT

Actinobacteria of the genus *Streptomyces* stand out for their diversity in the production of antibacterial compounds. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity of extracellular extracts of a *Streptomyces* sp. The extracellular product was obtained which was lyophilized and evaluated by qualitative tests of antibacterial activity against pathogenic strains of industrial interest; *L. monocytogenes* ATCC (15313), *S. typhimurium* ATCC (1224), *E. coli* ATCC (8739), *S. aureus* ATCC (25923), the activity was evaluated as a function of the diameter of the inhibition halo, using as a control positive vancomycin. To establish that the observed inhibitory effect was due to the presence of antimicrobial peptides, the extracts were treated with proteinase K, by means of a plaque activity test, observing a null inhibition, evidencing the antimicrobial effect probably due to the presence of bioactive peptides. Subsequently, an electrophoretic profile (SDS-PAGE) was performed on a 12% (v / v) polyacrylamide gel, the sample was treated with a partial denaturation (EPD) and a total denaturation (ETD), adding a thermal treatment at 95 ° C / 4 min to the latter and resulting in the presence of several protein fragments, determining the presence of compounds of a protein nature with a weight of 4.6 kDa by means of an electrophoretic analysis. Consecutively, a quantitative evaluation of the minimum inhibitory concentration (MIC) was carried out as a function of the optical density. 87% \pm 2.75% inhibition was obtained as a function of the diameter of the inhibition halo, presented by the vancomycin positive control against *S. aureus* ATCC (33862), a MIC of 12.5 mg / mL of active compound was obtained with a similar behavior to ceftriaxone, thus revealing the presence of possible very short chain peptides. An *in silico* analysis was carried out taking as reference the results obtained with another strain of *Streptomyces* where the presence of a series of derivatives and precursors of dinactin is reported, named as a derivative of phosphate ethanolamine for practical purposes adduct to amino acids such as histidine, isoleucine, lysine and arginine in very short chains, a molecular coupling was generated where the results were visualized in the USCF Chimera program and evaluated using the parameter of maximum spontaneity Full Fitness (FF); that cluster with the most favorable FF was used to determine the residues participating in the generation of the complex. By simulating molecular coupling, it was demonstrated that there are favorable characteristics and interactions to inhibit transferase

enzymes and through this mechanism and achieve the potential inactivation of gram positive bacteria, starting from *Staphylococcus aureus*.

Keywords: antibacterial activity, extracellular extract, *streptomyces spp.*, Molecular coupling.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Las actinobacterias son consideradas las procariotas más importantes desde el punto de vista económico y biotecnológico, debido a su diversidad y capacidad para producir compuestos bioactivos. Las investigaciones realizadas con estas bacterias ponen de manifiesto su gran habilidad para producir metabolitos secundarios, de tal forma que se les considera como las fuentes más ricas de estos metabolitos (Murphy *et al.*, 2012). Estos compuestos, además de tener funciones ecológicas, actúan también como inhibidores de enzimas, promotores de apoptosis, agentes antifúngicos, antibacterianos, anti-inflamatorios, inmunosupresores y anticancerígenos (Faulkner *et al.*, 2000; Gotang, 2008; Raczkowski, 2010).

Entre estas bacterias destacan las pertenecientes al género *Streptomyces spp.*, se sabe que más del 90% de los antibióticos actualmente conocidos son sintetizados a partir de actinobacterias pertenecientes a este género (Bentley *et al.*, 2012). Las cepas del género *Streptomyces spp.*, son productoras del 50% de los antibióticos de uso frecuente en clínica humana, animal y recientemente en alimentos. La mayoría de los antimicrobianos son metabolitos secundarios extracelulares que son secretados al medio de cultivo y sirven como precursores para la biosíntesis de agentes anticancerígenos, fármacos, inmunorreguladores, antivirales y agentes antiparasitarios (Patzner & Volkmar, 2010), es por ello la importancia de caracterizar los compuestos presentes en los extractos extracelulares. Los antibióticos peptídicos son sintetizados por uno o más péptido sintetizados no ribosomales, péptidos de síntesis ribosomal y algunos otros compuestos con actividad antibacteriana surgen como mecanismo de defensa los cuales son utilizadas en medicina y la industria alimentaria (Beshkova & Rengova, 2012). En la actualidad los compuestos antimicrobianos son sujetos a estudios teóricos de actividad a través de herramientas computacionales y de forma bilateral con estudios prácticos, permitiendo conocer los mecanismos de acción a partir de un objetivo identificado. Por tal motivo en este trabajo se busca evaluar compuestos extracelulares producidos por actinobacterias del género *Streptomyces* aisladas de sedimento marino y valorar su actividad antimicrobiana *in silico* utilizando como cepa blanco *Staphylococcus aureus* de colección. Tomando como referencia los resultados reportados por Pérez Mayo (2020).

CAPITULO 2. ANTECEDENTES

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de *Streptomyces spp.*

El phylum Actinobacteria agrupa a bacterias Gram-Positivas con un alto contenido de Guanina-Citosina en su genoma. Este grupo de bacterias presentan una morfología y fisiología muy diversa. Se creía que las actinobacterias aisladas a partir de fuentes marinas tenían un origen terrestre debido a que la mayoría de estos microorganismos presentan semejanzas o las mismas características que las especies terrestres, y que las cepas aisladas eran esporas inactivas que se encontraban en la columna de agua, sin embargo, se han aislado y caracterizado especies de actinomicetos marinos cuyos requerimientos de salinidad para su crecimiento no les permiten vivir en otros ambientes (Mincer *et al.*, 2002; Ward & Bora 2006; Yoshida *et al.*, 2008). Presentan una distribución ubicua en el planeta, incluyendo ambientes terrestres como acuáticos (Mohammadipanah & Wink, 2016).

Las actinobacterias son responsables de la producción de casi el 90% de los antibióticos utilizados en la industria farmacéutica, lo que los coloca como la fuente más importante en la producción natural de dichos compuestos. Dentro de este grupo, el género *Streptomyces* es el más estudiado y se le atribuye la producción de antibióticos comerciales como la estreptomicina, daptomicina, eritromicina, neomicina y tetraciclina, por mencionar algunos (Jose & Jebakumar, 2013). Se estima que *Streptomyces* es capaz de producir más de 100,000 compuestos, de los cuales solo una pequeña fracción ha sido estudiada, por lo que una serie de trabajos de investigación se han enfocado a la búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana en este género (Watve *et al.*, 2001)

La diferenciación morfológica de *Streptomyces spp.* implica la formación de una capa de micelio que pueden diferenciarse en una cadena de esporas. Este proceso es único entre este tipo de bacterias Gram positivas, que requieren una atención especializada y coordinada. Estos microorganismos se caracterizan por la capacidad de producir metabolitos con efectos antifúngicos, antivirales, antitumorales, antihipertensivo y principalmente antibiótico e inmunosupresor (Patzner & Volkmar, 2010).

Es importante señalar que la producción de la mayoría de los antibióticos es específica del género mencionado, y que a su vez estos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos al entrar en contacto aun cuando pertenezcan al mismo género. Otro

proceso importante que implica la producción de antibióticos es la simbiosis entre *Streptomyces* spp. y plantas, con lo cual protege la planta contra los patógenos y los exudados de la planta permiten el desarrollo de este género de microorganismos (Emerson et al., 2012).

El principio fundamental para inhibir el crecimiento bacteriano inicia mediante la interacción física de la molécula con sus objetivos específicos, lo que posteriormente deriva en una serie de cambios bioquímicos, moleculares y estructurales, siendo sus objetivos principales la replicación de ADN, síntesis de ARN, síntesis de la pared celular y la síntesis de proteínas; por mencionar algunos (Bosso *et al.*, 2010).

2.2 Importancia del género *Streptomyces* spp. y su ciclo de vida.

El género *Streptomyces* spp. es de gran importancia para diferentes sectores, a través del tiempo los actinomicetos se han vuelto una fuente de compuestos bioactivos producto de su amplio metabolismo secundario, entre los que destacan aquellos de naturaleza proteica, los cuales han sido denominados péptidos antimicrobianos, siendo el género más estudiado dentro del filo actinobacteria, cuenta con más de 500 especies descritas (Whitman *et al.*, 2012).

El género *Streptomyces* se ha destacado por poseer un ciclo de vida muy complejo, con procesos de muerte celular programada, diferenciación morfológica y esporulación, son consideradas como modelos procariotas de múltiple celularidad y es por ello el gran interés de la investigación básica (Chater, 1984).

El ciclo de vida de este género va en función de las características del medio principalmente, en cultivos sólidos (placas Petri) *Streptomyces* realiza un ciclo de vida completo el cual termina con la esporulación de hifas, el ciclo de vida tradicional describía como después de la germinación de esporas, se forma una red de hifas ramificadas con la capacidad de penetrar y solubilizar los desechos orgánicos a través de la acción por enzimas hidrolíticas extracelulares, dando lugar a la formación del llamado micelio sustrato vegetativo (Chater, 1984).

Este micelio crece y es extendido hasta un determinado momento, en respuesta a la carencia de nutrientes y a otras señales, se activa la expresión de determinados genes implicados en el desarrollo del micelio aéreo que es desarrollado nutriéndose del micelio sustrato en una

especie de canibalismo (Chater,1984; Miguelez *et al.*,1999). El micelio aéreo se genera del micelio sustrato y comienza a crecer en el aire para lo cual se debe recubrir de una serie de cubiertas hidrofóbicas, estas moléculas que comprenden una nueva clase de proteínas, llamadas chaplinas. Los chaplines reducen la tensión superficial del agua del medio acuoso, lo que permite que las hifas crezcan en el aire y recubren las estructuras aéreas, haciéndolas hidrófobas y funcionando por autoensamblaje en fibrillas de tipo amiloide. (Claessen *et al.*,2006; Flardh & Buttner,2009).

En este punto hay un gran aporte de nutrientes por parte del micelio sustrato, de tal forma que la bacteria se vuelve el lugar ideal para el desarrollo y colonización de otros microorganismos, para evitarlo *Streptomyces spp.* inicia la síntesis de compuestos antimicrobianos como mecanismo de defensa, para la protección de esta fuente endógena de nutrientes de explotación por otros organismos vecinos (Flardh & Butter, 2009; McCormick & Flardh, 2012).

2.3 Producción de metabolitos secundarios de *Streptomyces spp.*

La producción de metabolitos secundarios es identificada como compuestos químicos con funciones no esenciales, de tal forma que la ausencia no es letal para el organismo, sin embargo, estos son biológicamente activos y han logrado revolucionar diferentes sectores de la industria, el género *Streptomyces spp.* Se caracteriza por la producción de dichos compuestos, sin embargo el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios ha sido estancado y al mismo tiempo las resistencias de los microorganismos a los antibióticos existentes han venido aumentando drásticamente, como consecuencia existen enfermedades infecciosas extremadamente difíciles de tratar, por lo que el descubrimiento de nuevos antibióticos es una prioridad ya que es la mejor opción para contrarrestar las resistencias (Coates *et al.*, 2011).

La mayoría de los estreptomicetos producen de 2 a 5 metabolitos secundarios en el desarrollo a nivel laboratorio; sin embargo, análisis genómicos recientes han demostrado que los actinomicetos, incluidas las especies que no producen compuestos bioactivos detectables, tienen en su genoma un promedio de 30 rutas involucradas en la producción de metabolitos secundarios (Genilloud, 2014). Dentro de lo metabolitos secundarios más producidos por este género destacan los compuestos de naturaleza proteica, los cuales a través del tiempo han

sido denominados péptidos antimicrobianos, basando su importancia en sus diferentes mecanismos de acción con efecto bactericida y bacteriostático a bajas concentraciones

2.4 Generalidades de péptidos antimicrobianos

Los compuestos extracelulares son todos aquellos fluidos que están fuera de las células, las actinobacterias pertenecientes al género *Streptomyces spp.* con la producción de péptidos antimicrobianos, ha contribuido con un gran impacto en disciplinas como la medicina y la industria alimentaria (Bentley *et al.*, 2012).

Los péptidos antimicrobianos son moléculas que están relacionadas con el sistema inmune de diferentes tipos de organismos y cuya acción están relacionada principalmente con la interacción que efectúa con patógenos, afectando las membranas de estos e incluso alterando los procesos de replicación del ADN, síntesis de proteínas, entre otros. Estos péptidos pueden tener un origen ribosomal o no ribosomal, lo cual dependerá del mecanismo de defensa requerido por el organismo sintetizador; sin embargo, su principal característica es su toxicidad selectiva, lo cual hace que sean considerados como antibióticos de corto espectro, aunque la generación de resistencia a los péptidos antimicrobianos es mucho menor en comparación con la generada por antibióticos convencionales (Marr *et al.*, 2006).

2.4.1 Péptidos antimicrobianos ribosomales.

Las bacteriocinas se definen como péptidos de origen proteico que a bajas concentraciones tienen la capacidad de inhibir el crecimiento microbiológico (Beshkova & Frengova, 2012). Las bacteriocinas de acuerdo con Chen & Hoover (2003) son sintetizadas a nivel ribosomal como metabolitos secundarios en algunas actinobacterias y bacterias ácido lácticas, siendo secretadas extracelularmente con el fin de inhibir el crecimiento de bacterias similares o cepas cercanas incluso patógenas (Cotter *et al.*, 2005). Las bacteriocinas son una opción atractiva para ser utilizadas como conservadores naturales para alimentos mínimamente procesados, por lo que actualmente se han desarrollado estudios donde se comprueba su alto potencial en biopreservación de carnes, productos lácteos, alimentos enlatados, productos de panificación entre otros (Cleveland *et al.*, 2001).

Los péptidos pueden ser identificados por diferentes técnicas moleculares, siendo más utilizadas las técnicas de cromatografía (HPLC-MS) en su fase reversa, un sistema en el cual los analitos iónicos y altamente polares eluyen primero de la columna, seguidos por analitos

más hidrófobos. Los compuestos eluyen en el orden opuesto al de los experimentos de Tsvet. Por consiguiente, este sistema se llama cromatografía en “fase reversa”, la columna más eficiente para esta técnica es la C18 que ofrece una interacción hidrofóbica muy simple. A medida que los solutos en la fase móvil viajan por los poros de sílica, pueden ser atraídos y retenidos por el hidrocarburo mediante una interacción hidrofóbica y fuerza de Van-Der Waals relativamente débil (Yoshida, 2004).

2.4.2 Péptidos antimicrobianos no ribosomales.

Un péptido no ribosomal es una clase de péptido producido como metabolito secundario de algunos microorganismos como bacterias, hongos y levaduras. Son sintetizados por sintetetasas peptídicas no ribosomales, los cuales a diferencia de los ribosomas son independientes del ARN mensajero, generalmente poseen una estructura cíclica o ramificada lo que los convierte en una familia muy diversa de productos naturales con un amplio rango de actividades biológicas y farmacológicas, incluso pueden actuar como toxinas, sideróforos o pigmentos; actualmente se comercializan varios péptidos no ribosomales que incluyen antibióticos comerciales, ejemplo de ellos son la vancomicina y la gramidicina (Mansson *et al.*, 2011).

2.5 Identificación y purificación de péptidos por cromatografía

En los productos que son de interés caracterizar, se encuentran aminoácidos (aa), estas sustancias son componentes esenciales de un sin número de preparados con fines industriales, farmacéuticos y agrícolas. Entre los diversos métodos analíticos utilizados para este tipo de compuestos, la determinación por HPLC se encuentra como uno de los más empleados. Esta determinación puede requerir derivatización o no, en dependencia del tipo de aminoácido a analizar. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se ha convertido en un procedimiento estándar para la separación de aminoácidos, aunque la mayoría de ellos no se detectan fácilmente sin utilizar alguna modificación química. En la mayoría de las primeras separaciones de aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico, se empleaba una reacción post-columna con ninhidrina. Actualmente, se han desarrollado sistemas en los cuales los aminoácidos se derivatizan antes de separarse en una columna de fase reversa, con la ventaja de que la derivatización pre-columna permite un análisis más rápido y con más alta sensibilidad (Castillo Portela *et al.*, 2011).

La determinación de aminoácidos utilizada estará en dependencia del tipo a analizar. Los aminoácidos alifáticos requieren una derivatización pre-columna o postcolumna que permita la detección por UV o por fluorescencia de estos. Los aminoácidos aromáticos como la histidina, triptófano y tirosina pueden determinarse por UV sin derivatización a una baja longitud de onda (Hoffmann *et al.*, 2017).

Las ventajas relativas de la derivatización antes o después de la HPLC, están determinadas por los requerimientos de la aplicación específica. Factores como la sensibilidad requerida en la detección, cantidad de muestra disponible, tipo de muestra y procedencia de esta, velocidad de análisis y reproducibilidad e incluso consideraciones económicas influirán en la elección entre la derivatización pre- o post-columna en la cuantificación analítica de aminoácidos.

Entre las diferentes técnicas analíticas también se encuentra la cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC) (Singh *et al.*, 2014). La UHPLC presenta un gran potencial en la separación de pequeños péptidos bioactivos, aumentando el rendimiento de los métodos de HPLC regulares, además de que presenta ventajas que incluyen el aumento del rendimiento, la resolución y la sensibilidad (Everley & Croley, 2008; Fekete & Guillarme, 2014).

Por otra parte la cromatografía de fase inversa (RP-HPLC) puede usarse para separar péptidos por hidrofobicidad (Pownall *et al.*, 2010), mientras que la cromatografía líquida de interacción hidrófila (HILIC) es un método útil para la separación de sustancias hidrófilas; Este método se basa en el aumento de la capacidad de retención de los solutos con polaridad creciente de la fase estacionaria y la polaridad decreciente del sistema de fase móvil (disolvente predominantemente orgánico) utilizado para la elución; el principio opuesto al observado en RP-HPLC (Yoshida, 2004).

Las técnicas de electroforesis en gel y ultrafiltración también se han utilizado como métodos auxiliares para el análisis de composición química de péptidos, determinando el peso comprendido por los resultantes mediante estas técnicas y a su vez correlacionarlos con los aa más probables en función de sus características estructurales (Roblet *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2014); referente a espectrometría de masas la ionización por electropulverización y la

desorción / ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF), destaca para la identificación y caracterización de péptidos y proteínas bioactivas, mientras que la espectrometría de masas por cromatografía líquida se usa comúnmente para identificar secuencias de péptidos (Chiaradia *et al.*, 2008; Del Mar Contreras *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2014).

En el Cuadro 2.1 se muestran las principales técnicas de purificación e identificación de péptidos bioactivos utilizando diversas técnicas en base al uso de membranas, técnicas espectrofotométricas, uso de cromatografía y uso de espectrometría de masas.

Cuadro 2.1 Principales técnicas de purificación e identificación de péptidos bioactivos.

Purificación	Identificación / detección
Técnicas con base a membranas:	Técnicas espectrofotométricas:
Microfiltración (MF)	Detección Ultravioleta (UV)
Ultrafiltración (UF)	Detección Fluorescencia (FL)
Nanofiltración (NF)	
Osmosis reversa (RO)	Detección de dispersión de luz evaporativa (ELSD)
Técnicas cromatográficas	Técnicas de espectrometría de masas
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Atornillador a presión atmosférica triple cuadrupolo (API-III)
Cromatografía de intercambio iónico (IEC)	Ionización por Electrospray (ESI-MS/MS)
Electroforesis Capilar (CE)	
Separación de enfoque isoeléctrico capilar (CIEF)	Ionización por desorción láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF)
Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)	
Cromatografía a contracorriente (CCC)	
Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)	
Cromatografía de afinidad (AC)	

Referencias: Shahidi & Zhong., (2008).

2.6 Mecanismos de acción de péptidos antimicrobianos.

Los péptidos antimicrobianos adoptan estructuras anfipáticas con extremos hidrofóbicos que interactúan con otros hidrofílicos dando como resultado la capacidad de interactuar con las membranas celulares para ejercer su mecanismo de acción. El mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos está dado por su carácter catiónico y su tendencia a ser anfipáticos, lo que facilita su interacción e inserción en las paredes celulares aniónicas y membranas de fosfolípidos de los microorganismos, pudiendo aumentar la permeabilidad en la membrana u otros blancos (Wang, 2014; Jenssen *et al.*, 2006).

2.6.1 Interacciones con membrana

La interacción inicial de los péptidos antimicrobianos con las bacterias, generalmente, es producida por su carga positiva y su atracción electrostática hacia las superficies polianiónicas de las paredes, ya sea por los ácidos teicoicos y lipoteicoicos en las Gram positivas, o los lipopolisacáridos en las Gram negativas; posterior a la interacción, los péptidos antimicrobianos generan áreas de inestabilidad en la membrana externa, permitiendo la translocación de estos mismos a través de la bicapa externa. Una vez localizados en la membrana, pueden sufrir modificaciones en su conformación y producir daños en la membrana o internamente (Jenssen *et al.*, 2006.)

2.6.2 Limitaciones del uso de péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos se destacan por ser un grupo de sustancias que pudieran ser de uso clínico, como sustitución de antibióticos comerciales o de aplicación en la industria alimentaria. En comparación con los antibióticos convencionales, los péptidos antimicrobianos ofrecen una baja resistencia, por lo que no da origen a la aparición de variantes patógenas; sin embargo, las principales limitaciones con las que se enfrentan son la degradación peptídica por acción de proteasas, ya sea en el torrente sanguíneo, sistema gastrointestinal o la unión con otras proteínas las cuales ocasionan su inactivación, por ello su uso se limita a productos de aplicación tópica (Bradshaw, 2003).

2.7 Mecanismos de resistencia de péptidos antimicrobianos

La naturaleza ha utilizado los péptidos antimicrobianos por millones de años, por lo cual no existe duda alguna sobre su efecto y también sobre la resistencia que se genera, aunque en menor proporción que los antibióticos comerciales. Esta resistencia hacia estos péptidos se

genera por diversas características de la bacteria sobre la cual actúa el péptido, entre los cuales está la carga eléctrica de la membrana, su estructura y componentes de esta membrana como los polisacáridos, lípidos y los mecanismos de defensa propios del microorganismo (Wang ,2014). Otro mecanismo de resistencia es la neutralización o inactivación mediada por la producción de moléculas unidas a la membrana o que se liberan para interactuar directamente a los péptidos en el medio de crecimiento; un caso a resaltar es el de *Staphylococcus aureus* quien produce una proteína llamada estafilocinasa, la cual es capaz de unirse directamente a las α -defensinas humanas, teniendo la posibilidad de lograr una inhibición del efecto bactericida (Saar *et al.*, 2012).

2.8 Resistencia de las bacterias a los antibióticos

Se producen hasta 100,000 toneladas de antibióticos anualmente, que se utilizan en la agricultura, la alimentación y la salud (Nikaido, 2009). Su uso ha afectado la salud humana y ha favorecido a las poblaciones de bacterias, induciendo resistencia a los antibióticos. Esta resistencia puede deberse a cambios genéticos como la mutación o la adquisición de genes de resistencia mediante transferencia horizontal, que con mayor frecuencia ocurre en organismos de taxonomía diferente. Mutaciones pueden causar cambios en el sitio de acción de las drogas, lo que dificulta la acción del antibiótico (Martínez, 2009).

La mayoría de los genes de resistencia se encuentran en el mismo grupo que el gen de biosíntesis de antibióticos. Por naturaleza, la función principal de los antibióticos es inhibir a los competidores, que son inducidos a inactivar estos compuestos por modificación química (hidrólisis) y cambios en el sitio de acción y permeabilidad de la membrana; sin embargo, el efecto del antibiótico puede verse afectado por el estado fisiológico de las bacterias y concentración del antibiótico lo que puede dar lugar a la formación resistente (Sheng *et al.*, 2009).

2.9 Técnica de antibiosis

La batalla antiinfecciosa farmacológica mediada por antibióticos se da desde tiempos inmemorables aun cuando dicho fenómeno era ignorado por el hombre. La antibiosis careció de práctica hasta el descubrimiento de la penicilina y su función antibacteriana. Las enfermedades infecciosas al igual que el resto de las enfermedades en la antigüedad fueron

tratadas en su mayoría con remedios de origen vegetal mediante aplicación tópica, el descubrimiento del crecimiento de microorganismos en esta actividad empírica promovió la observación de inhibición mediante estas técnicas curativas, teniendo un soporte biológico en siglo XVI pero fue hasta el siglo XX donde se tiene el origen de la antibiosis. En 1889, Rudolph Emmerich y Oscar Löw introducen en terapéutica el primer fármaco antibacteriano, un extracto procedente de cultivos viejos de *Pseudomonas fluorescens*, llamado piocianasa, con capacidad destructora ‘*in vitro*’ de varios patógenos. Esta sustancia de escasa toxicidad fue utilizada en administración sistémica y local, especialmente en Alemania, hasta la segunda década de siglo XX (Ledermann, 2013).

La técnica de antibiosis se realiza con la finalidad de poder detectar la presencia o ausencia de actividad microbiana, con el paso del tiempo y avances de la ciencia, se han desarrollado una amplia variedad de técnicas de antibiosis como son cúpulas y pocillos (Barja, 1979), el método de dilución (Hatalin, 1973) y de discos de papel de filtro (Baver, 1966) para evaluar microorganismos, extractos crudos libre de células y compuestos extracelulares con el propósito de conocer el amensalismo en presencia de microorganismos patógenos (Smith, 2001).

2.9.1 Amensalismo

El amensalismo también conocido como antagonismo, es una interacción en la cual una población microbiana produce una o varias sustancias capaces de inhibir a otras poblaciones, existen diferentes formas de amensalismo, las más conocidas son la inhibición por sustancias orgánicas, la antibiosis, fungistasis, bacteriocinas, ciertos tipos de lisis saprofítica y la ejercida por bacteriocinas (Sánchez et al., 2009).

2.10 Estudio computacional (*in silico*)

Anteriormente, la búsqueda de nuevos compuestos con efectos terapéuticos implicaba la síntesis a través de varias rutas de los supuestos compuestos con la propiedad buscada o el cribado de productos naturales, esfuerzos que pueden ser categorizados como exploraciones aleatorias o al azar, en lugar de orientaciones racionales. En los últimos años se han dado a conocer una serie de grandes avances en los cálculos teóricos que han favorecido el uso y la popularidad de los estudios *in silico* (computacionales) para el análisis de moléculas de

interés biológico; ello se ha convertido en parte integral de la investigación industrial y académica dirigida al diseño y descubrimiento de fármacos (Reddy *et al.*, 2007).

Las herramientas computacionales han evolucionado de tal forma que se han transformado en tecnologías cada vez más importantes para la búsqueda de moléculas candidatas a fármacos, mediante la selección de moléculas denominadas ‘cabezas de serie’ o leads a partir de bases de datos. Entre estas herramientas se encuentra el modelado molecular, técnica que permite obtener moléculas reales o virtuales, que poseen gran probabilidad de exhibir una acción específica y que hace posible, incluso, predecir su biodisponibilidad y toxicidad (Gherzi & Sánchez, 2009).

2.11 Generalidades del análisis *in silico*

La bioinformática utiliza la estadística y la ciencia computacional para analizar datos biológicos heterogéneos, lo que brinda oportunidades para la comprensión de los procesos aplicados en las ciencias biológicas. Aunque las investigaciones en tales objetivos pueden clasificarse como complicadas y costosas, se ha considerado que vale la pena realizar análisis *in silico*, con el objetivo de identificar nuevos productos y mecanismos de acción utilizando distintas estrategias experimentales (Chávez-Fumagalli *et al.*, 2018). Por otro lado, el acoplamiento molecular es una herramienta poderosa para simular *in silico* la interacción y la formación de complejos entre un ligando y su proteína objetivo; por lo tanto, las moléculas con alta afinidad de unión (baja energía de acoplamiento) por una proteína específica exhiben eficacia terapéutica (Ortiz *et al.*, 2016). En ese sentido, la identificación de las propiedades estructurales de una proteína proporciona información sobre su actividad biológica y permite el diseño de ligandos eficaces para su sitio de unión (Kazmi *et al.*, 2019).

2.11.1 Análisis de acoplamiento molecular

El método de acoplamiento considera la interacción entre una molécula pequeña y un sitio activo en una proteína objetivo, y predice la afinidad de sus interacciones de unión a partir de su orientación de acoplamiento y las fuerzas que interactúan entre ellos (Bliznyuk & Gready, 2006). Las interacciones proteína-ligando se simulan utilizando poderosas

herramientas computacionales, como algoritmos de acoplamiento, que predicen la reacción más favorable.

La construcción de estos modelos se basa en el supuesto de que la información estructural está estrechamente relacionada con el destino metabólico del fármaco (afinidad de interacción en una región específica de la proteína diana). El enfoque de acoplamiento se ha utilizado ampliamente para identificar rápidamente compuestos líderes prometedores de grandes bibliotecas de compuestos. Las interacciones ligando-proteína requieren cambios estructurales para lograr mejores interacciones y pueden representarse con la ayuda de la simulación de dinámica molecular (Bliznyuk & Gready, 2006).

Por lo tanto, las simulaciones de dinámica molecular son utilizadas en combinación con algoritmos de acoplamiento para refinar aún más los complejos de acoplamiento para incluir otros parámetros, como los efectos de los disolventes, lo que produce candidatos a fármacos más precisos (Kazmi, 2019). En el Cuadro 2.2 se enlistan algunas de las herramientas que se utilizan para la simulación de acoplamiento proteína-ligando.

Cuadro 2.2 Herramientas de simulación de acoplamiento proteína-ligando

Software	Licencia	Descripción
AutoDock Vina	Gratis	Versión mejorada del popular software de acoplamiento de proteínas ligando, AutoDock 4, que utiliza nuevos algoritmos de cálculo.
BSP-SLIM	Gratis	Método de acoplamiento molecular ciego para estructuras proteicas de baja resolución. La estructura de la proteína se predice a partir de la secuencia y la conformación de acoplamiento.
DOCK 6.8	Gratis	Simulación flexible de acoplamiento proteína-ligando basada en un algoritmo de coincidencia geométrica.
Glide	Comercial	Un componente de las suites Schrödinger, que proporcionan un entorno integrador para varios campos científicos. Simulación de acoplamiento exhaustiva basada en búsquedas que admite el control de la velocidad de cálculo que afecta la precisión.
SwissDock	Gratis	Simulación de acoplamiento ciego basada en muestreo espacial diedro EADock. El campo de fuerza se calcula y evalúa usando CHARMM.

Desde otra perspectiva, el descubrimiento de una pequeña molécula que se une a una proteína relacionada con una enfermedad con alta afinidad es un paso clave en muchos proyectos de descubrimiento de fármacos. No obstante, las moléculas deben exhibir una alta actividad

biológica, baja toxicidad, acceso al sitio objetivo y una concentración sustancial en la diana terapéutica (Álvarez, 2011).

Estas características se encuentran fuertemente vinculadas a numerosos atributos moleculares fisicoquímicos que rigen a la estructura de la molécula, los cuales pueden ser determinados por quimioformáticos, herramientas computacionales que desarrollan diferentes descriptores moleculares extraídos de estructuras químicas. Una de ellas es conocida como SwissADME, que genera numerosos descriptores 1D y 2D relacionados con propiedades físico-químicas de principios activos (Daina *et al.*, 2017).

2.11.2 Importancia de descriptores moleculares fisicoquímicos

La herramienta SwissADME permite el cálculo de parámetros clave fisicoquímicos, farmacocinéticos, similares a fármacos y relacionados para una o varias moléculas (Daina *et al.*, 2017). La relación que se tiene entre la determinación de parámetros fisicoquímicos y realizar un análisis de acoplamiento molecular radica principalmente en elucidar como la presencia o ausencia de uno o varios atributos fisicoquímicos del principio activo a evaluar impacta en la actividad catalítica del enzima objetivo. Es por ello que se ha correlacionado fuertemente algunos descriptores fisicoquímicos en la elevada afinidad con enzimas que presenten una lipofilidad sustancial (por ejemplo, derivados de fostatoetanolamina) tal como se muestra en el Cuadro 2.3.

Cuadro 2.3 Atributos fisicoquímicos ideales para una alta afinidad de interacción con proteínas de alta lipofilia.

Atributo	Descriptor	Rango (Daina <i>et al.</i>, 2017)
Lipofilicidad	XLogP3	-0.7 – 5.0
Tamaño de molécula	Peso molecular (MW)	< 500 g/mol
Polaridad	Área de superficie polar topológica (TPSA)	20 – 130 Å ²
Solubilidad	Solubilidad molar en agua (Log S)	< 6
Saturación	Fracción en carbonos con hibridación sp ³ (Csp ³)	> 0.25
Flexibilidad	Enlaces rotativos	< 9

Cumpliendo con estas características se considera una posible importante afinidad de interacción con proteínas de alta lipofilia, no obstante, se requeriría estudios *in vitro* e *in vivo* para lograr contrastar este punto.

Finalmente, otros autores mencionan que para lograr esta correspondencia de interacción pueden incluirse algunos otros atributos como lo son (Harilal *et al.*, 2020): baja constante de disociación acida (pKa), donadores por puente de hidrogeno reducidos (H-bond), baja presencia de grupos funcionales básicos (CO, OH, COOH); analogía realizada en relación a la similitud que se tiene entre este tipo de proteínas y algunas membranas biológicas (barrera hematoencefálica) y entidades químicas plasmáticas (proteínas plasmáticas).

2.12 Principales objetivos (proteínas) para evaluar efecto antimicrobiano *in silico*

Los estudios *in silico* frecuentemente son conjugados con diseños experimentales *in vivo*, los cuales sirven para para entender de forma más explícita los fenómenos que se están dando y maximizar sus potencialidades, los compuestos antimicrobianos pueden causar un efecto bactericida o bacteriostático en algunos microorganismos esta acción frecuentemente se da en una región específica de la superficie del objetivo, convirtiéndose en el principal blanco, causando un efecto en las biomoléculas involucradas directamente con la regulación de funciones específicas del microorganismo en cuestión . Para las bacterias Gram+ y particularmente *Staphylococcus aureus*, las enzimas transpeptidasa (TP) y transglicosilasa (TG) se convierten en el principal objetivo de compuestos antimicrobianos al sintetizar la pared celular del microorganismo, función estructural encargada de preservar la integridad del mismo (Huang *et al.*,2012).

2.12.1 Principales enzimas identificadas como objetivos de acoplamiento molecular en *S. aureus*.

2.12.1.1 Transpeptidasa

Transpeptidasa es una enzima bacteriana cuya función es realizar enlaces cruzados en la formación de las cadenas que constituyen al peptidoglicano en la pared celular de *Staphylococcus aureus*, esta enzima también es conocida como carboxipeptidasa D-alanina-D- alanina por tener dos residuos de alanina en el Carbono 1 terminal.

Esta enzima consta de 406 aminoácidos fijados sobre la membrana plasmática y es necesario para la formación de la pared celular bacteriana. Por otro lado, se convierte en el principal blanco de inhibición por la acción de penicilinas y es por ello considerada una proteína ligadora irreversible a penicilina formando como resultado un altamente estable intermediario el cual carece de función sobre la síntesis de peptidoglicano (Lutkenhaus, 1993).

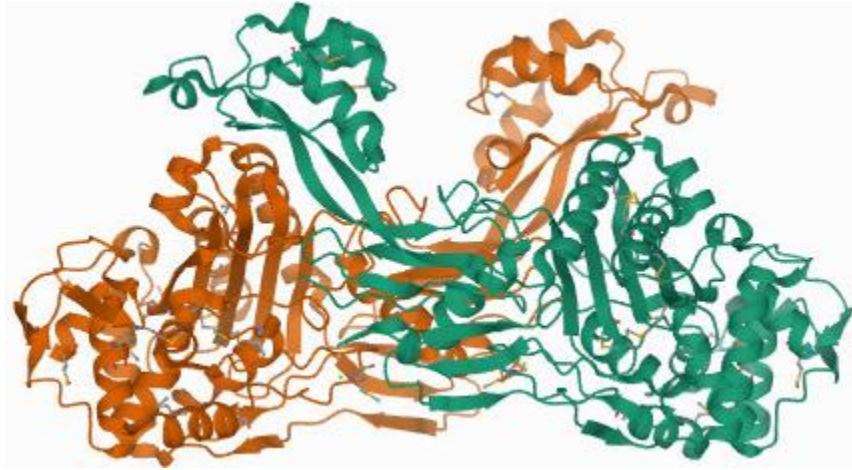


Figura 2.1 Estructura cristalina de resolución de los dominios de dimerización y transpeptidasa (residuos 39-608) de la proteína 1 de unión a penicilina de *Staphylococcus aureus*.

2.12.1.2 Transglicosilasa

Transglicosilasa son enzimas especializadas que facilitan la apertura controlada de la pared celular, éstas para actuar requieren un espacio y tiempos adecuados, lo cual se logra a través de acoplamiento en la polimerización de varias unidades de disacáridos: ello se logra en una reacción de transglicosilación. Consiste en la unión de cada unidad de disacárido (con su pentapéptido) unida a su respectivo Lip-P-P, con el extremo libre (reductor) de una cadena preexistente que a su vez está unida a otra molécula de Lip-P-P (Vázquez *et al.*, 1986).

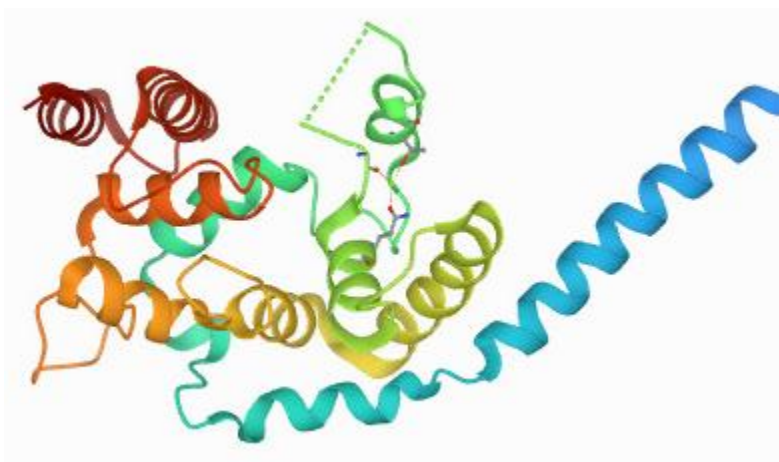


Figura 2.2 Estructura cristalográfica de transglicosilasa unida a la membrana de *Staphylococcus aureus*.

CAPÍTULO 5. HIPÓTESIS

Los extractos extracelulares de actinobacterias del género *Streptomyces spp.* aisladas de sedimento marino, son reconocidas por ser productoras de compuestos con actividad antimicrobiana, por lo que las cepas de *Streptomyces* elegidas para este estudio producirán compuestos bioactivos que tendrán actividad biológica a través de la inhibición del crecimiento de al menos una cepa de interés industrial.

CAPÍTULO 4. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años ha crecido la demanda por el consumo de alimentos naturales, frescos y desde luego mínimamente procesados los cuales se encuentren libre de conservadores sintéticos. Al tratar de alimentos con estas características obliga a extremar buenas condiciones de manipulación, así como también aplicar técnicas que permitan la inhibición del crecimiento microbiano y que sean compatibles con el producto y la salud. Existen un sin fin de bacterias relacionadas con la industria de los alimentos, algunas de ellas encargadas de la descomposición y contaminación de los diferentes productos, en otros casos estos son utilizados como vehículos para la infección en los consumidores, *Staphylococcus aureus* a través del tiempo ha demostrado una gran capacidad para desarrollar resistencia, es causante de enfermedades graves y por tal motivo esta bacteria también ha sido identificada como crítica en el ámbito clínico, despertando el interés en la búsqueda de compuestos antimicrobianos que ejerzan un control en este tipo de microorganismos y conduciendo a la exploración a lugares poco estudiados como el lecho marino. Las actinobacterias pertenecientes al género *Streptomyces* se han destacado por la alta producción de metabolitos secundarios con actividad biológica, principalmente la producción de compuestos extracelulares de naturaleza proteica, capaces de ofrecer una baja resistencia, es por ello que caracterizar y evaluar los extractos de cepas aisladas de sedimento marino, nos ponen ante una posibilidad viable para el descubrimientos de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana y dar el primer paso para contribuir a resolver el problema de resistencia bacteriana y de bioseguridad alimentaria.

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general.

Caracterizar y evaluar *in vitro* e *in silico* la actividad antimicrobiana de productos extractos extracelulares de *Streptomyces spp.*

5.2. Objetivos específicos

1. Obtener extractos extracelulares de *Streptomyces spp* mediante extracción acuosa a partir de un medio sólido.
2. Evaluar actividad antimicrobiana de un extractos extracelulares de *Streptomyces spp.*
3. Establecer si los productos extracelulares son de naturaleza proteica mediante electroforesis SDS-PAGE
4. Evaluar *in silico* el efecto de diferentes compuestos con actividad antimicrobiana y dilucidar el mecanismo de acción contra cepas de *Staphylococcus aureus*.

CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Microorganismos utilizados en el desarrollo del proyecto.

Se utilizaron 3 cepas de actinobacterias aisladas de sedimento marino de la Bahía de Pichilingue en la costa de La Paz, B.C.S., las cuales forman parte de la colección de bacterias marinas del laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (IPN-CICIMAR). En el presente trabajo se utilizaron las cepas identificadas (509PI, 517PI, 515PI) con la clave original del cepario. La colección se encuentra conservada en caldo marino con glicerol al 30% a -80° C (Malik *et al.*, 1991)

6.2 Microorganismos utilizados para la detección de actividad.

Los presentes microorganismos fueron utilizados como diana para identificar la actividad biológica en cada uno de los extractos obtenidos de las cepas de estudio (*L. monocitogenes* ATCC 15313, *S. typhimurium* ATCC 1224, *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 33862-25923).

6.3 Medios de cultivo empleados en el desarrollo del proyecto

Cuadro 6.1 Medios de cultivo empleados en el desarrollo del proyecto.

Nombre del medio	Composición	Función
Agar Müeller-Hinton (AMH):	Formulación, extracto de carne 2 g/L, hidrolizado de caseína 17.5 g/L, almidón 1.5 g/L, agar 17 g/L, disueltos en agua destilada, pH 7.3)	Para el crecimiento de las bacterias reveladoras de actividad antimicrobiana.
Agar Marino (AM):	Formulación, extracto de levadura 1 g/L, peptona de carne 5 g/L, agar 17 g/L, sulfato ferroso 0.0001 g/L, agua de mar.	Para el crecimiento de las actinobacterias.
Caldo Marino (CM)	Formulación extracto de levadura 1 g/L, peptona de carne 5 g/L, sulfato ferroso 0.0001 g/L, agua de mar.	Para el crecimiento de las actinobacterias.
Agar y caldo infusión de corazón y cerebro (BHI):	Formulación, infusión de cerebro de ternero 200 g/L, infusión de corazón de ternero 250 g/L, proteosa peptona 100 g/L, dextrosa 2.0 g/L, NaCl 5.0 g/L, Na ₂ HPO ₄ 2.5 g/L, Agua Destilada 1000 mL.	Para el crecimiento de <i>Listeria monocitogenes</i> .

Agar <i>Salmonella Shigella</i> (SS).	Formulación, extracto de carne bovina 5.0 g/L, digerido pancreático de caseína 2.5 g/L, digerido peptídico de tejido animal 2.5 g/L, lactosa 10. g/L, sales billiaries 8.5 g/L, citrato sódico 8.5 g/L, tiosulfato sódico 85 g/L, citrato férrico 1.0 g/L, rojo neutro 0.025 g/L, Agar 13.5 g/L, verde brillante 0.330 mg/L con pH de 7.2	Para el crecimiento de <i>salmonella</i> .
---------------------------------------	---	--

6.4 Etapa 1

6.4.1 Reactivación de actinobacterias de interés

La reactivación de las cepas correspondientes a *Streptomyces spp.* identificadas con clave 509PI, 517PI, 515PI, fue dada de la siguiente manera. Se realizó una siembra por estría cruzada en placa, en Agar Tripticasa Soya (TSA) al 3%, se partió de un inóculo conservado en ultracongelación, las placas fueron incubadas a 35°C durante 7 días para su crecimiento.

6.4.2 Siembra en medio líquido:

A partir de cultivos en placa se inocularon tubos con caldo TSA con 2 o 3 asadas y fueron incubados en agitación a 35° C durante 5 días a 1300 rpm. Al término del periodo de incubación se verificó la presencia de biomasa, para continuar escalando el cultivo a 10 ml en caldo TSA. Se utilizó un inóculo del 10 %, los tubos se incubaron en las mismas condiciones que el preinóculo.

6.4.3 Crecimiento de actinobacterias sobre membrana de celofán.

En cajas de Petri con Agar marino (AM), se colocó una membrana de papel celofán (polímero natural derivado de celulosa) previamente hidratada con agua destilada estéril cubriendo la totalidad de la superficie. Posteriormente se depositaron 50 µL de esta suspensión celular

activa sobre la membrana, se llevó a cabo una siembra masiva con hisopo, el cultivo fue incubado durante 7 días a 35° C. Al término el periodo de incubación se procedió a la cosecha de la biomasa deslizando una espátula sobre la membrana para realizar la cosecha de la biomasa, posteriormente esta fue suspendida en una solución salina tampón de fosfatos (PBS); (NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, Na₂HPO₄ 1.44 g/L y KH₂PO₄ 0.24 g/L), manteniendo una relación de 0.2 g de biomasa por 1 mL de PBS (Mayo Perez, 2020).

6.4.4 Obtención de un extracto extracelular de actinobacterias del género *Streptomyces spp.* Las suspensiones celulares en PBS fueron filtradas en membranas (Ministar®) con un tamaño de poro de 0.2 µm, separando las células del medio y de esta manera obtener únicamente los productos extracelular (ECP), se conservaron en congelación a -20° C para los siguientes análisis.

6.4.5 Técnica de antibiosis.

El bioensayo de evaluación de actividad antimicrobiana se realizó con cepas patógenas de referencia (*L. monocitogenes* ATCC 15313, *S. typhimurium* ATCC 1224, *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 33862). Cada una de las cepas diana seleccionadas se sembraron masivamente en placas de TSA, se incubaron 18 horas a 35° C. Posteriormente se prepararon suspensiones celulares en solución salina al 0.85 % ajustando la concentración celular a 0.5 en la escala de McFarland, lo cual representa 1x10⁸ unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL), placas de agar Mueller-Hinton se sembraron masivamente con cada una de las cepas diana.

6.5.1 Digestión enzimática y evaluación de actividad antibacteriana

Se efectuaron diluciones seriada base 2 de los filtrados de los cultivos obtenidos mediante la técnica de crecimiento sobre una membrana polimérica. Consecutivamente se añadieron 20 µL contemplando todas las disoluciones sobre un cultivo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La actividad de la máxima dilución a la cual se generó un halo de inhibición de crecimiento de los microorganismos diana fue determinada como unidad arbitraria (Harting *et al.*, 1972). Las muestras se sometieron a digestión con proteinasa K y con tripsina a una concentración de 100 µg/mL durante 1 hora a 37° C, la albumina sérica bovina (BSA) fue usada como control positivo para establecer la eficacia de la proteinasa K y la tripsina (Ebbensgaard *et al.*, 2015).

6.4.7 Separación de compuestos por electroforesis (SDS-PAGE).

Los geles fueron preparados tomando como base la metodología descrita por Shunyan et al. (2016) que permite separar proteínas de un rango de masa molecular de 1 a 100 kDa, mediante la técnica sds-page, fundamentada en la distinta velocidad de migración de proteínas a través del gel de poliacrilamida con condiciones como se muestra en el Cuadro 6.2. Durante la aplicación de un campo eléctrico, se empleó un amortiguador catódico (Tris-base 0.1 M pH 8.5, Tricina 0.1 M y SDS 0.1%) y un amortiguador anódico (Tris-HCl 0.2 M pH 8.9). Se utilizó 1 μ L del patrón de peso molecular Thermo Scientific; con pesos entre los 1.7-40 kDa, 40 μ L de muestra para los geles destinados a la autografía. El sistema se sometió inicialmente a un voltaje de 30 V para el gel concentrador y posteriormente a un voltaje de 100 V para el gel separador hasta que el frente de corrida alcanzó el borde inferior de los geles.

Cuadro 6.2 Condiciones de elaboración de gel de poliacrilamida

Gel concentrador 4%		Gel separador 12%
Agua destilada	> 1.270 MI	2.175 MI
Acrilamida	>0.2mL	1.5MI
Tris 0.5M, Ph=6.8	>0.5mL	-----
Tris 1.5M, pH=8.8	>-----	1.250MI
SDS 10%	>20 μ L	50 μ L
APS	>20 μ L	50 μ L
TEMED	>5 μ L	6 μ L
Glicerol 10%	>-----	0.453 mL

6.4.8 Revelado del gel

Los geles se cortaron a la mitad, una parte se tiñó durante 1 h con solución de coomassie G-250 en agitación, posteriormente se retiró la solución y se procedió a retirar el excedente a través de múltiples lavados. Se mantuvo en agitación llevando a cabo cambios frecuentes de agua que le permitieron al gel decolorar el excedente, identificando un gel decolorado al apreciar fondo incoloro. La otra parte del gel se colocó en agua destilada y se mantuvo en agitación durante 1 hora, haciendo recambios periódicos de agua para asegurar que se eliminaran todos los restos de SDS (Hermann Schägger, 2006).

6.4.9 Activación del inóculo

Se reactivó el inóculo en 5 mL caldo de MH estéril, agregando una fracción del cultivo bacteriano. Posteriormente se incubó a 37°C y 80 rpm hasta lograr que la turbidez de la suspensión microbiana se igualara con el estándar de 0.5 de McFarland, la turbidez fue comparada colocando los tubos a contraluz, si la turbidez es mayor se reduce utilizando caldo estéril. Complementar realizando la lectura a 625 nm, logrando una lectura entre 0.08 y 0.13, para obtener una concentración de 5×10^6 UFC/mL, el inóculo se llevó a una dilución de 1:20.

6.5 Autobiografía del perfil electroforético.

Se preparó una solución salina al 0.85 % en la cual se tomó la cantidad necesaria de células de *S. aureus* ATCC 25923 para ajustar a una densidad óptica al 0.5 en la escala de McFarland, el gel de acrilamida que no fue teñido se colocó sobre el medio sólido MH, posteriormente se inocularon 500 µL de la suspensión celular de *S. aureus* a tubos con 10 mL de medio MH a una temperatura de 50°C y los geles fueron cubiertos con el medio, las placas se incubaron a 37°C por 24 horas, una vez terminado el periodo de incubación se compararon los perfiles de bandas de los geles teñidos con Coomassie G-250 con la zona donde se observa el halo de inhibición para fines de definir el peso del probable compuesto responsable de la actividad antimicrobiana (Balouirin *et al.*, 2012).

6.5 Etapa 2

6.5.1 Estudio *in silico* para transglicosilasa y transpeptidasa

El estudio de acoplamiento molecular se hizo entre el compuesto identificado como derivado de fosfatoetanolamina para determinar las posibles interacciones que pueden presentarse entre estos compuestos y las proteínas en cuestión, para ello se realizaron las metodologías propuestas por Chávez *et al.*, (2018); Ortiz *et al.*, (2016). El ligando fue identificado como ([2R)-1-[2-aminoethoxy (hydroxy)phosphoryl]oxy-3-[(Z)-hexadec-1-enoyl]propan-2-yl](6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-6,9,12,15-tetraenoate) de acuerdo a lo reportado por Mayo Pérez (2020) y obtenido de la base de datos de moléculas químicas PubChem, siendo nombrado por simplicidad como derivado de fosfatoetanolamina. La minimización de energía fue realizada con el principio de mecánica molecular utilizando el algoritmo Hartree-Fock (Software UCSF Chimera 1.14). Una vez terminado el cálculo, la estructura final se guardó en el formato mol2 para su posterior manipulación. La estructura 3D de transpeptidasa y transglicosilasa en formato PDB se obtuvo del banco de datos de proteínas (Protein Data Bank). La identificación enzimática para la transpeptidasa de acuerdo con el Recurso de Proteína Universal (UniProt) es 5TRO, mientras que para transglicosilasa es 3VMQ. Finalmente, después de obtener el ligando y proteínas diana, el servicio de sitio web del Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) realizó y optimizó el procedimiento de acoplamiento. Los resultados del acoplamiento molecular fueron visualizados en UCSF Chimera y se evaluaron mediante el parámetro *FullFitness* (FF, espontaneidad de la formación del complejo enzima-ligando), calculado por el promedio del 30 % de las “n” energías más favorables de un clúster, empleado para reducir el riesgo de pocos complejos que penaliza a todo un clúster. Posteriormente aquel clúster con FF más favorable fue utilizado para determinar los residuos implicados en la generación del complejo y de esta manera determinar sus interacciones más espontáneas en términos energéticos y localizando las zonas de acción con mayor efecto y por consecuencia responsable de la inhibición.

6.5.1 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos serán procesados mediante el análisis de ANOVA de una vía con una prueba de Tukey para comparar la significancia entre todos los tratamientos empleando un valor de $p= 0.05$.

CAPÍTULO 7. RESULTADOS

7.1 Desarrollo de la prueba de actividad mediante el método de difusión en placa de los productos extracelulares (PEC) de las cepas identificadas con el código 509PI, 515PI, 517PI.

Cuadro 7.1.- Organismos utilizados en prueba de actividad (*L. monocitogenes* ATCC 15313, *S. typhimurium* ATCC 1224, *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 33862-25923).

Microorganismo	Prueba de actividad	ATCC	GRAM
<i>L. monocitogenes</i>	Negativo	15313	-
<i>S. typhimurium</i>	Negativo	1224	-
<i>E. coli</i>	Negativo	8739	-
<i>S. aureus</i>	Positivo	25923	+
<i>S. aureus</i>	Positivo	33862	+

Durante la prueba de actividad por el método de difusión se interpretó como resultado negativo la ausencia de halo de inhibición respecto al microorganismo en prueba e identificando como resultado positivo la presencia de halo de inhibición, logrando observar que los productos extracelulares (PEC) de las cepas identificadas con el código 509, 515, 517 mantenían actividad en presencia de *S. aureus* ATCC-25923. El comportamiento de ausencia de actividad en bacterias Gram negativas se deben principalmente a los cambios estructurales a nivel celular, con base en los estudios realizados se sabe que este tipo de extractos puede interactuar principalmente con un blanco general basado en la carga neta de la propia bacteriocina con el cual crea una diferencia de potencial a través de la membrana causando el denominado paro anular o dicho en otras palabras como antibiótico de barrera, logrando su interacción en la intervención de síntesis de peptidoglicano e iniciar con un efecto inhibitorio (Wang, 2014). Mientras en las bacterias gram negativas debido a la envoltura didérmica con una composición basa principalmente en una doble capa lipídica evita dicha interacción. Sin embargo en el microorganismo *L. monocitogenes* ATCC 15313 se observó que a pesar de ser Gram + mostró resistencia a la inhibición, según estudios realizados por

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hung & Miller (2009) esto principalmente se debe a un mecanismo de respuesta que consiste en la sobreexpresión del gen *EIIItMan* (PTS) codificado por el operón *mpt* siendo el principal transportador de glucosa en *Listeria monocytogenes*, así como también mantiene una participación primordial en la represión de catabolitos de carbono, los cuales son mediados por glucosa creando una regulación a la baja de este gen y al ser este el receptor para bacteriocinas de clase 2 manifiesta la ausencia de interacción bacteriocina- cepa blanco (Wang, 2014). Es por ello que dicha condición podría describir el fenómeno observado en el cuadro ya que, al no existir un receptor para esta bacteriocina, solo se genera una interacción parcial que no genera un efecto inhibitorio.

La presencia de actividad ejercida por el producto extracelular (PEC) de las cepas identificadas con los códigos 509, 515, 517 (Figura 7.1), denotaron las características antimicrobianas de manera cualitativa en presencia de *S. aureus* ATCC 25923 y 33862 deduciendo así la presencia de compuestos bioactivos al intervenir un halo inhibitorio en diferentes proporciones entre los productos extracelulares utilizados, evidenciando a las cepas 509 y 517 como principales productoras de compuestos antimicrobianos relacionados directamente con la concentración. Fueron observados por 3 días y la capacidad de inhibición tuvo un comportamiento similar a los resultados obtenidos por Ligia, Corrales-García (2010) donde resultó tener actividad antimicrobiana a partir de extractos de *Streptomyces* a una concentración relativa de 10,67 µg/mL, un halo de inhibición de 8 mm sobre microorganismos considerados como patógenos, y un peso molecular localizado en un rango entre 2 KDa y 4.6 KDa. Estos resultados también fueron comparados con el trabajo realizado por Mayo-Pérez (2020) donde se identificó actividad antimicrobiana por halo de inhibición de un extracto extracelular obtenido a través de una cepa aislada de sedimento marino en presencia de *S. aureus* ATCC 25923, deduciendo la producción de compuestos antimicrobianos de capaces de interferir con el crecimiento bacteriano, principalmente con bacterias Gram +.

Durante la prueba de actividad para *S. aureus* ATCC 33862 se evidenció que a pesar de ser una cepa aislada del medio clínico con una condición multirresistente, los PEC tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento, produciendo halos de hasta 8.5 mm de diámetro, por lo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

que se deduce que la mutación bacteriana no afecta la interacción bacteriocina-cepa blanco, cabe mencionar que resultados no considerados para este trabajo también evidenciaron que los PEC inhibieron el crecimiento de *Cándida albicans* un hongo dimórfico perteneciente al Phylum Ascomycota, lo cual denota sus capacidades fungicidas dada a través de la inhibición de la formación de blastosporos dada por la regularización a la baja del gen receptor de acuerdo a los estudios realizados por Khalid & Keller (2021) se puede deducir que debido a la etapa la interacción pudiera estar presentando un mecanismo de acción fungistático.

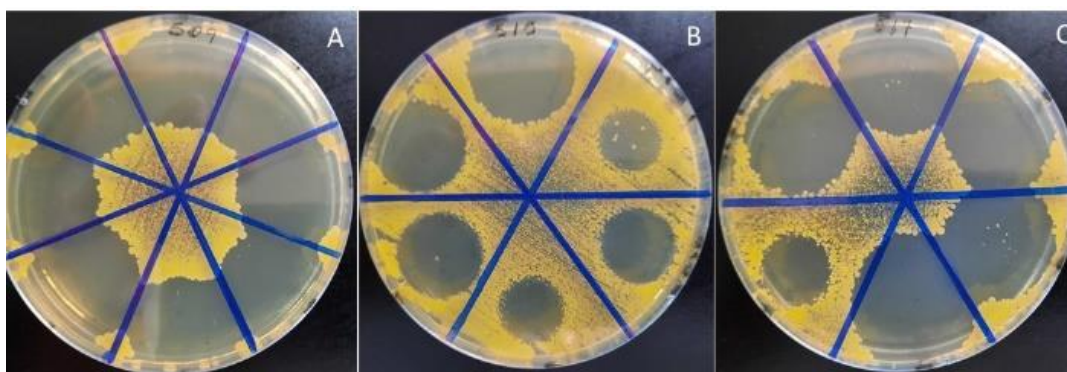


Figura 7.1. Prueba de actividad antimicrobiana realizada con los PEC obtenidos de las cepas 509 (A), 515 (B) 517 (C). La cepa blanco utilizada fue *S. aureus* ATCC 25923.

7.2 Análisis de fracciones activas mediante digestión de proteinasa K y tripsina.

Durante este ensayo se utilizaron PEC crudos de las cepas 509 y 517 así como también diluidos partiendo del supuesto de la unidad arbitraria de actividad planteado por Harting *et al* (1972), para lo cual se espera tener un comportamiento similar, consecutivamente los PEC fueron sometidos al tratamiento de digestión enzimática con proteinasa K, se logró observar cómo los extractos en presencia de proteinasa K fueron digeridos parcialmente y evidenciando la ausencia de actividad (Figura 7.2) al término de la digestión, se observa que probablemente el compuesto responsable de la actividad es de naturaleza proteica debido a que esta proteasa tiene un amplio espectro de digestión, sin embargo en presencia de tripsina estos fueron parcialmente digeridos y durante la prueba de actividad se logró observar la presencia de halo de inhibición con un diámetro mucho menor (Figura 7.2), deduciendo que la actividad del PEC observada, se debe a que el compuesto no fue digerido en su totalidad debido a la resistencia al tratamiento de digestión con tripsina (Ebbensgaard *et al.*, 2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos durante este experimento fueron comparados con lo publicado por Ong et al. (2014) y para tales efectos ostentaron que determinados péptidos que presentan abundancia D-aminoácidos en su estructura pueden resultar parcialmente resistentes al tratamiento con proteasas.



Figura .7.2 Prueba de actividad realizada con el PEC de la cepa 517 sometida a hidrólisis con Proteinasa K (A) y Tripsina (B) a una concentración final de 1 mg/mL. La cepa blanco utilizada fue *S. aureus* ATCC, las placas se incubaron a 30° C durante 24 horas. K proteinasa K; T tripsina; 1:8 y 1:64 la dilución realizada al extracto.

7.3 Bioautografía de los PEC cepas 509 y 517 de *Streptomyces* mediante un perfil de electroforesis G-SDS-PAGE.

En la bioautografía SDS-PAGE realizada a partir de los compuestos extracelulares de las cepas 509 y 517 (Figura 7.3) se observa una amplia zona de inhibición, ubicada delante del frente de la corrida electroforética, lo que sugiere que los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana son compuestos proteicos de bajo peso molecular, lo cual gracias a esta técnica se logró estimar un tamaño que oscila del 1.7 a los 4.5 KDa. Los resultados obtenidos fueron comparados con los estudios realizados por Rocha *et al.* (2013) donde se obtuvieron péptidos a partir de proteínas lácticas, demostrado actividad inhibitoria donde se encontró que los péptidos de peso molecular inferior a 3 kDa provenientes de la hidrólisis de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

las caseínas bovina y ovina presentaron el mayor efecto inhibitorio sobre las bacterias ensayadas como *S. aureus*, así mismo mediante los estudios realizados por Ferrer Silva (2011) podemos suponer de manera hipotética que basándonos en el rango de peso que presentan los péptidos activos puede existir la presencia principalmente de residuos de aminoácidos como arginina y lisina y que estos a su vez pueden estar relacionados directamente con la actividad y la resistencia a la digestión enzimática.

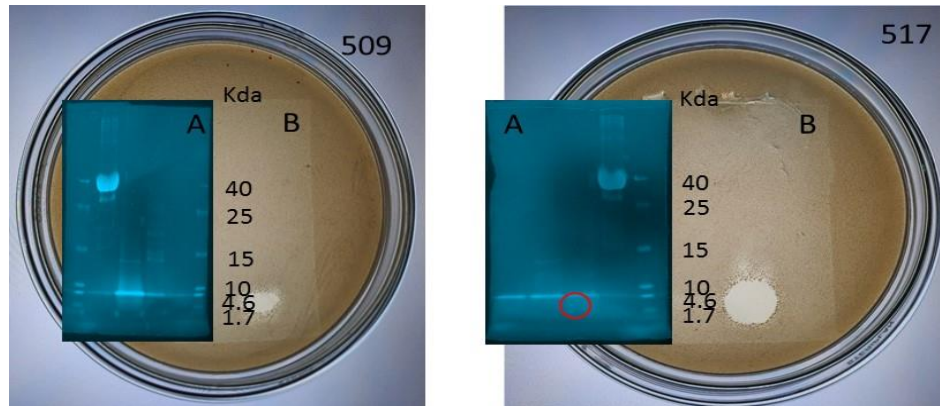


Figura 7.3 Perfil electroforético del sobrenadante de cultivo de las cepas 509 y 517- Electroforesis SDS-PAGE Bioautografía (figura A). Muestra 509. Carril 1.- Marcador; Carril 2.- Albúmina sin digerir; Carril 3.- Muestra sin digerir; Carril 4.- Tripsina 1:8; Carril 5.- Proteinasa K 1:8; Carril 6.- Marcador. (figura B). Muestra 517: Carril 1.- 1:8 Proteinasa K; Carril 2.- 1:8 Tripsina; Carril 3.- Muestra sin digerir; Carril 4.- Albúmina sin digerir; Carril 5.- Marcador.

Estos resultados fueron comparados con los obtenidos por Mayo (2020) donde logró obtener un comportamiento similar al pasar por todo este tipo de indicadores que resultaron en la probable presencia de compuestos activos de naturaleza proteica en una cepa que posee las mismas características taxonómicas y la cual fue aislada de sedimento marino al igual que las cepas utilizadas en esta investigación. Mayo-Perez (2020) mediante un estudio de caracterización cromatográfico encuentra que la sustancia activa es una mezcla de al menos cuatro compuestos, el comportamiento cromatográfico y electroforético permiten inferir que comparten características de peso molecular y de polaridad, existen reportes bibliográficos de familias de compuestos con características (fórmula molecular, PM, polaridad) con tiempos de retención muy próximos o mezclas de isómeros (mezclas racémicas) que son

difíciles de separar, ya que sus propiedades químicas y físicas si no son iguales, son muy similares, lo que da origen en muchas ocasiones a bandas cromatográficas muy anchas en el caso de TLC o picos cromatográficos muy amplios y en el mejor de los casos muy cercanos (Gil & Schurig, 1994).

En la revisión bibliográfica sobre compuestos activos de origen bacteriano específicamente de *Streptomyces*, se encontró un trabajo donde son producidos una serie de compuestos derivados del Dinactin, como es el caso del compuesto ([[(2R)-1-[2-aminoethoxy(hydroxy)phosphoryl]oxy-3-[(Z)-hexadec-1-enoxy]propan-2-yl](6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-6,9,12,15-tetraenoate) denominado también como derivado de fosfatoetanolamina y precursor de dinactin este compuesto y sus aductos NH_4^+Na^+ y K^+ muestra patrones similares de fraccionamiento en sus espectros de masas a los observados para los compuestos con un peso molecular de 803.55 (Shaaban *et al.*, 2014). El Dinactin es un macrólido (polieter) con un comportamiento cromatográfico similar al obtenido para la mezcla descrita por Mayo-Perez (2020) donde los tiempos de elución son muy cercanos, por lo que suponemos que en la muestra activa obtenida en este trabajo exista Dinactin y algunos de sus derivados, aducto a algunos aminoácidos.

A través de un estudio cromatográfico Mayo-Perez (2020) establece que los patrones de fraccionamiento de masas de un producto extracelular de *Streptomyces* son similares a la presencia de Dinactin aducto a NH_4^+ , Na^+ y K^+ según lo descrito por Silva *et al.* (2004), atribuyéndosele a este último propiedades antibacterianas, por lo que se le responsabiliza directamente la actividad antimicrobiana, cabe mencionar que durante el análisis de Mayo-Perez (2020) observaron al menos 4 compuestos más, con una diferencia en tiempos de elución muy corta, deduciendo la presencia de isómeros aductos en una mezcla racémica perteneciente al extracto extracelular, siendo participes y/o precursores en la formación de dinactin, el cual ejerce actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* interaccionando con enzimas relacionadas directamente con la síntesis de peptidoglucano y residuos lipídicos para la formación de la pared celular, debido a las semejanzas obtenidas en este estudio sobre los patrones del perfil electroforético SDS-PAGE podemos suponer la presencia de la ya mencionada mezcla racémica de dinactin en los extractos extracelulares evaluados. Para la evidencia de este fenómeno en esta investigación se propuso un estudio *in silico* que nos

permitirá conocer su potencial como un agente antimicrobiano y poder estimar el principal mecanismo de acción por el cual este actúa para inactivar bacterias Gram +.

7.4 Análisis de acoplamiento molecular *in silico*

7.4.1 Acoplamiento molecular en función de máxima espontaneidad con transglicosilasa (TG).

Como punto de partida se consideró el compuesto activo identificado en el trabajo realizado por Mayo-Pérez, (2020) con una cepa de *Streptomyces* con el mismo origen de aislamiento, Como resultado del estudio *in silico*, se obtuvieron diferentes acoplamientos y se utilizaron 4 ligandos, compuesto activo de estudio y 3 controles, los cuales se ha demostrado su actividad antibiótica de acuerdo con varios autores, siendo dos enzimas identificadas como las principales responsables de la interacción durante su efecto inhibitorio (Calvo & Martínez, 2009).

En el Cuadro 7.4 se muestra el análisis de acoplamiento molecular de los ligandos expuestos con las proteínas en cuestión, en el cual se aprecia que el compuesto denominado como derivado fosfatoetanolamina requiere energías superiores en comparación con los testigos utilizados; lo cual hasta este punto se estaría concluyendo que este compuesto presenta una afinidad de interacción preferente hacia alguna de las dos enzimas, lo cual expone su capacidad antibiótica prometedora al presentar la mayor energía de espontaneidad en comparación con los controles utilizados además. Cuadro

7.2 Acoplamiento molecular expresado como la energía total del complejo de unión (fullfitness).

Ligando	Transpeptidasa	Transglicosilasa
	(Kcal/mol)	
Penicilina (Selectivo a transpeptidasa)	-2899.6290	-2023.5435
Ceftriazona (Selectivo a transpeptidasa)	-2558.5222	-2004.8081
Vancomicina (Selectivo a Transglicosilasa)	-2585.002	-1702.2153
Derivado de fosfatidiletanolamina	-3146.2188	-2261.4993

La transpeptidasa (TP) bacteriana y la transglicosilasa (TG) son esenciales para las síntesis de la pared celular, la mayoría de los antibióticos que han sido desarrollados han encaminados a transpeptidasa, sin embargo el problema de la resistencia de los antibióticos surgido y causado una gran amenaza en la infección bacteriana, es por ello que se ha considerado que la TG también es un objetivo excelente en cuestión y no se han desarrollado antibióticos que interactúen directamente sobre este objetivo (Huang *et al.*, 2012).

7.4.2 Propiedades fisicoquímicas de los ligandos durante el acoplamiento molecular

Las interacciones durante el acoplamiento molecular al igual que todo tipo de reacción *in vivo* se rigen por las propiedades fisicoquímicas propias de la molécula, en el Cuadro 7.2 se sintetiza la información de cada uno de los ligandos expuestos en este trabajo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 7.3 Propiedades fisicoquímicas obtenidas del descriptor molecular SwissADME.

Compuesto/ Características	PM ^a	AP ^b	FC ^c	ER ^d	TPSA ^e	Lipofilicidad ^f	AAH ^g	AD ^h
Derivado de fosfatoetanolamina	695.95	48	0.72	36	127.12	8.90	8	2
Vancomicina	1419.25	30	0.42	14	530.49	-2.61	29	19
Penicilina	334.39	23	0.44	5	112.01	1.83	4	2
Ceftriaxona	554.58	36	0.33	9	293.80	-1.27	10	4

^aPeso molecular g/mol

^bNúmero de átomos pesados

^cFracción por carbono con hibridación sp³

^dEnlaces rotativos

^eSuperficie de área polar (tpsa) relacionado con polaridad(Å²)

^fLipofilicidad (coef. de partición o/w) xlogp₃

^gNúmero de átomos aceptados por puente de hidrogeno

^hNúmero de átomos donados por puente de hidrogeno

El peso molecular es un criterio importante para determinar el tamaño de la cadena, ya que mayor peso molecular concierne a un mayor tamaño, debido a la naturaleza estadística que rige las reacciones de polimerización y así mismo el peso molecular contribuye incrementando sus propiedades funcionales, pudiendo favorecer mayor superficie de área polar e interacción, haciendo uso de átomos o moléculas polares como el oxígeno, nitrógeno etc., mayor número de anillos y más enlaces con posibilidad de rotación libre que brindaran

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

flexibilidad a la molécula, el compuesto derivado de fosfatoetanolamina magnifica en su mayoría a una afinidad hidrofóbica brindada por los grupos fosfóricos presentes en la estructura.

Es por ello que la lipofilicidad se convierte en un factor muy importante para el análisis, el fosfatoetanolamina presenta una considerable lipofilicidad, del tal forma que promueve la unión a una gran parte de la proteína que presenta esta particularidad, además en términos de polaridad el compuesto presenta diferentes regiones que presentan esta característica, grupos funcionales y/o heteroátomos que pueden promover la interacción con residuos de aminoácidos y así logrando implicar en principios de regulación alostérica.

El compuesto denominado como derivado de fosfatoetanolamina (ligando) demostró acoplamiento con la enzima mediante interacciones hidrofóbicas con una distancia máxima de 2.25 Å, de acuerdo con los resultados realizados por Huang (2012) la enzima TG tiene dominios específicos con actividad catalítica partiendo en las siguientes regiones; del aminoácido serina 98 a glicina 109, glicina 130 a lisina 140, arginina 153 a ácido glutámico 157, lisina 171 a asparagina 180, arginina 241 a leucina 246.

De tal manera que la interacción del ligando con TG no se dió en la región comprendida por centro activo; sin embargo, se deduce que esta condición está desarrollando una inhibición de la enzima mediante un comportamiento alostérico ya que los aminoácidos identificados en TG se encuentran adyacente a la región activas, las características fisicoquímicas del ligando descritas en el apartado 7.6.2 preceden este fenómeno observándolo de manera gráfica en la Figura 7.4

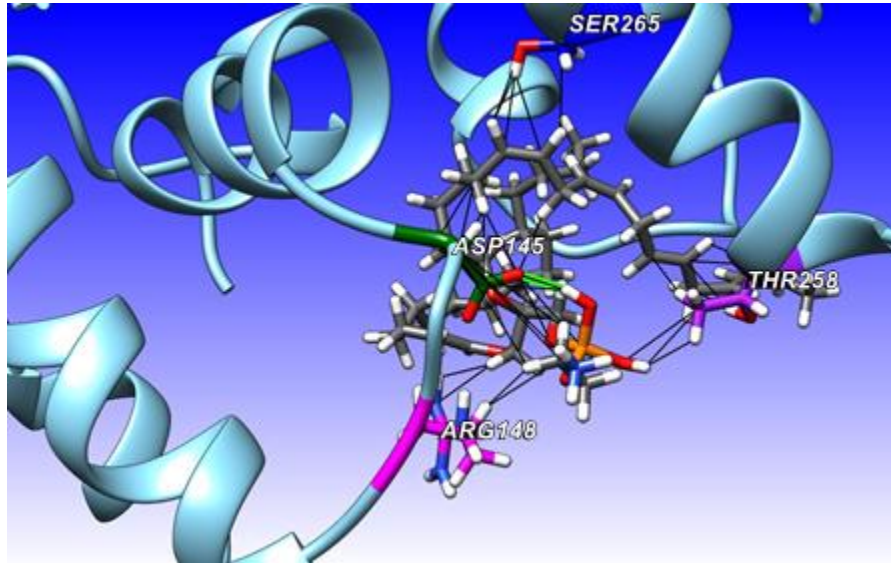


Figura 7.4 Simulación acoplamiento molecular de enzima transglicosilasa (TG) para el compuesto activo derivado de fosfatoetanolamina (1-(1Z-hexadecenyl)-2-(6Z,9Z,12Z,15Z-octadecatetraenoyl)-glycero-3-phosphoethanolamine) en estado basal. La interacción está dada bajo el acoplamiento con 4 aminoácidos representados con colores: Rosa magenta-arginina (ARG148), violeta-tirosina (Thr258), verde oscuro-acido aspártico (Asp145), azul-Serina (Ser265), azul claro-resto de TG.

Por otra parte el control utilizado *in vivo* ceftriaxona (cefalosporinas) demostró su actividad inhibitoria a través de la interacción en al menos un residuo aminoacídicos ligados directamente al sitio activo de TG (lisina 153), como se observa en la Figura 7.5, a pesar de que para ceftriaxona es más probable que su actividad sea ejercida sobre el TP dado que posee una menor energía de espontaneidad, con una concentración específica podría alcanzar la diana y efectuar teóricamente un efecto positivo (Urbina *et al.*, 2012).

Este suceso es presentado en algunos casos donde el patógeno es resistente a ceftriaxona por la acción de B-Láctama al ser minimizado; sin embargo, con un menor efecto tiene capacidad de poder acoplarse la TG. El control interactúa también con residuos que no se encuentran directamente dentro del dominio del centro catalítico, condición que se puede atribuir al número de átomos aceptadores por puente de hidrógeno confiriéndole su acoplamiento a través de la fuerza inminente electrostática entre un átomo electronegativo y un átomo de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

hidrógeno, así como también el efecto hidrofóbico ejercido por las cadenas laterales de aa (Bautista *et al.*, 2017).

Esto a su vez comparado con los aminoácidos del derivado de fosfatoetanolamina que interactúan también con condiciones de tipo hidrofóbicas fuera del centro activo se encuentran cerca de la región, por lo que manera teórica explica el comportamiento presenciado en el estudio *in vitro*, sin embargo las características fisicoquímicas expresadas en el apartado 7.6.2 por el derivado de fosfatoetanolamina están muy por encima de ceftriaxona dando la oportunidad de una mayor interacción de este tipo (Nguyen, 2014).

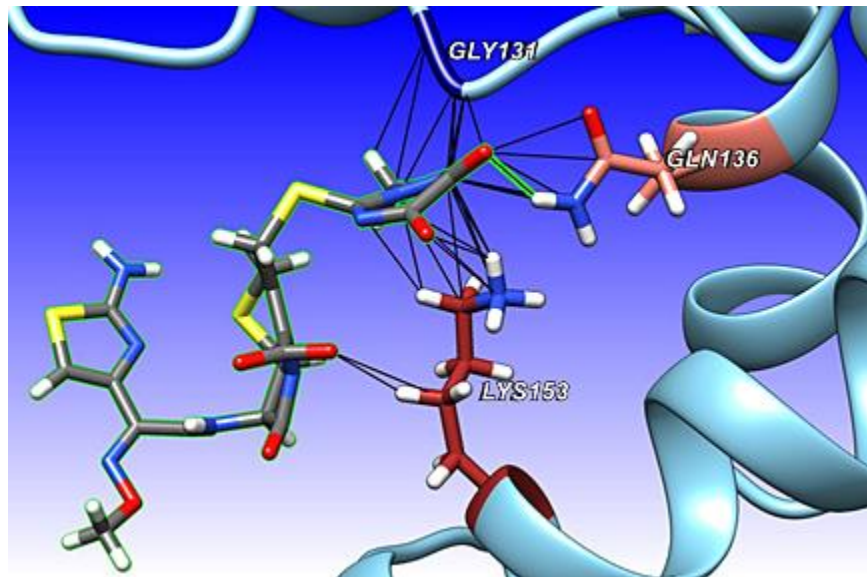


Figura 7.5 Simulación Acoplamiento molecular obtenida de TG para ceftriaxona en estado basal. Interacciones con aminoácidos son representadas por colores: Café-Lisina (LyS 153), azul marino-glicina (Gly 131), salmón-Glutamina (Gln 136): azul claro-resto de TG.

La penicilina es utilizada como un antibiótico de amplio espectro, este antibiótico es identificado principalmente por su mecanismo de acción basado en la degradación de la pared celular de los patógenos, siendo su objetivo principal las bacterias gran positivas con la inhibición de la síntesis de péptido glucano al acoplarse e interactuar con la enzima TP ya que dicho antibiótico entra de acuerdo a su clasificación en el grupo de B-lactámicos y podemos observarlo en el Cuadro 5 en función de la energía requerida para reaccionar en su estado basal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante el acoplamiento molecular *in silico* realizado se puede identificar el mecanismo por el cual este antibiótico presenta un efecto positivo sobre microorganismos gram positivos y específicamente *Staphylococcus aureus*, a pesar de ser TP su blanco principal, mediante este análisis se identificó interacción indirecta entre las cadenas laterales de aminoácidos TG evitando la catalización polimérica de la hebra de glucano (Suavage *et al.*, 2008).

Los aminoácidos garantes de la interacción de TG se posicionan fuera de los dominios del centro catalítico (Figura 7.11), por lo que su interacción es meramente alostérica brindada por las características fisicoquímicas del compuesto en acción expresadas en el apartado 7.6.2.

Cabe mencionar que la penicilina con un área de superficie polar de 112.01 \AA^2 dificulta interactuar hasta el interior de la célula, comportamiento que también se observa en el derivado de fosfatoetanolamina, sin embargo este último presenta mayores oportunidades *in silico* para poder inactivar el proceso enzimático en función de la lipofilicidad con una capacidad superior de hasta un 85% más lipofílico que penicilina, colocándolo como candidato teórico para el estudios con potencial actividad antibacteriana más efectiva y posible candidato teórico para estudios de desarrollo de nuevos fármacos (Vistoli & Pedretti, 2007).

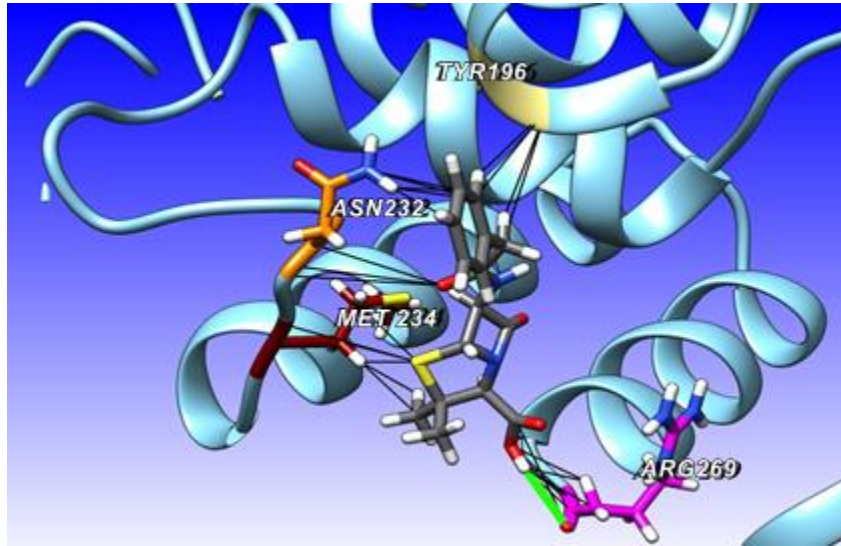


Figura 7.6 Simulación de Acoplamiento molecular de TG con penicilina obtenida en estado basal. Interacciones con aminoácidos representados por colores: Rosa magenta-arginina (ARG 269), tinto-metionina (Met 234), anaranjado-asparagina (Asn 232), kaky-Tirosina (Tyr 196); Azul claro- resto de la TG.

Mientras tanto la vancomicina tiene la capacidad de interactuar directamente con la enzima TG y evitar la síntesis de péptido glucano, que más tarde servirá para la formación de la pared celular. La vancomicina es un glucopéptido que tiene su acción un paso antes de los antibióticos B-lactámicos.

TG lleva a cabo la elongación de las cadenas de glucanos por enlaces β -1,4 entre NAG y NAM, proceso denominado transglucosilación. Posteriormente, las proteínas llevan a cabo el agregado de un pentapéptido de glicinas a nivel de la L-lisina central del pentapéptido, cuando vancomicina interactúa estos compuestos recubren el extremo D-alanin-D-alanina del disacárido-pentapéptido, evitando así la acción de las glucosiltransferasas y transpeptidasas, y en consecuencia evitando la elongación del peptidoglucano (Allen, 2003).

Mediante el acoplamiento molecular *in silico*, se puede obtuvo la interacción teórica entre TG y vancomicina evidenciando algunos residuos aminoácidos responsables de la inhibición enzimática, donde este antibiótico se acopló mediante interacciones hidrofóbicas, siendo leucina 157 uno de los más importantes al interactuar directamente dentro del dominio de sitio catalítico de TG alterando la actividad enzimática mediante interacciones como el área de superficie polar y otras, promovidas por características fisicoquímicas expresadas en

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

el apartado 7.6.2 que causan inestabilidad estructural en la molécula de tipo alostérico, en comparación de los resultados obtenidos del derivado de fosfatoetanolamina este presenta una mayor energía de espontaneidad destacando teóricamente su potencial antibiótico (Guamán Aranda, & Jaramillo Panamá, 2018).

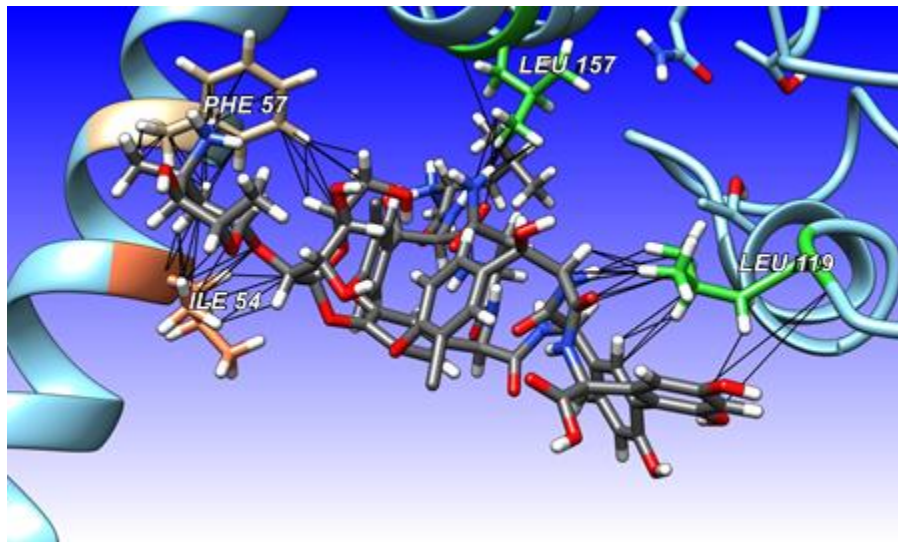


Figura 7.7 Simulación de acoplamiento molecular de vancomicina con TG en estado basal. Interacciones con aminoácidos son representados por colores: Coral-Isoleucina (Ile 54), arena-fenilalanina (Phe 57), verde limón-leucina (Leu 119)- leucina (Leu 157), azul claro-resto de la TG.

7.4.3 Acoplamiento molecular del derivado de fosfatoetanolamina en función de máxima espontaneidad con TP.

La enzima TP tiene un papel fundamental en la elongación de la cadena de peptidoglucano que más tarde formarán la pared celular de las bacterias Gram +, convirtiéndose en el principal objetivo de los antibióticos de barrera principalmente en los B-lactámicos. Durante la simulación de acoplamiento molecular se identificó interacciones carácter hidrofóbica, lo cual es muy bueno, ya que los principales centros de inactivación de TP son de característica hidrofóbicas y puente de hidrógeno (Merino, 2016).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a los estudios realizados por Nitulescu *et al.* (2017) los dominios del sitio activo de TP se encuentran de ácido glutámico 105 a arginina 197, por lo que el acoplamiento no interacciona en el sitio activo de TP, sin embargo, este acoplamiento presenta mayor energía en términos de espontaneidad en comparación con los controles utilizados (Cuadro 5) convirtiéndolo en el mecanismo de acción teóricamente más prometedor (López Gallego, 2015).

Por lo que se deduce que la reactividad molecular está dada por la unión en el sitio alostérico de TP, así como también por sus características fisicoquímicas, principalmente su alta lipofilidad brindada por la polaridad molecular ejercida principalmente por el grupo fosfórico y otras características fisicoquímicas expresadas en el apartado 7.6.2 que le permiten en un momento dado establecer interacciones más fuertes en comparación con los controles (ligandos) utilizados, por tal motivo el derivado de fosfatoetanolamina representa una ventaja y la oportunidad de poder realizar cambios estructurales con la posibilidad de poder obtener mayor eficiencia en su actividad, cumplir en su totalidad con la regla cinco de Lipinski y partir a la generación de un nuevo antibiótico

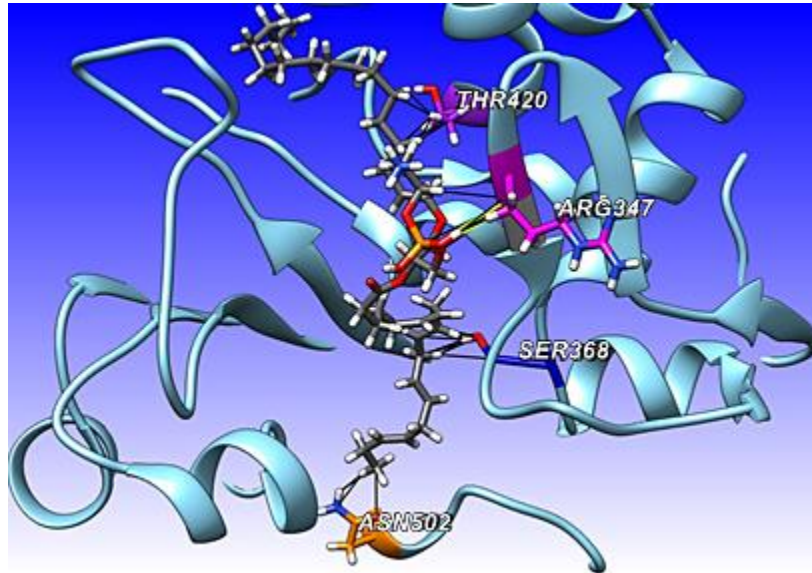


Figura 7.8 Simulación de Acoplamiento molecular de derivado de fosfatoetanolamina con TP en estado basal. Interacción de los aminoácidos representados por colores: Anaranjado-asparagina (Asn 502), azul-serina (Ser 368), rosa magenta-arginina (Arg 347), treonina (Thr 420), azul claro-resto de TP.

Por otra parte, los controles durante la simulación de acoplamiento molecular también mostraron mayor afinidad para TP en términos de energía de espontaneidad, aunque colocándose inferior al derivado de fosfatoetanolamina, la afinidad brindada hacia TP está dada por diferentes condiciones a nivel molecular, como es el anillo B-lactámico el cual es altamente afín de reconocer como sustrato al tener terminaciones estructurales con D-alanina-D-alanina del disacárido-pentapéptido.

Así como también algunas características fisicoquímicas específicas como es el área de superficie polar (TPSA) ya que todos cuentan con un área mayor a 100 \AA^2 , lo cual dificulta migrar al interior de la célula para poder fijar otros objetivos antes de ser expulsado de la misma por diferente mecanismo de defensa o inactivación a través de cambios conformaciones precisos a nivel estructural, condición principal en la cepas multirresistentes. El acoplamiento de los controles con TP están dados fuera del sitio activo como se observa en la Figura 7.11, 7.12, 7.1313 demostrando su interacción a sitios alostéricos suscitadas por características fisicoquímicas expresadas en el apartado 7.6.2

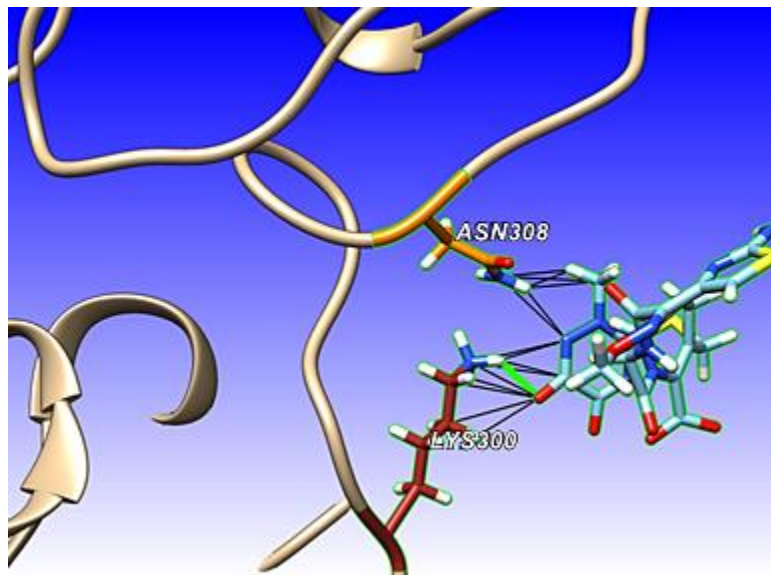


Figura 7.9 Simulación de acoplamiento molecular de ceftriaxona con TP en estado basal. Interacciones de los aminoácidos están representadas por colores: Anaranjado-asparagina (ASN 308), tinto-lisina (Lys 300), gris- resto de TP.

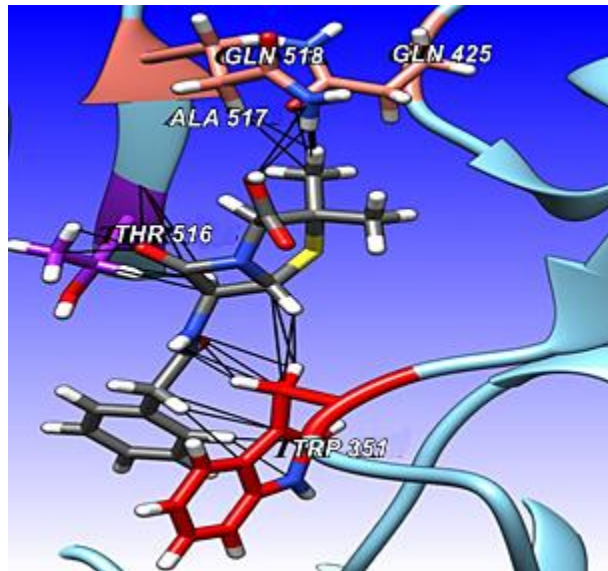


Figura 7.10 Simulación de acoplamiento molecular de penicilina con TP en estado basal. Interacciones de los aminoácidos están representadas por colores: Púrpura-treonina (Thr 516,), rojo-triptofano (TRP 351), salmón-glutamina (Gln 518) (Gln 425), azul claro- resto de TP.

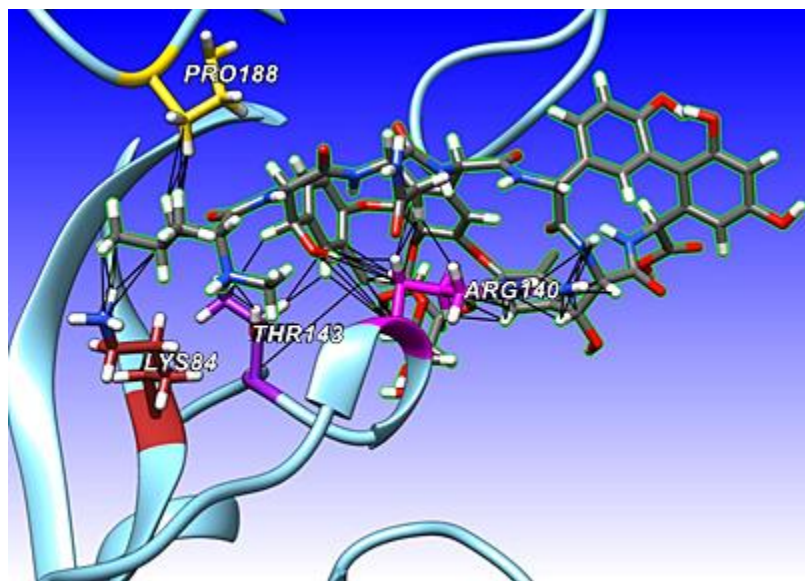


Figura 7.11 Simulación de acoplamiento molecular de Vancomicina con TP en estado basal. Interacciones de los aminoácidos están representadas por colores: Café- lisina (Lys 84), púrpura- treonina (Thr 143), dorado-prolina (Pro188), rosa magenta- arginina (Arg 140), azul claro resto de TP.

CONCLUSIONES

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

Los productos extracelulares analizados por electroforesis SDS-PAGE mostraron durante una bioautografía la presencia de un compuesto antimicrobiano de posible naturaleza proteica con un peso molecular aproximado de 4.3 kDa, a pesar de que el compuesto no se pudo teñir con azul brillante Coomassie(G-250), dicho comportamiento fue atribuido principalmente a la sensibilidad del colorante en bajas concentraciones, a pesar que no se pudo continuar con el proceso de identificación, no se descarta la presencia de un péptido con actividad antimicrobiana.

Se obtuvo un extracto acuoso con actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923- 33862), obteniendo un valor de MIC igual al control positivo (ceftriaxona), así mismo se evidenció actividad biológica contra *S. aureus* y con ello también la ausencia de actividad para inhibir a las bacterias pertenecientes a la demonización gram- y algunas condiciones especiales dadas en bacterias multirresistentes gram + como es el caso de *L. monocitogenes* ATCC 15313 debido a su capacidad de suprimir al gen receptor, condición obtenido a través de su resistencia.

Con base en los resultados del análisis de acoplamiento molecular y considerando que las cepas estudiadas del género *Streptomyces* mantiene el mismo origen de aislamiento se deduce que probablemente la actividad antimicrobiana observada, puede ser atribuida al compuesto derivado de la fosfatoetanolamina ([[(2R)-1- [2-aminoethoxy (hydroxy)phosphoryl]oxy-3- [(Z)-hexadec-1-enoxy]propan-2-yl](6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-6,9,12,15-tetraenoate) aducto a los aminoácidos histidina, isoleucina, lisina y arginina.

El análisis *in silico* reveló que hay una inhibición por regulación alostérica contra las enzimas transpeptidasa y transglicosilasas siendo mayor en comparación con los controles utilizados.

BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA

Alakomi, H. L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., & Helander, I. M. 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and environmental microbiology*, 66(5), 2001-2005.

Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 8(4), 251-259.

Allen, N. E., & Nicas, T. I. 2003. Mechanism of action of oritavancin and related glycopeptide antibiotics. *FEMS microbiology reviews*, 26(5), 511-532.

Alvarez, M. E. G. 2015. Diseño *in silico* de una nueva molécula antagonista de la VIH proteasa basada en Calixaminas y Calixolanos. (Título Profesional, Universidad de san Carlos Guatemala. Facultad de ciencias químicas y farmacia.)

Álvarez-Lerma, F., Olaechea, P., Grau, S., Marín, M., Domínguez, A., Martínez-Lanao, J., & Grupo de Estudio de Infección en el paciente crítico (GEIPC-SEIMC). 2008. Recomendaciones para la monitorización de antibióticos en pacientes críticos ingresados en UCI. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(4), 230-239.

Babos, D. V., Pinheiro, F. C., Dionizio, B. S., & Pereira-Filho, E. R. 2021. Analysis of Sports Supplements for Proteins by Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) and Macronutrients by Inductively Coupled Plasma–Optical Emission Spectrometry (ICP-OES). *Analytical Letters*, 1-14.

Bobály, B., Tóth, E., Drahos, L., Zsila, F., Visy, J., Fekete, J., & Vékey, K. 2014. Influence of acid-induced conformational variability on protein separation in reversed phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1325, 155-162.

Baró, L., Jiménez, J., Martínez-Férez, A., & Bouza, J. J. 2001. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *Ars Pharmaceutica*, 42(3-4), 135-145.

BIBLIOGRAFÍA

Baumgart, A. M. K., Molinari, M. A., & de Oliveira Silveira, A. C. 2010. Prevalence of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in high complexity hospital. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 14(5), 433-436.

Bautista Renedo Jhonatan Michael. 2017. Estudio teórico de sistemas sucesivos formados por análogos del par de HCN/HNC con posibles interacciones tipo puente de hidrógeno. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma del Estado de México, Departamento de Industrias. Estado de México, México.

Bentley, Stephen D, Chater, Cerdeño-Tárraga, Challis, Thomson, James & Hopwood-Bill. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature*, 417(6885), 141-147.

Beshkova, D., Frengova, G. 2012. Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in life Sciences* 12(4):1-14.

Bosso J. A., Mauldin P. D., & Salgado C. D. 2010. The association between antibiotic use and resistance: the role of secondary antibiotics. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 29(9), 1125-1129.

Bradshaw J. P. 2003. Cationic antimicrobial peptides issues for potential clinical use. *BioDrugs*, 17(4), 233-240.

Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(1), 44-52.

Campañone, L., Bruno, E., Martino, M. 2014. Effect of microwave treatment on metalalginate beads. *Journal of Food Engineering*, 135, 26-30

Casanova Y., Herley F.; Cardona T., Sara C. 2004. Emulsiones o/w concentración de proteína y temperatura. *Vitae*, 11, 13-19. 20/09/19, De vitae Base de datos

Castillo Sabori, J.M. 2017 cápsides del bmv como nanovehículos de antibióticos (tesis de maestría) centro de investigación científica y de educación superior de Ensenada, Baja California

Castillo-Portela, G., Villar-Delgado, J., Montano-Martínez, R., Martínez, C., Pérez-Alfocea, F., Albacete, A., ... & Acosta-Echeverría, M. 2011. Cuantificación por HPLC del contenido de aminoácidos presentes en el FitoMas-E. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 45(1), 64-67.

Chater, K.F. 1984. Morphological and physiological Differentiation in *Streptomyces* cold spring Harbor Laboratory press, 89-115.

Chen H. & Hoover D. G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(3), 82-100.

Claessen D., Rink R., De jong W. Siebreing J., De vreugd P., Boersma F.G., Dijkhuizen L, Wosten H.A. 2003. A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes delopementent*, 17(14),1714-1726.

Cleveland J., Montville T. J., Nes I. F., & Chikindas, M. L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International journal of food microbiology*, 71(1), 1-20.

Corrales-Garcia, L. L., Possani, L. D., & Corzo, G. J. A. A. 2011. Expression systems of human β -defensins: vectors, purification and biological activities. *Amino acids*, 40(1), 5-13.

Cotter P. D., Hill C., & Ross R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777-788.

Daina A., Michielin O., & Zoete V. 2017. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.

Dienstmann R., Picoli S. U., Meyer G., Schenkel T. & Steyer J. 2010. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 46, 23-27.

Sauvage E., Kerff F., Terrak M., Ayala J. A., & Charlier P. 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS microbiology reviews*, 32(2), 234-258.

- Faulkner, D. J., Harper, M. K., Haygood, M. G., Salomon, C. E., & Schmidt, E. W. 2000. Symbiotic bacteria in sponges: sources of bioactive substances. *Drugs from the Sea*, (107-119).
- Ferrer-Silva, A. A. 2011. Purificación, caracterización bioquímica y evaluación de la citotoxicidad del péptido antimicrobiano gicina A. (Título profesional Magíster en Bioquímica, universidad de Chile). Repositorio Académico de la Universidad de Chile.
- Flardh, K., Buttner, M.J., 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium, *Nat Rev Microbial*, 7(1),36-49.
- Gandomi, H.; Abbaszadeh, S.; Misaghi, A.; Bokaie, S. & Noori, N., 2016. Effect of chitosanalginatate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. *LWT- Food science and Technology*, 69, 365-371.
- Gauthamadasa, K., Rosales, C., Pownall, H. J., Macha, S., Jerome, W. G., Huang, R., & Silva, R. G. D. 2010. Speciated human high-density lipoprotein protein proximity profiles. *Biochemistry*, 49(50), 10656-10665.
- Genilloud, O. 2014. The re-emerging role of microbial natural products in antibiotic discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106(1), 173-88.
- Geornaras, I., Yoon, Y., Belk, K. E., Smith, G. C., & Sofos, J. N. 2007. Antimicrobial activity of ϵ -polylysine against *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in various food extracts. *Journal of Food Science*, 72(8), M330-M334.
- Gherzi, D., & Sanchez, R. 2009. Improving accuracy and efficiency of blind protein-ligand docking by focusing on predicted binding sites. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 74(2), 417-424.
- Herbert P., Barros P., Ratola N., & Alves A. 2000. HPLC determination of amino acids in musts and port wine using OPA/FMOC derivatives. *Journal of Food Science*, 65(7), 1130-1133.
- Gontang, E. A. 2008. Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria and their secondary metabolite genes. Tesis de Doctorado. Universidad de California, Estados Unidos, 163 p.

Guamán Aranda, W. D., & Jaramillo Panamá, S. E. 2018. Estudio de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de la especie *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) de Ecuador frente a cepas de interés clínico (Bachelor's thesis, Riobamba, Universidad Nacional de Chimborazo).

Hall, W. L., Millward, D. J., Long, S. J., & Morgan, L. M. 2003. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *British Journal of Nutrition*, 89(2), 239-248.

Han, J., Guenier, A. S., Salmieri, S., & Lacroix, M. 2008. Alginate and chitosan functionalization for micronutrient encapsulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), 2528–2535.

Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., & Iqbal, M. 2011. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian journal of infectious Diseases*, 15(4), 305-311.

Hécharde Y, Sahl HG. 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*, 84: 545-557

Hernández E. M., Lopez G. Y. R. y García P.A. 2005. Evaluación de derivados carboximetilados del alginato de sodio como super absorbente. *Revista cubana de química*, vol. XVII. 3:239-240.

Hinderliter, P. M., Minard, K. R., Orr, G., Chrisler, W. B., Thrall, B. D., Pounds, J. G., & Teeguarden, J. G. 2010. ISDD: A computational model of particle sedimentation, diffusion and target cell dosimetry for in vitro toxicity studies. *Particle and Fibre Toxicology*, 7.

Hoffmann, B., Münch, S., Schwägele, F., Neusüß, C., & Jira, W. 2017. A sensitive HPLC-MS/MS screening method for the simultaneous detection of lupine, pea, and soy proteins in meat products. *Food Control*, 71, 200-209.

- IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry. 2014. IUPAC Compendium of Chemical Technology. Gold Book. (2a. ed.). EE. UU.: IUPACJ. 172 (2) 1169-1176
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 19(3), 491-511.
- Jung, T., Kamm, W., Breitenbach, A., Kaiserling, E., Xiao, J. X., & Kissel, T. 2000. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), 147-160.
- Khalid S. & Keller N. P. 2021. Chemical signals driving bacterial–fungal interactions. *Environmental Microbiology*, 23(3), 1334–1347.
- Klaenhammer TR 1993. Genética de bacteriocinas producidas por bacterias del ácido láctico. *Revisiones de microbiología FEMS*, 12 (1-3), 39-85.
- Koo, S. Y., Mok, I. K., Pan, C. H., & Kim, S. M. 2016. Preparation of fucoxanthin-loaded nanoparticles composed of casein and chitosan with improved fucoxanthin bioavailability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(49), 9428–9435.
- L., Berton, P., Gurau, G., & Rogers, R. D. 2016. Hydrogels based on cellulose and chitin: Fabrication, properties, and applications. *Green Chemistry*, 18(1), 53–75
- Li, Y., Dou, X., Pang, J., Liang, M., Feng, C., Kong, M., ... & Chen, X. 2019. Improvement of fucoxanthin oral efficacy via vehicles based on gum Arabic, gelatin and alginate hydrogel: Delivery system for oral efficacy enhancement of functional food ingredients. *Journal of Functional Foods*, 63, 103573.
- López-Alarcón, C., y Denicola, A. 2013. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Analytica chimica acta*, 763, (1-10).
- Lupo, B., Maestro, A., Gutiérrez, J. M., & González, C. 2015. Characterization of alginate beads with encapsulated cocoa extract to prepare functional food: Comparison of two gelation mechanisms. *Food Hydrocolloids*, 49, (25-34).

- Lutkenhaus, J. (1993). FtsZ ring in bacterial cytokinesis. *Molecular microbiology*, 9(3), 403-409.
- Martinez, J. L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernandez, A., Linares, J. F., Martínez-Solano, L., & Sánchez, M. B. 2008. A global view of antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 33(1), 44-65.
- Mayo Pérez, J. P. 2020. Búsqueda de péptidos antimicrobianos en actinobacterias aisladas de sedimentos marinos (Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas).
- Medina. L. H. y Ledo P.R.M. 2010. Alginatos. Propiedades y uso en la reducción de reflujo gastroesofágico. *Informe médico*. 12(10):519-523.
- Merino M. F. 2016. Diseño y mecanismos de acción molecular de nuevos inhibidores de β -lactamasa (Doctoral dissertation, universidad complutense).
- Miguélez, E. M., Hardisson, C., & Manzanal, M. B. 1999. Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *The Journal of cell biology*, 145(3), 515-525.
- Minamisawa, M., Yoshida, S., & Takai, N. 2004. Determination of biologically active substances in roasted coffees using a diode-array HPLC system. *Analytical sciences*, 20(2), 325-328.
- Montes, C. 2013. Aislamiento, identificación molecular y bioactividad de bacterias Gram positivas asociadas a la esponja *Aplysina clathrata*. Tesis de maestría en ciencias marinas. Centro interdisciplinario de ciencias marinas. La paz, Baja california sur, México.
- More, P., Shetty, D., Singh, S., Khedekar, T., Pawar, M., Chauhan, K., & Potdar, Y. 2014. HPLC method development and its validation for the determination of Triflusal in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmacy Research*, 8(5), 670-673.
- Murphy, B. T., Jensen, P. R., & Fenical, W. 2012. The chemistry of marine bacteria. *Handbook of marine natural products*, 1, 153-189.

Nguyen-Distèche M., Fraipont C., Buddelmeijer N., & Nanninga N. (1998). The structure and function of Escherichia coli penicillin-binding protein 3. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 54(4), 309-316.

Nguyen-Distèche, M., Fraipont, C., Buddelmeijer, N., & Nanninga, N. 1998. The structure and function of Escherichia coli penicillin-binding protein 3. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 54(4), 309-316.

Nikaido, H. 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annual review of biochemistry*, 78, 119-146.

Papadoyannis, I., Samanidou, V. & Theodoridis, G. 1991. Quick and simple simultaneous determination for some amino acids by reversed-phase HPLC with UV detection. *Journal of liquid chromatography*, 14(7), 1409-1416.

Parras-Huertas, R.A. 2010. Revisión: microencapsulación de alimentos. Facultad Nacional de Agronomía, Medellín 63(2): 5669-5684.

Patzer, S. I., & Braun, V. 2010. Gene cluster involved in the biosynthesis of griseobactin, a catechol-peptide siderophore of Streptomyces sp. ATCC 700974. *Journal of bacteriology*, 192(2), 426-435.

Raczkowski, J. V. 2010. Biodiversity of actinomycetes associated with Caribbean sponges of Puerto Rico, and their metabolic profiles. Tesis de Maestría. Universidad del Norte de Carolina, Estados Unidos. 137 p.

Razavi, S. M. A., & Mohammadi, T. 2011. Influence of different substitution levels of Lallelantia royleana seed gum on textural characteristics of selected hydrocolloids. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 10(9), 2826–2837.

Razavi, S. M. A., Alghooneh, A., & Behrouzian, F. 2017. Influence of temperature on sage seed gum (*Salvia macrosiphon*) rheology in dilute and concentrated regimes. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 1–14.

Razavi, S. M. A., Cui, S. W., Guo, Q., & Ding, H. 2014. Some physicochemical properties of sage (*Salvia macrosiphon*) seed gum. *Food Hydrocolloids*, 35, 453–462.

BIBLIOGRAFÍA

- Reddy, A. S., Pati, S. P., Kumar, P. P., Pradeep, H. N., & Sastry, G. N. 2007. Virtual screening in drug discovery-a computational perspective. *Current Protein and Peptide Science*, 8(4), 329-351.
- Ribeiro Dias, D.; Alverenga Botrel, D.; De Barros Fernandez, R. V. & Vitela Borgues, S., 2017. Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. *Current Opinion in Food Science*. 13, 31-37.
- Rocha, G. F., Kise, F., Rosso, A. M., & Parisi, M. G. 2013. Péptidos con actividad antimicrobiana obtenidos de proteínas lácteas con extractos de *Salpichroa organifolia*. *Información tecnológica*, 24(2), 23-30.
- Galanakis C.M. 2013. Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: a viewpoint of opportunities and challenges. *Food Bioprod. Process*. 91, 575-579.
- Rodríguez M. 2018. Estudio de la cinética de secado de recubrimientos usados en un sistema de doble encapsulación. Tesis de Maestría en ciencias agroalimentarias. Instituto Universitario de Ingeniería de los Alimentos para el Desarrollo
- Saar-Dover R, Bitler A, Nezer R, Shmuel-Galia L, Firon A, Shimoni E, Trieu-Cuot P, Shai Y. 2012. D-alanylation of lipoteichoic acids confers resistance to cationic peptides in group B *streptococcus* by increasing the cell wall density,8(9).
- Sheng Q, Jie L, Hua-Hong C. 2009. Diversity and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Appl Environ Microbiol*.75:6176–86.
- Shoichet, B. K., McGovern, S. L., Wei, B., & Irwin, J. J. 2002. Lead discovery using molecular docking. *Current opinion in chemical biology*, 6(4), 439-446.
- Silverstein, S.C., S. Greenberg, F. Di Virgilio, and T. Steinberg. 1989. Phagocytosis. In *Fundamental Immunology*. W.E. Paul, editor. Raven Press Ltd., New York. pp. 703–720.
- Singh, h.; Gallier, S. 2014. Processing of Food Structures in the Gastrointestinal Tract and Physiological Responses, in: *Food Structures, Digestion and Health*. Ed. Academic Press. EEUU, 51-75.

Sonego, J. M., Santagapita, P. R., Perullini, M., & Jobbagy, M., 2016. Homogenous alginate hydrogels from the parent alginic acid precursor: a structural study. *Dalton Transactions*, 45(24), 10050-10057.

Souza, C., Rojas, E., Melo, N., Gaspar, A. y Lins, J. 2013. Complex coacervates obtained from interaction egg yolk lipoprotein and polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 30, 375-381.

Tao Jin, Maria Bokarewa, Timothy Foster, Jennifer Mitchell, Judy Higgins and Andrej TarkowskiThies, C. 2016. Encapsulation by complex coacervation. En J. Lakkis (Ed.), *Encapsulation and controlled release technologies in food systems* (2a. ed., pp. 41-77). EE. UU.: John Wiley & Sons Ltd.

Tomas J. 2018. Estudio de la cinética de secado de recubrimientos usados en un sistema de doble encapsulación. Tesis de Maestría en ciencias agroalimentarias. Instituto Universitario de Ingeniería de los Alimentos para el Desarrollo.

Tuon, F. F., Kruger, M., Terreri, M., Pentead-Filho, S. R., & Gortz, L. 2011. Klebsiella ESBL bacteremia-mortality and risk factors. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(6), 594-598.

Vazquez, d. 1986: Biosíntesis del peptidoglucano: mecanismos de acción y selectividad de los antibióticos inhibidores. En: *Bioquímica y Biología Molecular* (Coordinador: L. Cornudella). Salvat, Barcelona, págs. 133-140.

Vu-Khac H. & Miller K. W. 2009. Regulation of Mannose Phosphotransferase System Permease and Virulence Gene Expression in *Listeria monocytogenes* by the EIItMan Transporter. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21), 6671–6678.

W. Whitman, M. Goodfellow, P. Karpfer, H.J. Busse, M. Trujillo, W. Ludwing, Suziki, K.I. 2012. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*: Volume 5: The actinobacteria. part A., Springer Science y Bussiness Media.

Wahba, M. I. 2016. Treated calcium pectinate beads for the covalent immobilization of α -Dgalactosidase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 877-886.

Wang G. Human antimicrobial peptides and proteins.2014. *Pharmaceuticals (Basel)* 2(5):545-94.

Wu, Z., Wang, Z., Guan, B., Wang, X., Zhang, Y., Xiao, Y., ... Hou, Q. 2013. Improving the properties of α -D-galactosidase from *Aspergillus oryzae* via encapsulation in aggregated silica nanoparticles. *New Journal of Chemistry*, 37(11), 3793-3797.

Yan, C. y Zhang, W. 2014. Coacervation processes. En A.G. Gaonkar, N. Vasisht, A. R. Khare, y R. Sobel (Eds.), *Microencapsulation in the food industry. A practical implementation guide* (pp. 125-137). EE. UU.: Academic press.

Zeeb, B., Saberi, A. H., Weiss, J., & McClements, D. J. 2015. Formation and characterization of filled hydrogel beads based on calcium alginate: factors influencing nanoemulsion retention and release. *Food Hydrocolloids*, 50, 27-36

Zhang, Z., Zhang, R., Zou, L., & McClements, D. J., 2016. Protein encapsulation in alginate hydrogel beads: Effect of pH on microgel stability, protein retention and protein release. *Food Hydrocolloids*, 58, 308-315.

Zúñiga, A. J. P., & Domínguez, A. R. 2002. Simulación del reconocimiento entre proteínas y moléculas orgánicas o docking. Aplicación al diseño de fármacos. *Mensaje Bioquímico*, 26, 129-145.