

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS



CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Evaluación de la actividad antibacteriana de péptidos sintéticos y de nanopartículas de plata (AgNPs) derivadas de *Opuntia ficus-indica*

TESIS QUE PRESENTA:
M. en C. Mariana Georgina Muñoz Carrillo

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

COMITÉ TUTORAL

Dr. José Francisco Morales Domínguez
Dr. Galdino Andrade Filho
Dra. Raquel Guerrero Alba

Aguascalientes, Ags., junio del 2022

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

CARTA DE VOTO APROBATORIO
COMITÉ TUTORAL

NOMBRE DEL DECANO (A)

DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez

PRESENTE

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **MARIANA GEORGINA MUÑOZ CARRILLO** con ID **115792** quien realizó la tesis titulada: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS Y DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNPs) DERIVADAS DE *Opuntia ficus-indica***, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 27 de mayo de 2022.



Dr. José Francisco Morales Domínguez
Tutor de tesis



Dra. Raquel Guerrero Alba
Asesor de tesis



Dr. Galdino Andrade Filho
Asesor de tesis






c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16
Actualización: 00
Emisión: 17/05/19

Research Article

Green Synthesis of Silver Nanoparticles from the *Opuntia ficus-indica* Fruit and Its Activity against Treated Wastewater Microorganisms

Mariana G. Muñoz-Carrillo ¹, Cristina Garcidueñas-Piña ¹,
Roberto C. Valerio-García ¹, José L. Carrasco-Rosales ²,
and José F. Morales-Domínguez ¹

¹Department of Chemistry, Autonomous University of Aguascalientes, Aguascalientes 20131, Mexico

²Department of Microbiology, Autonomous University of Aguascalientes, Aguascalientes 20131, Mexico

Correspondence should be addressed to José F. Morales-Domínguez; jfmoral@correo.uaa.mx

Received 27 May 2020; Revised 23 September 2020; Accepted 29 October 2020; Published 17 November 2020

Academic Editor: Bhanu P. S. Chauhan

Copyright © 2020 Mariana G. Muñoz-Carrillo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Wastewater can be reused after a treatment process and compliance with high quality standards that guarantee its safe use: The wastewater treatment plant of the Autonomous University of Aguascalientes (AUA), like others, uses primary, secondary, and tertiary processes. The tertiary process followed is chlorination and is used to eliminate microorganisms from the secondary process. Although water of acceptable quality is obtained with chlorine, there is evidence that toxic substances are generated when reacting with organic matter, so alternatives to the use of chlorination have been analyzed. In the present study, silver nanoparticles were synthesized from the aqueous extract of the *Opuntia ficus indica* fruit peel (*OfAgNPs*), by reducing a 2 mM solution of AgNO_3 . *OfAgNPs* were characterized by UV-visible spectroscopy, scanning electron microscopy, energy-dispersive X-ray spectroscopy, atomic absorption spectroscopy, and dynamic light scattering, in addition to its electrophoretic mobility. The *OfAgNPs* are spherical, with an average particle size distribution of 64.28 ± 11.82 nm, relatively stable at room temperature, negatively charged (-25.1 ± 0.03 mV), and composed of 61.29% silver. The activity of *OfAgNPs* was evaluated in water from the effluent of the AUA treatment plant, before and after chlorination, and inhibition of bacteria *Escherichia coli* var 1, *Enterobacter aerogenes* var 1, *Citrobacter freundii* var 2, atypical *E. coli*, and aerobic mesophilic microorganism was tested.

1. Introduction

Nanotechnology is the science of the design and production of materials at nanoscale (1-100 nm), also called nanomaterials, characterized by having different physical, chemical, and biological properties than those of larger scales [1]. Within these nanomaterials are nanoparticles (NPs), which measure less than 100 nm [2]. Silver NPs (AgNPs) have been employed in various important applications in human health such as antibacterial, antifungal, antiviral, and anticancer [3–6].

Different NPs synthesis methods have been developed in which its physicochemical properties depend directly, such as size, surface charge, agglomeration, degree of dilution,

and elemental composition [7, 8]. The synthesis of AgNPs based on chemical reduction is the most popular, simple, and high performance [9], where a metallic precursor (metallic salts) reacts with reducing agents such as sodium citrate, ascorbic acid, alcohol, and borohydride, which are toxic for the environment [10]. Furthermore, chemical synthesis processes can increase the toxicity of NPs due to its ability to absorb substances [10–12]. One of the alternatives is green synthesis in which chemical reducing agents and stabilizers are replaced by proteins, vitamins, alkaloids, carbohydrates, and antioxidants, which are obtained from living organisms such as bacteria, algae, fungi, yeasts, and plants [10–13]. The advantages of this technique are the following: (a) the

Agradecimientos

A mis padres, Victor y Martha, por su apoyo y amor incondicional, gracias por esas palabras de aliento que me motivaban día con día, por ser mi ejemplo y mi sosten durante este proyecto. Ustedes han sido siempre el motor que impulsa mis sueños, me siento orgullosa de que sean mis padres y que puedan compartir este momento conmigo.

A mi hermano Víctor, gracias por ser mi más grande apoyo, amigo y ser mi motivación, pero sobre todo por siempre estar a mi lado durante estos tres años. Gracias por creer en mí y regañarme cuando era necesario.

A mi familia, porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento me acompañaron durante este proyecto.

Al Dr. Francisco Morales, por su apoyo incondicional, confianza y paciencia, por sus enseñanzas a lo largo de estos 8 años y sobre todo gracias por compartir sus conocimientos. Muchas gracias por sus palabras de aliento cuando más lo necesite, por su orientación y constancia en este trabajo.

Al Dr. Galdino Andrade, por aceptar formar parte de este proyecto, por sus valiosos consejos, completa disposición y aportaciones que lo enriquecieron, gracias por su paciencia, dedicación y perseverancia.

A la Dra. Raquel Guerrero por sus aportaciones para enriquecer este proyecto, su amabilidad y disposición ante cualquier duda y sobre todo por compartir su amplia experiencia.

A la Dra. Cristina Garcidueñas por su orientación y valioso apoyo.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología molecular de plantas, Caro, Dani, Lily, Fernanda, Juan Pablo, Mario, Vivian, Charlie, Viviana y Hans, gracias por hacer más divertido mi estancia, por sus consejos y su ayuda, pero sobre todo gracias por su amistad.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

A mis compañeros de Toxicología del Laboratorio 60, al Dr. Roberto Rico, a mis grandes amigos Roberto Carlos, Ana Laura, Gabriela Alvarado y Mario Arzate, agradezco que hayan compartido sus conocimientos, su disponibilidad por ayudarme y su paciencia, gracias por sus consejos y sobre todo por escucharme, ustedes son parte importante de este gran proyecto.

A Josafath Quezada y Nancy Treviño que a pesar de la distancia siempre estuvieron con la mejor disposición para ayudarme y resolver dudas, gracias por sus consejos y por su amistad.

Al maestro José Luis Carrasco, Norma Carrasco, Betty Orozco, Chío y Rosy Chávez del laboratorio de Microbiología, gracias por su apoyo, por transmitirme su experiencia en técnicas de microbiología, paciencia y disposición.

Al maestro José Luis Hernández Duque y la maestra Carmelita por su buena disposición y ayuda para el uso del equipo del Laboratorio de Análisis instrumental.

A mis alumnas de tesina y mini proyectos, Melannie Pedroza, Samantha Gutiérrez y Aurora Castellanos, por su invaluable ayuda.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo para la realización de mis estudios de doctorado (Beca No.766020).

“Todos los triunfos nacen cuando nos atrevemos a comenzar”
Eugene Ware

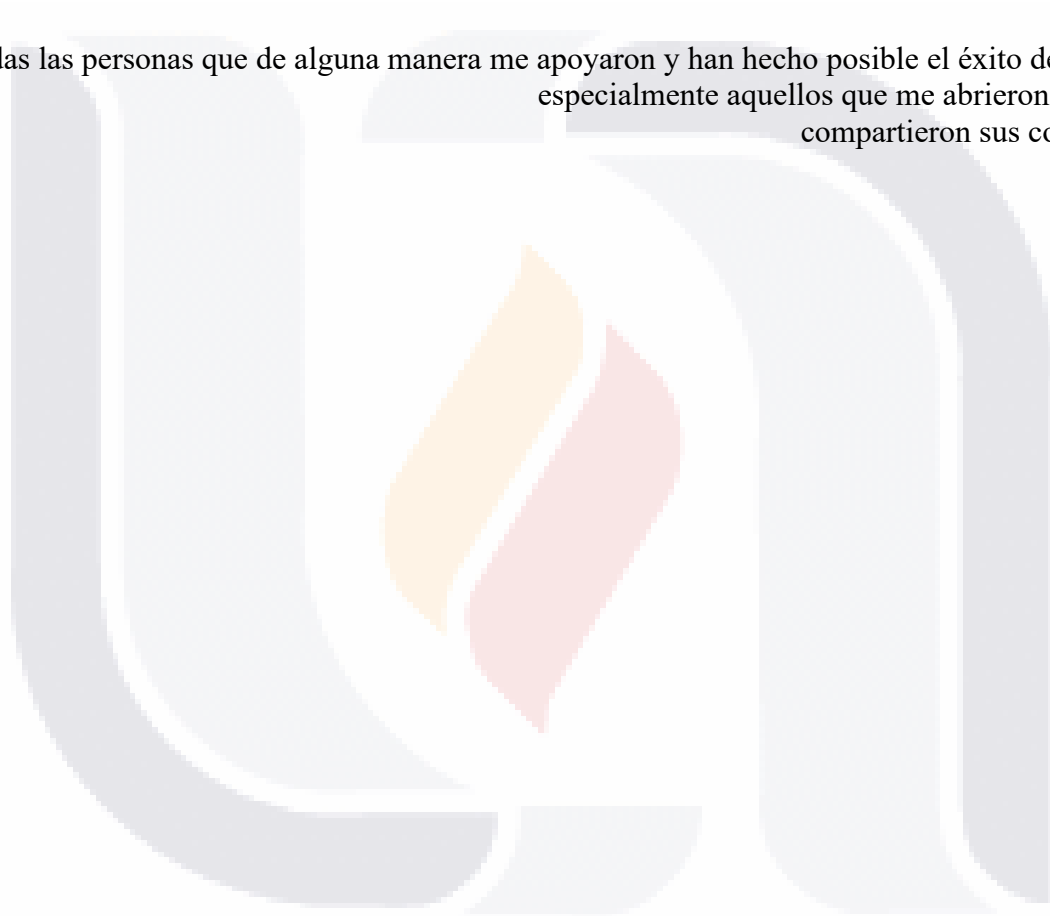
Dedicatorias

A mis padres, Víctor y Martha.

A mi hermano Víctor

A mi familia

A todas las personas que de alguna manera me apoyaron y han hecho posible el éxito de este trabajo, especialmente aquellos que me abrieron sus puertas y compartieron sus conocimientos.



Índice

I. Introducción	11
II. Antecedentes	14
Péptidos Antimicrobianos (PAMs)	14
Clasificación de los PAMs	14
Mecanismo de acción de los PAMs	18
PAMs producidos por plantas	20
Péptidos del tipo Heveina (<i>hevein-type peptides</i>)	21
Péptidos identificados en secuencias proteicas	22
Nanomateriales y Nanopartículas (NPs)	23
Tipos de nanomateriales.....	23
Síntesis de nanopartículas (NPs).....	25
Biosíntesis de nanopartículas de plata.....	27
Caracterización de las AgNPs.....	33
Mecanismos de acción antimicrobiana y toxicidad de las AgNPs.....	35
III. Justificación	37
IV. Hipótesis	37
V. Objetivo general	37
VI. Objetivos específicos	37
VII. Metodología	38
Estrategia 1: Producción de la proteína/péptido recombinante	38
Identificación y análisis <i>in silico</i> de las proteínas homólogas a la Heveina y a glioxalastas en el genoma de <i>Sorghum bicolor</i>	38
Identificación de PAMs en las secuencias SbGLY1, SbGLY2 Y SbDj-1 y diseño de genes sintéticos.	39
Diseño de oligonucleótidos específicos para amplificar la parte codificante de la proteína SbHevein-like.	40
Extracción de ARN de <i>Sorghum bicolor</i>	40
Síntesis de ADNc.....	41
Identificación de los genes por RT-PCR en <i>Sorghum bicolor</i> (L) Moench	41
Ligación del fragmento amplificado de Sb-likeHevein en el vector pGEM®-T Easy.....	41

Transformación genética de <i>E. coli</i> DH5α con el péptido SbHevein-like.....	42
Extracción del ADN plasmídico (Miniprep)	43
Digestión del plásmido pGEM®-T Easy con la enzima Eco RI	43
Ligación del fragmento codificante SbHevein-like al vector de expresión pET 32 a (+) y transformación genética de <i>E. coli</i> BL star.....	43
Expresión del péptido recombinante.....	45
Extracción y cuantificación de proteínas recombinantes totales solubles (PTS).....	45
Actividad antibacteriana de los PAMs recombinantes	45
<i>Estrategia 2: Síntesis verde, caracterización y análisis microbiológico de OfAgNPs.....</i>	46
Preparación del extracto de tuna.....	46
Biosíntesis de <i>OfAgNPs</i>	46
Caracterización de las <i>OfAgNPs</i>	46
Obtención del plasmón de resonancia.	46
Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	46
Espectroscopia de energía Dispersiva de rayos X (EDS Rx).	47
Espectroscopia de absorción atómica.	47
Diámetro hidrodinámico y Potencial Z.....	47
Análisis de actividad antibacteriana de las <i>OfAgNPs</i> en muestras de agua residual tratada.	48
Exposición de muestras de agua residual tratada con <i>OfAgNPs</i>	48
Análisis microbiológico de aguas residuales tratadas.....	49
Bioensayo de toxicidad aguda para embriones de pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	50
Evaluación de los efectos de <i>OfAgNPs</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	51
Evaluación del contenido de pigmentos fotosintéticos.....	51
Evaluación de la actividad antibacteriana en cepas ATCC	52
Evaluación de la actividad antifúngica	53
Análisis estadístico	53
VIII. Resultados y Discusión	54
<i>Estrategia 1: Producción de la proteína/péptido recombinante.....</i>	54
Generación de una construcción del PAM SbHevein-like	54
Identificación de proteínas glioxalidas en <i>Sorghum bicolor</i>	60
Diseño del gen sintético a partir de los péptidos antimicrobianos identificados en <i>Sorghum bicolor</i>	67

Estrategia 2. Síntesis verde y caracterización de AgNPs a partir del extracto de cáscara de tuna (*Opuntia ficus-indica*)..... 76

 Síntesis verde y caracterización de las *OfAgNPs*. 76

 Análisis de actividad antibacteriana de las *OfAgNPs* en agua residual..... 82

 Bioensayo de toxicidad agudo de 85

 Evaluación de los efectos de *OfAgNP's* en *Arabidopsis thaliana* 87

 Evaluación de la actividad antifúngica de las *OfAgNPs* 91

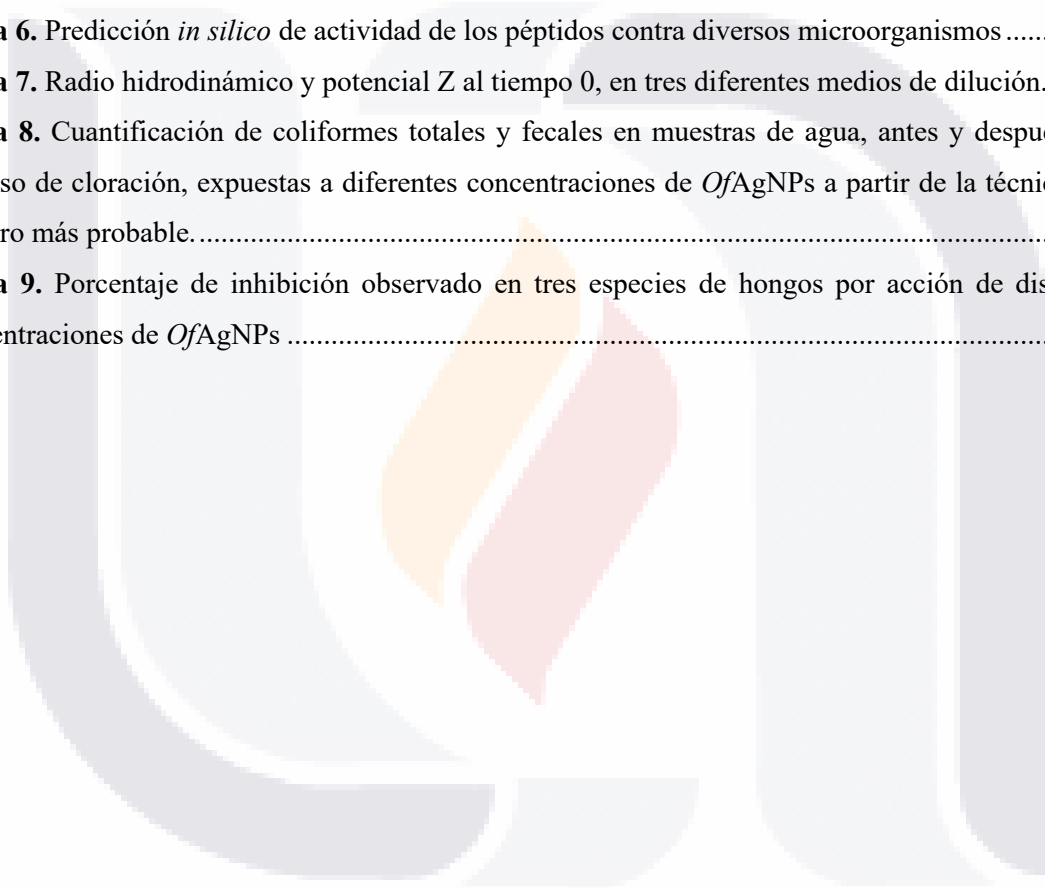
IX. Conclusiones..... 94

X. Bibliografía..... 95



Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de los PAMs.....	15
Tabla 2. Proteínas similares a Heveina identificadas en diferentes especies vegetales.....	22
Tabla 3. Trabajos de síntesis verde de AgNPs previamente reportados.	29
Tabla 4. Predicción <i>in silico</i> de actividad antimicrobiana de los péptidos identificados en glioxalinas de <i>Sorghum bicolor</i>	60
Tabla 5. Predicción de la actividad antimicrobiana de los péptidos identificados en glioxalinas de <i>Sorghum bicolor</i> a partir de sus características fisicoquímicas.	64
Tabla 6. Predicción <i>in silico</i> de actividad de los péptidos contra diversos microorganismos	65
Tabla 7. Radio hidrodinámico y potencial Z al tiempo 0, en tres diferentes medios de dilución.....	80
Tabla 8. Cuantificación de coliformes totales y fecales en muestras de agua, antes y después del proceso de cloración, expuestas a diferentes concentraciones de <i>OfAgNPs</i> a partir de la técnica del número más probable.....	83
Tabla 9. Porcentaje de inhibición observado en tres especies de hongos por acción de distintas concentraciones de <i>OfAgNPs</i>	92



Índice de Figuras

Figura 1. Tipos de clasificación de los PAMs	15
Figura 2. Mecanismos de acción de los PAMs.....	20
Figura 3. Representación de diferentes tipos de nanomateriales.....	25
Figura 4. Métodos de síntesis de nanomateriales.	26
Figura 5. Proceso de biosíntesis de AgNPs a partir de plantas.....	28
Figura 6. Mecanismos de acción de las AgNPs.....	36
Figura 7. Mapa del pGEM®-T Easy	42
Figura 8. Mapa del vector pET 32 a (+).	44
Figura 9. Esquema de la planta tratadora de agua de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA).....	49
Figura 10. Efectos teratogénicos en <i>Danio rerio</i> analizados durante la prueba FET	51
Figura 11. Esquema representativo de SbHevein-like.....	54
Figura 12. Estructura tridimensional de las proteínas Heveina	55
Figura 13. Alineamiento múltiple entre la secuencia Heveina de <i>Hevea brasiliensis</i> y SbHevein-like	55
Figura 14. Amplificación por RT-PCR del fragmento codificante de SbHevein-like.....	56
Figura 15. Comprobación de la ligación del inserto SbHevein-like en el vector pGEM®-T Easy. 56	
Figura 16. Comprobación de la del inserto SbHevein-like en el vector pET 32 a (+)	57
Figura 17. Expresión de la proteína SbHevein-like contenida en proteínas totales de <i>E. coli</i> BL star.	58
Figura 18. Ensayos de inhibición a diferentes concentraciones con el péptido SbHeveinl-like.	59
Figura 19. Modelado hipotético de PAMs identificados en glioxalasa de <i>Sorghum bicolor</i>	66
Figura 20. Secuencia y propiedades del gen sintético GSUNION.	68
Figura 21. Secuencia y propiedades del gen sintético GSLINK.....	69
Figura 22. Predicción de la actividad antimicrobiana del péptido codificada por GSUNION y GSLINK.....	71
Figura 23. Predicción <i>in silico</i> de la flexibilidad del péptido GSUNION	72
Figura 24. A. Predicción <i>in silico</i> de la flexibilidad del péptido GSLINK.....	73
Figura 25. Comprobación del marco de lectura del gen GSUNION	74
Figura 26. Comprobación del marco de lectura del gen GSLINK.	75
Figura 27. Síntesis de <i>OfAgNPs</i>	76
Figura 28. Morfología y diámetro de <i>OfAgNPs</i>	77

Figura 29. Gráficas del comportamiento del diámetro hidrodinámico y Potencial Z de las *OfAgNPs* a través del tiempo en agua ultrapura a temperatura ambiente..... 79

Figura 30. Composición de elementos de las *OfAgNPs*..... 81

Figura 31. Inactivación de organismos mesofílicos aerobios..... 84

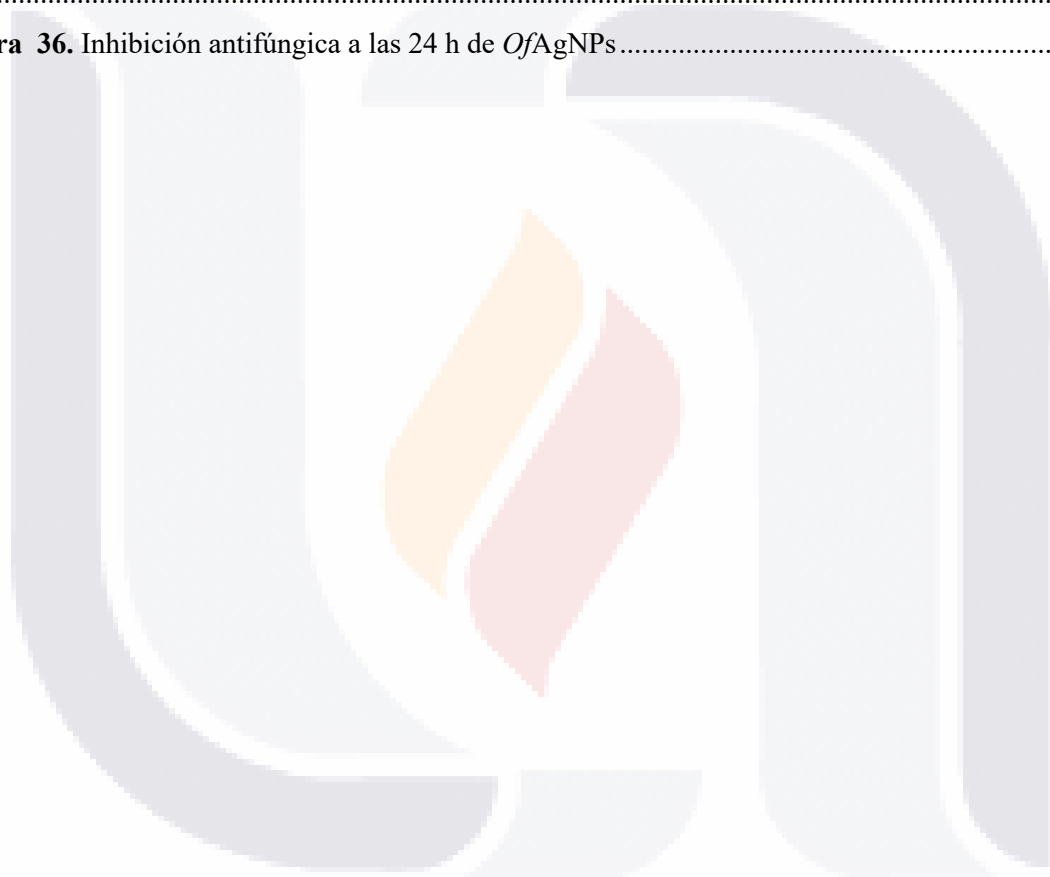
Figura 32. Toxicidad en *D. rerio* por exposición a *OfAgNPs*. 85

Figura 33. Efectos teratógenos de *OfAgNPs* en *D. rerio*..... 87

Figura 34. Crecimiento y contenido de pigmentos en *A. thaliana* expuesta a *OfAgNPs* 89

Figura 35. Inactivación logarítmica de microorganismos a diferentes concentraciones de *OfAgNPs* 91

Figura 36. Inhibición antifúngica a las 24 h de *OfAgNPs* 93



Acrónimos

Aa: aminoácidos

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AGE's: productos finales de glicación

AgNPs: nanopartículas de plata

ARN: ácido ribonucleico

ASA_P: área accesible para péptidos

BRILA: caldo bilis verde brillante

C: centígrados

CDS: ADN codificante

cm: centímetro

DLS: dispersión de luz dinámica

Ec: caldo *Escheritia coli*

EDSRX: espectroscopia de dispersión de rayos X

EMB: medio eosina azul de metileno

h: hora

IB: índice Boman

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

KDa: kilodaltons

M: molar

MG: metilglioxal

mg: miligramo

min: minutos

ml: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

mV: milivolts

ng: nanogramos

nm: nanómetros

NMP: número más probable

NP's: nanopartículas

OfAgNPs nanopartículas sintetizadas a partir de *Opuntia ficus indica*

PA: probable actividad

PAM'S: péptidos antimicrobianos

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pI: punto isoeléctrico

ppm: partes por millón

ROS: especies reactivas de oxígeno

rpm: revoluciones por minuto

RuBisCO: ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa

s: segundos

SEM: microscopio electrónico de barrido

UV: ultravioleta

μl : microlitro

μM : micromolar



Resumen

La resistencia bacteriana a los antibióticos ha surgido como una crisis a nivel global y es una de las mayores amenazas para la salud humana, economía y seguridad alimentaria, por lo que se han buscado alternativas al uso de nuevos fármacos. En el presente trabajo, se realizaron dos estrategias antimicrobianas: 1) el uso de los Péptidos Antimicrobianos (PAMs) y 2) la biosíntesis de nanopartículas de plata (AgNPs). Se identificaron PAMs *in silico* e *in vitro* en *Sorghum bicolor* con presunta actividad antibacteriana. Mediante PCR se identificó y se expresó un PAM similar a Heveína utilizando como templete ADN de *Sorghum bicolor*. La funcionalidad antibacteriana del péptido no fue eficaz a concentraciones inferiores de 14.86 µg/ml contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Por otro lado, a partir de secuencias proteicas de Glioxalasa de *Sorghum bicolor* se diseñaron *in silico* y se sintetizaron genes quiméricos con actividad antimicrobiana, el cual se espera sean probados en otros experimentos. En cuando las AgNPs se sintetizaron a partir del extracto acuoso de la cáscara del fruto de tuna (*Opuntia ficus-indica*, nombradas como *OfAgNP*). Las *OfAgNP* tiene una morfología esférica, con tamaño promedio de partícula de 64.28 ± 11.82 nm, estables a temperatura ambiente, con carga -25.1 ± 0.03 mV y compuestas por un 61.29% de plata. Las *OfAgNPs* inhiben el crecimiento de bacterias coliformes presentes en aguas tratadas tales como: *E. coli* var 1, *E. aerogenes* var 1, *C. freudi* var 2 y de una *E. coli* atípica y de bacterias mesofílicas aerobias, a una concentración de 0.5 mg/ml durante 0.5 h. También inhibieron el crecimiento de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, en un tiempo de 10 min y también en hongos como *Aspergillus* sp, *Collecotrichum* sp y *Cladosporium* sp desde una concentración de 0.25 mg L⁻¹ a las 24 h. El efecto tóxico se analizó en *Danio rerio* y *Arabidopsis thaliana*. En *D. rerio*, se observó efectos teratogénicos y letalidad a partir de 0.5 mg L⁻¹, mientras que *A. thaliana*, afectó el crecimiento a concentraciones elevadas (6.25-100 mg L⁻¹).

Abstract

Bacterial resistance to antibiotics has emerged as a global crisis and is one of the greatest threats to human health, economy and food safety, which is why alternatives to the use of new drugs have been sought. In the present work, two antimicrobial strategies were carried out: 1) the use of Antimicrobial Peptides (PAMs) and 2) the biosynthesis of silver nanoparticles (AgNPs). In silico and in vitro PAMs were identified in *Sorghum bicolor* with presumed antibacterial activity. A Hevein-like PAM was identified and expressed by PCR using *Sorghum bicolor* DNA as a template. The antibacterial functionality was not effective at concentrations below 14.86 µg/ml against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas auregunosa*. On the other hand, from protein sequences of Glyoxalases from *Sorghum bicolor*, chimeric genes with antimicrobial activity were designed in silico and synthesized, which is expected to be tested in other experiments. Whereas AgNPs were synthesized from the aqueous extract of tuna fruit shell (*Opuntia ficus-indica*, named *OfAgNPs*). The *OfAgNPs* have a spherical morphology, with an average particle size of 64.28 ± 11.82 nm, stable at room temperature, with a charge of -25.1 ± 0.03 mV and composed of 61.29% silver. The *OfAgNPs* inhibit the growth of coliform bacteria present in treated water such as: *E. coli* var 1, *E. aerogenes* var 1, *C. freudi* var 2 and an atypical *E. coli* and aerobic mesophilic bacteria, at a concentration of 0.5 mg/mL for 0.5. They also inhibited the growth of *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*, in a time of 10 min and also in fungi such as *Aspergillus* sp, *Collecotrichum* sp and *Cladosporium* sp from a concentration of 0.25 mg/mL at 24 hours. h. The toxic effect was analyzed in *Danio rerio* and *Arabidopsis thaliana*. In *D. rerio*, teratogenic effects and lethality were demonstrated from 0.5 mg/ L^{-1} , while *A. thaliana* affected growth at high concentrations ($6.25\text{-}100 \text{ mg/ L}^{-1}$).

I. Introducción

A través del tiempo, la resistencia bacteriana a los antibióticos ha surgido como una crisis a nivel global y es una de las mayores amenazas para la salud humana, su economía y la seguridad alimentaria. Los antibióticos son los fármacos más exitosos generados en los últimos años, los cuales tienen la capacidad de prevenir y tratar las infecciones bacterianas, sin embargo, con el paso de los años se ha aumentado los microorganismos que han generado resistencia por el desarrollo de mecanismos bioquímicos y fisiológicos. Los mecanismos de resistencia ocurren principalmente por la modificación del antibiótico, modificación de su flujo de salida o disminución de su entrada y por modificación química. El aumento en la resistencia a los antibióticos ha generado el interés de la búsqueda de alternativas para el desarrollo de nuevos fármacos cuyo modelo de acción dificulte la generación de resistencia sin comprometer su eficiencia.

Como una alternativa al uso de los antibióticos están los péptidos antimicrobianos (PAMs) y las nanopartículas cuyos mecanismos de acción dificultan la generación de resistencia y son procesos amigables con el medio ambiente. Los PAMs son moléculas de bajo peso molecular producidos de manera innata como parte de la primera línea de defensa que están ampliamente distribuidos en animales, plantas, hongos e incluso bacterias. A estas moléculas se les ha atribuido dos propiedades de interés: a) tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias, hongos, levaduras, parásitos, virus y células cancerígenas y b) su mecanismo de acción va dirigido al rompimiento o al daño de la membrana bacteriana lo que dificulta la generación de resistencia. Un ejemplo es el péptido básico Heveina cuyo tamaño va de 29-55 aminoácidos y fue aislado del árbol de látex (*Hevea brasiliensis*). Se caracteriza por presentar un sitio de unión a la quitina lo que permite la interacción con las paredes celulares fúngicas lo que le atribuye actividad antifúngica (Odintsova et al., 2020; Tam et al., 2015).

También existen proteínas que al hidrolizarse contienen secuencias entre 3 y 10 aminoácidos con actividad antimicrobiana. Un ejemplo es en la secuencia peptídica de la enzima RUBISCO la cual al hidrolizarse se liberan péptidos funcionales con actividad contra bacterias Gram+ y Gram-. Para identificar las secuencias de PAMs entre las proteínas, se han utilizado herramientas bioinformáticas que permiten identificarlos, predecir sus propiedades fisicoquímicas y visualizar su estructura tridimensional, lo que es de vital importancia para descifrar sus mecanismos de acción y el tipo de actividad que presenta. Posterior a esto, los resultados *in silico* son fundamentales para el diseño y producción de los PAMS, una de las alternativas más viable y novedosa es la producción a través de la tecnología recombinante. El enfoque recombinante es el medio más rentable para producción de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

los péptidos a gran escala, ya que se requieren grandes cantidades altamente purificados para poder realizar la evaluación de su funcionalidad. Entre los sistemas más utilizados y recomendables para la producción de proteínas heterólogas es *Escherichia coli* que es la plataforma que tiene una cinética de crecimiento rápida, son fáciles de cultivar y la transformación con ADN exógeno es rápida y fácil (Li, 2011; Rosano y Ceccarelli, 2014).

Por otro lado, las nanopartículas de plata (NPs) son partículas cuyo tamaño no exceden los 100 nm y se les ha atribuido la aplicación como agentes antimicrobianos ya que la plata tiene un amplio poder bactericida, por lo que ha despertado el interés en el desarrollo de nuevos protocolos de síntesis para modificar sus características y propiedades potencializando su actividad antimicrobiana. Existen diferentes protocolos para su síntesis entre ellos están la síntesis química, física y la síntesis verde o biológica. La síntesis verde sustituye los agentes reductores y estabilizadores químicos por proteínas, vitaminas, alcaloides, carbohidratos y antioxidantes, que se obtienen de organismos vivos como: bacterias, algas, hongos, levaduras y plantas. Además, esta metodología no usa agentes reductores y funcionalizadores tóxicos para el medio ambiente. Algunas de las plantas que se ha reportado para la síntesis verde de nanopartículas y con actividad antibacteriana son: *Azadirachta indica* que mostró actividad antibacteriana contra bacterias Gram+ y Gram- y *Boerhaavia diffusa* donde obtuvieron nanopartículas con una alta sensibilidad contra *F. Branchiophilum* (Ahmed et al., 2016; Kumar et al., 2014).

Opuntia ficus-indica, comúnmente denominada nopal, es una planta angiosperma y dicotiledónea que pertenece a la familia Cactácea, cuyo centro de origen es México. Su cultivo satisface las necesidades alimentarias por el consumo de sus tallos y frutos. Se ha demostrado que la ingesta de su fruto, denominado tuna, es una buena fuente de nutrientes y antioxidantes. Sin embargo, su consumo también genera desechos alimentarios, ya que la cáscara compone un 56.7% del fruto, lo que representan un problema ambiental grave debido al potencial crecimiento de microorganismos (Cerezal y Duarte, 2004; Russ y Meyer-Pitroff, 2004). En la temporada de la tuna se genera gran cantidad de desechos orgánicos de la cáscara los cuales se pueden utilizar en diferentes procesos biotecnológicos y en la producción de nanopartículas.

El reciente crecimiento en la disponibilidad de genomas y metagenomas ofrecen la oportunidad de obtener secuencias tanto de nucleótidos como de aminoácidos las cuales pueden ser analizadas con diferentes programas bioinformáticos especiales para predecir *in silico* la presencia de secuencias PAMs. Un ejemplo de un genoma secuenciado es el de *Sorghum bicolor* (sorgo) que fue secuenciado

en el 2017 y que es objeto de estudio debido a su poca caracterización, siendo la principal razón para elegirlo objeto de estudio.

Por lo que en el presente trabajo se realizaron dos estrategias para la síntesis de compuestos antimicrobianos derivados de plantas los cuales fueron: 1) la expresión heteróloga en sistemas bacterianos de péptidos antimicrobianos (PAMs); a partir de PCR y de genes sintéticos con fragmentos separadores ricos en guanina y serina para favorecer a la actividad individual de los péptidos en el gen sintético y 2) la síntesis verde de nanopartículas de plata a partir de la cáscara de la tuna. A partir de secuencias de genes Glioxalidas de sorgo, se identificaron y predijo *in silico* la actividad antibacteriana de PAMs. De estas, se realizó la expresión en sistemas bacterianos de un péptido parecido a Heveina proveniente de sorgo (SbHevein-like), y de los genes sintéticos solo se llegó a la construcción para que sea expresada y analizada en futuros trabajos. Por otro lado, se sintetizaron nanopartículas de plata a partir de extractos del fruto (tuna) de *Opuntia ficus-indica* (OfAgNPs) y se comprobó su actividad antibacteriana a concentraciones por debajo de su efecto tóxico en *Danio rerio* y *Arabidopsis thaliana*. Así también, se comprobó la funcionalidad de las OfAgNPs ya que inhiben el crecimiento de bacterias coliformes y mesofílicas aerobias con mayor eficiencia al proceso de cloración por lo que pudieran ser utilizados como proceso terciario en el tratamiento de aguas residuales.

II. Antecedentes

Péptidos Antimicrobianos (PAMs)

Los péptidos antimicrobianos son pequeñas moléculas con propiedades de inhibir el crecimiento de bacterias, hongos, levaduras, parásitos, virus y células cancerígenas. Estos péptidos se producen como parte de la primera línea de defensa de distintos organismos (Huan et al., 2020). Además son considerados de gran interés debido a su potencial uso como fármacos novedosos como respuesta al rápido incremento en la generación de resistencia a distintos fármacos por el abuso a los antibióticos (Parisien, et al., 2008; Bahar y Ren, 2013; Huan et al., 2020). Estos péptidos se distribuyen ampliamente en el reino vegetal y animal (Zasloff, 2002). Se ha identificado un amplio número de péptidos con actividad antimicrobiana, siendo que hasta octubre del 2021 se han reportado 3283 péptidos antimicrobianos en la base de datos Antimicrobial Peptide Database (APD), los cuales su origen se distribuye desde bacterias (371), archae (5), protistas (8), hongos (22), plantas (361) y animales (2431) (Wang et al., 2016). La mayoría de los PAMs presentan similitudes estructurales y en el número de aminoácidos con aproximadamente 10-60 aminoácidos (promedio de 33.26) y de naturaleza principalmente catiónica (carga positiva promedio de 3.32) (Huan et al., 2020).

Clasificación de los PAMs

Según Huan et al (2020), existen diversas formas de clasificación de los PAMs como se observa en la Figura 1, de acuerdo con su origen, actividad, características estructurales y la presencia de determinados aminoácidos. La descripción de cada categoría se encuentra en la Tabla 1.

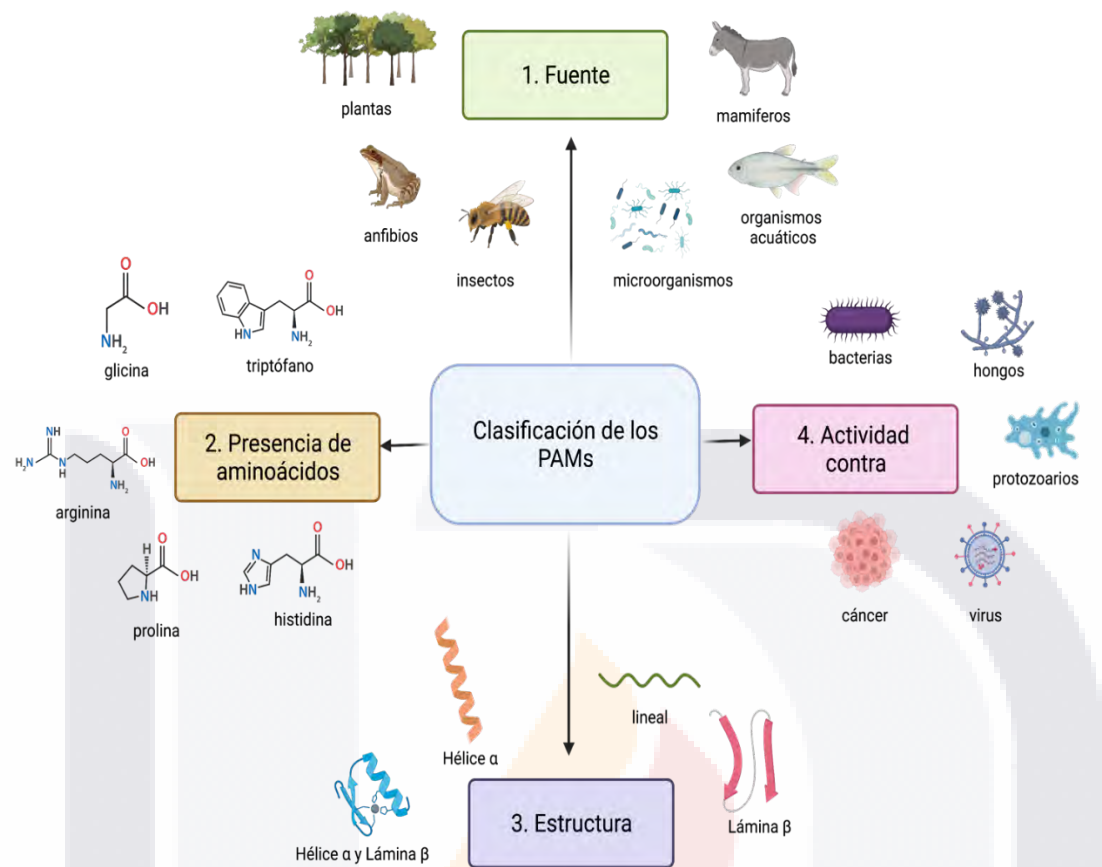


Figura 1. Tipos de clasificación de los PAMs. Basado en lo reportado por Huan et al., (2020).

Tabla 1. Clasificación de los PAMs

1. De acuerdo con su fuente			
Clasificación	Descripción	Ejemplos	Referencias
Mamíferos	Se han identificado en el ser humano, ovejas, vacas y otros vertebrados. Los principales tipos son las defensinas y catelicidinas.	Catelicidina LL-37, Lactoferrina (LF).	Bucki et al., 2010; Murata et al., 2013; Huan et al., 2020
Plantas	Forman parte del sistema de defensa de las plantas y se han aislado en raíces, semillas, flores y hojas. Se caracterizan por presentar carga positiva, puentes disulfuro y actúan sobre la membrana celular. Se clasifican en familias: defensinas, tioninas, péptidos del tipo heveínas (<i>hevein-type peptides</i>), péptidos del tipo knotinas (<i>knottin-type peptides</i>), proteínas que participan en la transferencia de lípidos (<i>lipid transfer proteins</i>), α -harpininas y snakininas.	Heveína aislada de <i>Hevea brasiliensis</i> , Snakin-1 de <i>Solanum tuberosum</i> .	Nawrot et al., 2014; Berthelot et al., 2016; Su et al., 2020
Anfibios	Son parte importante de su sistema inmune y son secretadas por la piel de los anfibios. Se ha demostrado que estos péptidos tienen actividad	Phylospetina-PV1 (PPV1) de <i>Phyllomedusa</i>	Liu et al., 2020; Wang, 2020

	contra bacterias Gram +, Gram -, hongos y células cancerígenas.	<i>vaillantii</i> , Dermaseptina de Phyllomedusa bicolor.	
Organismos acuáticos	Son producidos por los organismos acuáticos como defensa ante la invasión de microorganismos patógenos. Presentan actividades antimicrobianas (bacterias Gram + y Gram -), tienen actividad inmunomodulador y antitumoral.	Arenicinas aislados de <i>Arenicola marina</i> , Perinerina aislados de <i>Perinereis aibuhitensis</i> .	Wu et al., 2018
Insectos	Presentan efecto antimicrobiano mediante el rompimiento de la membrana, generalmente están formados por menos de 100 residuos de aminoácidos y son de naturaleza catiónica. Se clasifican en familias de acuerdo con su estructura: defensinas, crecopinas, drosocinas, atacinas, dipterocinas, ponerocinas, metchnikowins y melitina.	Crecopina D aislado de <i>H. Cecropia</i> , Lebocina aislado de <i>Bombyx mori</i> .	Wu et al., 2018
Microorganismos	Se han obtenido PAMs aislados de algunas bacterias y hongos.	Epidermina aislado de <i>Staphylococcus epidermidis</i> , Gallidermina aislado de <i>Staphylococcus gallinarum</i> .	Huan et al., 2020; Simons et al., 2020

2. De acuerdo con su presencia de aminoácidos

Clasificación	Descripción	Ejemplos	Referencias
Triptófano y Arginina	El triptófano es un residuo no polar que generalmente lo encontramos cerca del C-terminal del péptido y es muy común que al ser rico en triptófano también lo sea de arginina. Estos tipos de péptidos son permeables a la membrana y actúan a nivel intracelular.	Lactoferricina un péptido que producen los mamíferos.	Huan et al., 2020; Sarkar et al., 2021
Glicina	Existen ampliamente en la naturaleza y se caracterizan por ser ricos en el aminoácido no polar Glicina (14-22%) como por ejemplo las atacinas y las dipterinas.	Atacinina aislada de <i>Hyalophora ceropia</i> . Defensina aislada de <i>Ixodes persulcatus</i> .	Huan et al., 2020; Sarkar et al., 2021
Prolina	Son ricos en el aminoácido apolar Prolina y presentan un mecanismo de acción en donde son permeables a la membrana e inhiben el crecimiento bacteriano por interferir en procesos intracelulares, algunos de ellos se unen a los ribosomas e interfieren en la síntesis proteica.	Oncocinas de insectos (Onc112), Bactenecinas bovinas (Bac7).	Graf et al., 2017
Histidina	Son ricos de residuos del aminoácido básico Histidina y se caracterizan por presentar permeabilidad en las membranas.	Crisofsina-1 aislada de <i>Pagrus major</i>	Mason et al., 2007; Huan et al., 2020

3. De acuerdo con su estructura			
Clasificación	Descripción	Ejemplos	Referencias
Hélice α	Junto con la estructura de lámina β son las más comunes, se caracterizan por tener una conformación estructural de hélice α .	Mycoprex (XMP 366) aislado de humano, Pexiganan (MSI-78) Aislado de la piel de xenopus	Park y Hahm, 2005
Lámina β	Se caracterizan por la presencia de láminas β antiparalelas, las cuales están estabilizadas por puentes disulfuro.	Tachiplesina I	Park y Hahm, 2005
Lineal o extendida	Estos péptidos carecen de una estructura secundaria, generalmente son ricos en prolina y glicina.	Indolicidina	Park y Hahm, 2005
Hélice α y Lámina β	Los PAMs presentan estructuras de hélice α y lámina β .	Defensina vegetal Psd1 de <i>Pisum sativum</i>	Park y Hahm, 2005; Almeida et al., 2002
4. De acuerdo con su actividad			
Clasificación	Descripción	Ejemplos	Referencias
Antibacteriana	Tienen actividad de amplio espectro, rápida actividad antibacteriana y una baja probabilidad de generar resistencia, actúan contra Bacterias Gram + y Gram -.	Purotioninas, CaThi aislado de <i>Capsicum anuum</i> , Ep-AMP1 aislado de <i>Echinopsis pachanoi</i> .	Marr et al., 2006; Hilpert et al., 2005; Schmidt et al., 2019; Aboye et al., 2015
Antifúngica	Se han propuesto como una alternativa contra infecciones fúngicas, ya que se caracterizan por su poca toxicidad para el organismo huésped y su baja tasa de generación de resistencia.	β -defensina-1, lactoferrina y LL-37	Buda de Cesare et al., 2020; Ballard et al., 2020
Antiviral	Se ha demostrado que los PAMS tienen actividad antiviral contra virus de ARN y ADN envueltos, con algunas excepciones de virus no envueltos.	Defensinas humanas se ha demostrado que tienen actividad contra el virus del VIH, LL-37 tiene actividad contra los virus de VIH-1, hepatitis C y Rhinovirus.	Elnagdy y Alkhazindar, 2020; Ahmed et al., 2019
Anticancerígena	Algunos PAMs son capaces de generar citotoxicidad a células cancerígenas humanas, ya que se unen a cargas negativas de la membrana plasmática de las células cancerígenas.	Cathelicidins LL37 hCAP18 de humano, Magainin 2	Tornesello et al., 2020

		De rana, Gomesina de araña.	
Antiprotozoarios	Se han propuesto como una alternativa o complemento al uso de fármacos antiprotozoarios debido a que poseen propiedades como menor probabilidad de generar resistencia por sus mecanismos de acción, actividad de amplio espectro y baja toxicidad.	Magainina II, Angiotensina II, Gomesina.	Giovati et al., 2018; Mor, 2009.

Mecanismo de acción de los PAMs

La carga catiónica, la anfipaticidad, la composición en cuanto aminoácidos y el tamaño son fundamentales para que los PAMs puedan interaccionar e insertarse en la bicapa lipídica de la membrana celular debido a su carga negativa (aniónica), por lo que su mecanismo de acción esta principalmente asociado a la generación de poros y por consecuencia el rompimiento de estos organelos celulares (Park y Hahm, 2005). En el caso de las bacterias Gram +, pueden interactuar con los ácidos teicoicos y lipoteicocios y en el caso de los Gram –, con los lipopolisacáridos (Téllez y Castaño, 2010; 2011). Además de que se les ha atribuido que si logran penetrar la membrana o pared celular sin generar ningún daño puede actuar a nivel intracelular (Figura 2A). A nivel intracelular se les atribuye actividad inmunomodulador, es decir que tienen la habilidad de promover que el sistema inmune sea el encargado de eliminar al microorganismo patógeno (Kang et al., 2019), además de que son capaces de interactuar con biomoléculas como lo son el ADN y las proteínas. En cuanto al ADN se ha visto que algunos PAMs se acumulan dentro de la célula e interactúan con los ácidos nucleicos a partir de las histonas, e incluso se unen a enzimas como la Topoisomerasa I, la ARN polimerasa y enzimas que intervienen en la síntesis proteica. En cuanto a las proteínas, los PAMs pueden alterar la síntesis y su plegamiento (Téllez y Castaño, 2010; 2011).

Con base en los mecanismos de acción con la membrana celular los principales mecanismos de acción se describen a continuación (Figura 2B):

- a) **Modelo de alfombra:** no todos los PAMs son capaces de producir poros, algunos se sitúan sobre pequeñas áreas de forma paralela de la membrana a modo de una alfombra hasta que la debilitan y actúan como detergentes, al ser anfipáticas desplazan los fosfolípidos alterando las propiedades de la membrana y como consecuencia generando una ruptura que lleva a la

muerte celular (Figura 2B) (Barbosa Peregrini et al., 2011; Li et al., 2017). Algunos ejemplos de péptidos que actúan bajo este modelo son: dermaseptina S, crecopina, caerina y ovispirina (Park y Hahm, 2005).

- b) **Mecanismo de barril:** los PAMs con estructura de hélice α interactúan con la membrana, principalmente con los fosfolípidos, los PAMs se insertan perpendicularmente en la bicapa lipídica, algo similar a un canal iónico (Seyfi et al., 2020), en donde las cadenas hidrofóbicas interactúan con el centro hidrofóbico de la membrana generando un poro hidrofílico, la formación de este poro genera una pérdida del equilibrio osmótico, fuga de metabolitos, despolarización de la membrana, interrupción de procesos de respiración y llegar hasta la muerte celular. Un ejemplo de PAM que utiliza este mecanismo de acción es la Alameticina (Figura 2B) (Park y Hahm, 2005; Wimley, 2010; Tellez y Castaño, 2010; 2011).
- c) **Mecanismo de agregados:** este mecanismo actúa similar a los detergentes, en donde el péptido se asocia a la membrana y forma una estructura similar a una micela formando un canal que favorece a la pérdida de iones por lo que hay pérdida de material citoplasmático o en su defecto que el péptido pueda ingresar a la célula y generar un efecto intracelular (Figura 2B) (Tellez y Castaño, 2010; 2011).
- d) **Mecanismo de agujero de gusano/ forma anular:** los péptidos se reorientan en la membrana, mueven los lípidos a partir de interacciones electrostáticas generando un doblez en la membrana y culminando en la formación de un poro (Figura 2B) (Tellez y Castaño, 2010; 2011).

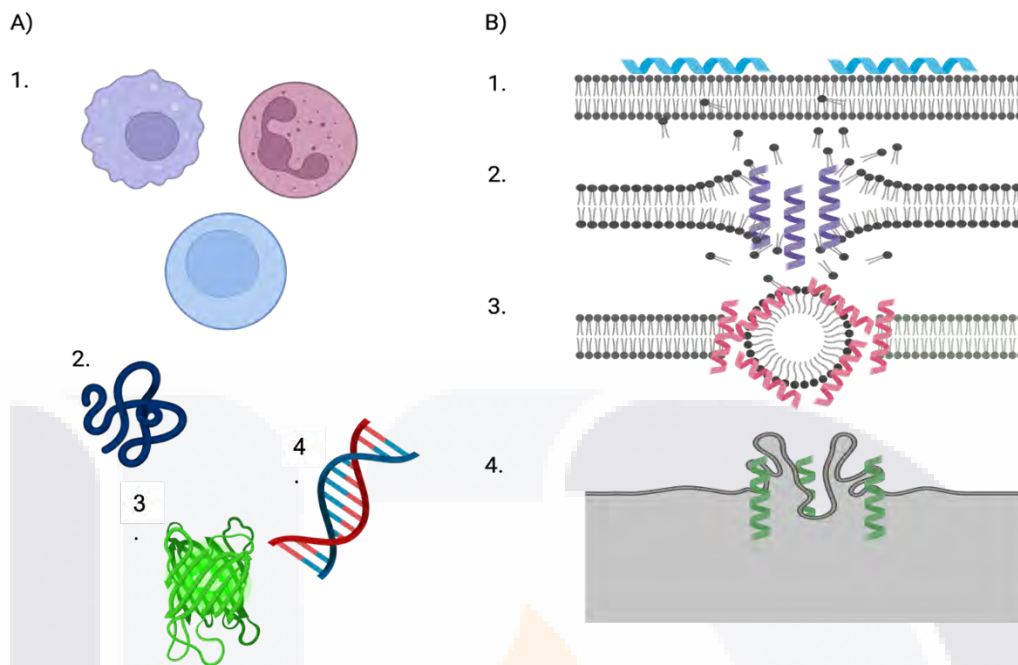


Figura 2. Mecanismos de acción de los PAMPs A. Mecanismos intracelulares, 1. Inmunomoduladores, 2. Modificación de las proteínas, 3. Evita el plegamiento de las proteínas, 4. Daño al ADN, B. Mecanismos de daño a la membrana, 1. Mecanismo de alfombra, 2. Mecanismo de barril, 3. Mecanismo de agregados, 4. Mecanismo de agujero de gusano/forma anular. Realizado en base al reportado por Téllez y Castaño (2010; 2011).

Los PAMPs a diferencia de los antibióticos tradicionales no actúan modificando o inhibiendo una enzima específica, ya que su modo de acción va más enfocado en generar un daño a la membrana por los mecanismos mencionados anteriormente, por lo que se dificulta la generación de resistencia, lo que ha hecho que aumente su uso para el desarrollo de compuestos antimicrobianos (Wang, 2015).

PAMPs producidos por plantas

Los PAMPs producidos por las plantas tienen como función principal la defensa ante organismos fitopatógenos. Se han aislado de raíces, semillas, flores, tallos y hojas de un gran número de plantas a los cuales se les han atribuido actividad no solo contra fitopatógenos sino también contra bacterias patógenas para el ser humano (Nawrot et al., 2014). Se caracterizan por ser:

- Moléculas de tamaño pequeño, aproximadamente 12-50 aminoácidos las cuales son sintetizadas en los ribosomas y para la generación de polipéptidos maduros es necesario liberarlos de precursores proteicos y modificaciones postraduccionales (Li et al., 2021).
- Generalmente tienen similitud en cuanto a su estructura y su secuencia, con carga positiva (catiónicos), además de que contienen regiones hidrofílicas e hidrofóbicas (Li et al., 2021).
- Su modo de acción es mediante la unión a diferentes sitios de la membrana plasmática o generando daño intracelular, además de que se ha demostrado que presentan bajo citotoxicidad en mamíferos (Li et al., 2021).
- La ruptura de la membrana se puede llevar por tres modos de acción: modelo duela de barril, modelo de agujero de gusano o poro y modelo de alfombra), esto hace que sea más complicado que se desarrolle la resistencia a estas moléculas (Figura 2).
- Están compuestos por una alta cantidad de cisteína lo que favorece la formación de enlaces disulfuro, que les confieren una gran estabilidad química, térmica y proteolítica (Silvia, n.d.; Tam et al., 2015; Nawrot et al., 2014).

Los PAMs se agrupan en diferentes familias entre las que se destacan: defensinas, tioninas, péptidos del tipo heveínas (*hevein-type peptides*), péptidos del tipo knotinas (*knottin-type peptides*), proteínas que participan en la transferencia de lípidos (*lipid transfer proteins*), α -harpininas y snakinas (Tam et al., 2015).

Péptidos del tipo Heveina (*hevein-type peptides*)

El péptido heveina está conformado por aproximadamente 29-45 aminoácidos y se caracteriza por ser ricos en glicina y cisteína (8 residuos de cisteína que participan en la estabilización de la proteína) y actúan principalmente sobre la quitina (Van Damme et al., 1999; Parijs et al., 2016). La heveina original se aisló por primera vez en el látex del árbol del látex: *Hevea brasiliensis* por Archer (1976), presenta ocho cisteínas y principalmente está formado por aminoácidos básicos de 29 a 45 aminoácidos con tres a cinco puentes disulfuro formados entre las cisteínas, el dominio Heveina se une a la quitina (Zoo et al., 1998). Van Parijs et al., 1991, probaron el purificado del péptido de Heveina aislado de *Hevea brasiliensis* y fue efectivo contra seis especies de hongos (*Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporium f sp. pisi*, *Phycomyces blakesleeonius*, *Phyrenophora triticirepentis*, *Pyricularia oryzae*, *Septoria nodorum* y *Trichoderma homatum*).

A partir de esta heveina se han identificado moléculas similares en diferentes plantas (Tam et al., 2015), a las cuales se les ha atribuido que inhiben el crecimiento de hongos con presencia de quitina y defiende a las plantas contra el ataque a un amplio rango bacterias fitopatógenos (Beintema et al., 1994; Gidrol et al., 1994) (Tabla 2), por lo que uno de los objetivos de este trabajo es identificar un péptido tipo Heveina en el genoma de *Sorghum bicolor* para probar su actividad antimicrobiana.

Tabla 2. Proteínas similares a Heveina identificadas en diferentes especies vegetales.

Nombre	Organismo del cual fue identificado	Actividad	Referencia
SN-HLPf	En el fruto de <i>Sambucus nigra</i>	<i>Neurospora crassa</i> y <i>Fusarium culmorum</i>	Van Damme et al., 1999
Pn-AMP1 y Pn-AMP2	<i>Pharbitis nil</i>	<i>Phytophthora capsici</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> .	Lee et al., 2003
Ac-AMP1 y Ac-AMP2	<i>Amaranthus caudatus</i>	Bacterias Gram +	Barbosa Pelegrini et al., 2011
Fa-AMP1 y Fa-AMP2	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Bacterias Gram + y Gram -	Barbosa Pelegrini et al., 2011
WjAMP1	<i>Eutrema wasabi</i>	Bacterias Gram + y Gram -	Barbosa Pelegrini et al., 2011

Péptidos identificados en secuencias proteicas

Así como las plantas son capaces de sintetizar moléculas de defensa, también es posible que dentro de las secuencias de aminoácidos de proteínas nativas se encuentren péptidos de menor tamaño los cuales podrían tener efectos antibacterianos y antifúngicos. Se han identificado estos péptidos en las proteínas de la leche, en donde a partir de su hidrólisis con enzimas gastrointestinales fue posible identificar y caracterizar péptidos con actividad antimicrobiana; como, por ejemplo, se identificó cinco péptidos en la proteína de la β -lactoalbumina y un fragmento en la α -lactoalbúmina con actividad antibacteriana (Théolier et al., 2013). En alfalfa se ha aislado y caracterizado biopéptidos activos a partir de la hidrólisis de la enzima RuBisCO. Se identificaron 12 péptidos de los cuales tres (MDN, ELAAAC, LRDDF), mostraron actividad antibacteriana contra bacterias Gram – como: *Escherichia coli* y *Salmonella entérica* y contra Gram +: *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis* (Kobbi et al., 2015). Por lo que se busco identificar probables péptidos antimicrobianos dentro las secuencias proteicas de las enzimas

glioxalasa de *Sorghum bicolor* y a partir de esto generar el diseño de un gen sintético con estas propiedades para la producción de la proteína recombinante y comprobar su funcionalidad.

Nanomateriales y Nanopartículas (NPs)

Se define como nanomaterial, a aquel material que posee alguna de sus dimensiones externas dentro de la nanoescala, dentro del rango de 1-100 nanómetros (nm) de longitud (Foss Hansen et al., 2007; Boholm y Arvidsson, 2016). Dentro de los nanomateriales se encuentran las nanopartículas que se definen como aquellas partículas que poseen un tamaño aproximado de entre 1-100 nm en sus tres dimensiones (Sinervo, 2008; Boholm y Arvidsson, 2016). La ventaja de trabajar con materiales en la escala nanométrica es que cambian sus propiedades físicas y químicas: características ópticas, de reactividad y dureza a comparación de cuando se encuentran en el orden micrométrico (Wing, 2006; Saleh, 2020). Las NPs son moléculas complejas que están conformadas por tres capas: la capa superficial la cual puede estar recubierta o funcionalizada con pequeñas moléculas, iones metálicos, surfactantes y polímeros que pueden contribuir a las propiedades que adquieren las NPs, una capa que cubre el núcleo y el núcleo que es la parte central de la NP (Khan et al., 2019).

Tipos de nanomateriales

Existen distintos tipos de nanomateriales, los cuales se clasifican de acuerdo con su tamaño, características y aplicaciones. Los diferentes tipos de nanomateriales se ejemplifican en la Figura 3.

- **Nanotubos de carbón:** son alótropos del carbón como, por ejemplo: diamante, el grafito o los fullerenos, cuyo diámetro va de entre 0.5-3 nm, con una longitud de entre 20-1000 nm. Se caracterizan por ser notablemente fuertes y poseer propiedades eléctricas únicas como la de ser conductibles, semiconductibles o aislantes, además de poseer estabilidad química y mecánica, se utilizan en el desarrollo de materiales que se utilizan para fabricar equipos electrónicos, ópticos y terapéuticos (Andrade Guel et al., 2012; Bathia, 2016; Mohanta et al., 2019)
- **Dendrimeros:** también se les llama arborescentes o moléculas en cascada y son macromoléculas globulares simétricas cuya estructura está bien definida, homogénea y monodispersa (generalmente de 5000-500000 g/mol) (Duncan e Izzo, 2005; Abbasi et al., 2014), altamente ramificadas, cuyas ramas se originan de su centro, su tamaño es menor al de los 10 nm. Se producen por polimerización controlada, poseen propiedades biológicas como polivalencia,

autoensamblaje, interacciones electrostáticas, estabilidad química, baja citotoxicidad y solubilidad. Estos materiales han demostrado ser prometedores en el campo médico como en la administración de genes, en el desarrollo de vacunas, antivirales, antibacterianos y en la terapia anticancerígena (Gillies y Frechet, 2005; Andrade Guel et al., 2012; Abbasi et al., 2014).

- **Liposoma:** son vesículas esféricas formadas de una bicapa lipídica cuyo tamaño es de entre 400 nm-2.5 μ m. Poseen propiedades específicas como la biocompatibilidad, son biodegradables y poseen potencial para su uso en las áreas de nanomedicinas, cosmética e industria alimentaria, dentro de estas vesículas se pueden almacenar fármacos y se utilizadas como vehículos para su administración, como por ejemplo en el tratamiento de cáncer (Malam et al., 2009; Panahi et al., 2017).
- **Nanopartículas metálicas:** se caracterizan porque en tres de sus dimensiones son menores a los 100 nm (Boholm y Arvidsson, 2016), su síntesis genera la producción de coloides metálicos como, por ejemplo: oro, plata, platino, titanio, zinc, hierro, cerio y talio, así como los compuestos derivados de los mismos como óxidos, hidróxidos, sulfitos, fosfatos, fluoruros y cloruros (Piñón-Segundo et al., 2013), Principalmente las nanopartículas de plata (AgNPs) han recibido especial interés por sus diversas aplicaciones tales como: antibacterianas, antifúngicas, antidiabéticas y anticancerígenas (Gopinath y Velusamy, 2013; Gaikwad et al., 2013; Vasanth et al., 2014; Xu et al., 2020).
- **Quantum dot:** es considerado un nanocrystal semiconductor fotoestable sintetizado a partir de los elementos que se encuentran en las columnas II-VI y III-V de la tabla periódica, su tamaño oscila entre 2-9.5 nm y se caracterizan por generar fluorescencia y ser altamente fotoestables (Andrade Guel et al., 2012). Se han utilizado en aplicaciones biomédicas que involucran fluorescencia como las sondas fluorescentes, esto debido a sus parámetros fisicoquímicos como su composición química, carga superficial, tamaño, solubilidad en agua y la estabilidad de su fluorescencia (Zhang et al., 2009).
- **Micelas poliméricas:** son moléculas que se encuentran dentro de la escala nanométrica que se forman por sus polímeros anfífilos que se autoensamblan al encontrarse en un solvente acuoso (Ghosh y Biswas, 2021). Se caracterizan por su biocompatibilidad, baja toxicidad, morfología y alta estabilidad, debido a esto se ha implementado su uso en el tratamiento de múltiples enfermedades como: cáncer, terapia de estrógenos y antiviral (Croy y Kwon, 2006; Mourya et al., 2011; Yadav et al., 2019).
- **Nanopartículas poliméricas:** Se clasifican en dos tipos dependiendo de su modo de síntesis: nanoesferas y nanocápsulas, ambos materiales tienen un tamaño de entre 1-1000 nm las cuales

pueden poseer compuestos activos dentro o en la superficie del núcleo polimérico (Andrade Guel et al., 2012; Zielińska et al., 2020). Las nanoesferas son un sistema matricial con forma esférica, en la cual el agente activo se encuentra disperso en la matriz polimérica, en cambio las nanocápsulas son sistemas vesiculares que rodean al agente activo (Urrejola et al., 2018). Las NPs poliméricas se les tienen un gran potencial para la administración de fármacos en el tratamiento de diversas enfermedades (Zielińska et al., 2020).

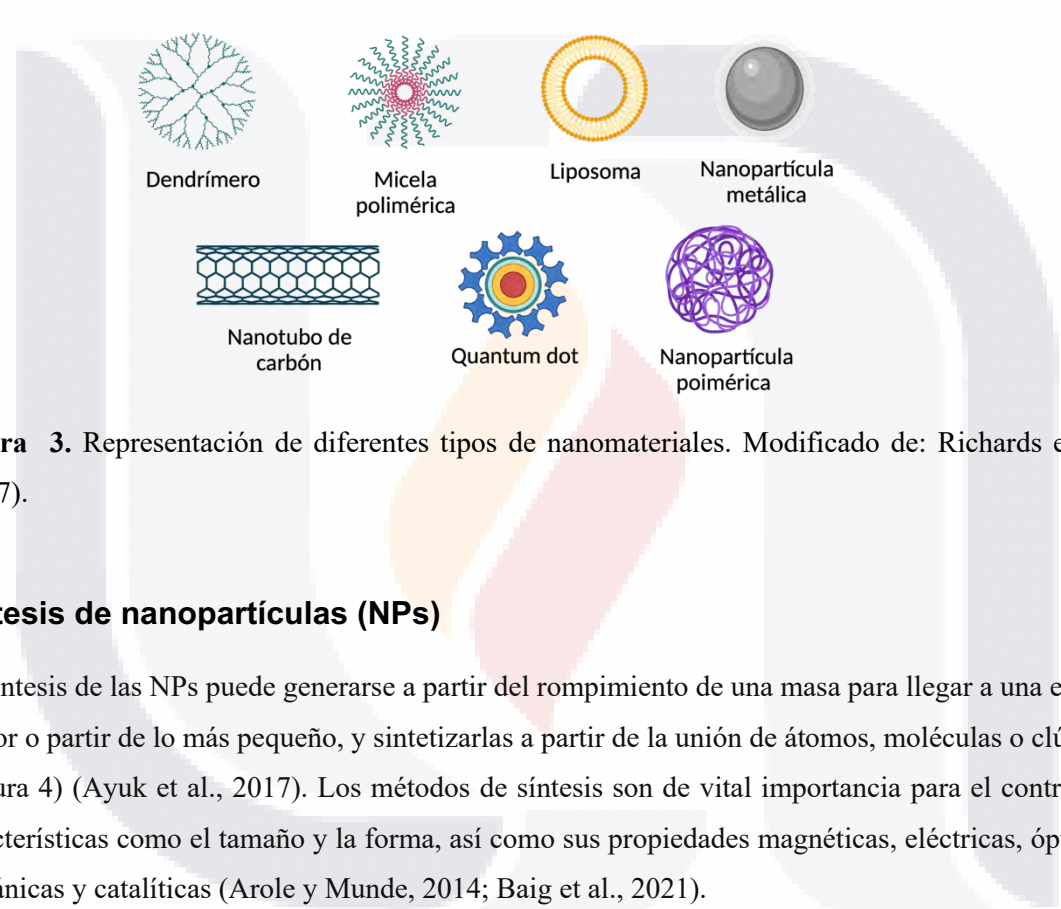


Figura 3. Representación de diferentes tipos de nanomateriales. Modificado de: Richards et al., (2017).

Síntesis de nanopartículas (NPs)

La síntesis de las NPs puede generarse a partir del rompimiento de una masa para llegar a una escala menor o partir de lo más pequeño, y sintetizarlas a partir de la unión de átomos, moléculas o clústers (Figura 4) (Ayuk et al., 2017). Los métodos de síntesis son de vital importancia para el control de características como el tamaño y la forma, así como sus propiedades magnéticas, eléctricas, ópticas, mecánicas y catalíticas (Arole y Munde, 2014; Baig et al., 2021).

Los métodos se clasifican en dos tipos y se describen a continuación (Figura 4):

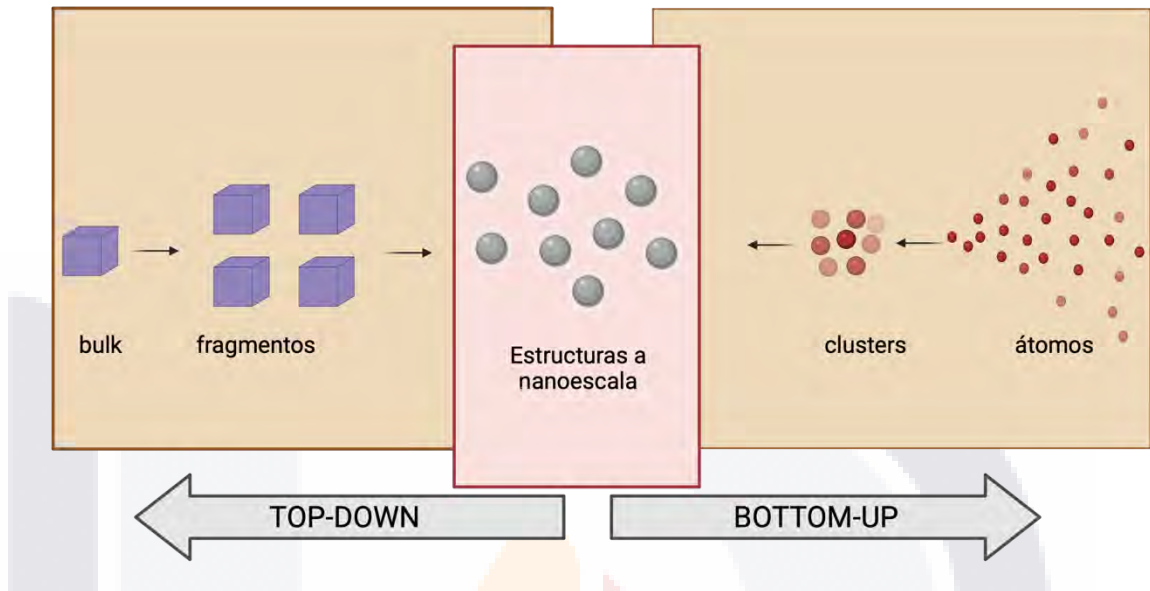


Figura 4. Métodos de síntesis de nanomateriales. Modificada de: Some et al., 2018.

- **Top-down:** consiste en el rompimiento o la disminución gradual de regiones selectivas de un material (bulk) esto con la finalidad de conseguir un material en la escala nanométrica, a partir de técnicas como: métodos electroquímicos, sonodecomposición, pulverización catódica, el grabado químico y la ablación térmica o láser (Rauwel, 2015; Zhang et al., 2016; Some et al., 2018).
- **Bottom up:** es lo contrario al Top-down, en esta técnica se parte de los átomos de los elementos, moléculas o de los precursores para formar los nanomateriales (Arole y Munde, 2014) y a partir de procesos como la condensación, deposición de vapor, reducción química, spray de pirolisis y deposición química/electroquímica se van a generar estructuras en una escala nanométrica, este proceso construye de lo más sencillo a lo más complejo (Sarkar et al., 2014; Some et al., 2018).

Dentro de las técnicas de síntesis se incluyen procesos físicos, químicos y biológicos, los cuales hacen posible la producción de los nanomateriales (Some et al., 2018). Los procesos físicos generalmente son caros, utilizan radiación como agentes reductores, con tiempos largos de síntesis y alto consumo de energía. Dentro de este tipo de métodos se incluyen la radiólisis (Temgire y Joshi, 2004), ultrasonidos (Wani et al., 2011), microondas (Pal et al., 2009) y la técnica de evaporación-

condensación (Nomoev y Bardakhavov, 2012; Sarsar et al., 2014; Some et al., 2018). Estos métodos tienen como ventaja la ausencia de solventes que generan contaminantes y la uniformidad de la distribución de las NPs (Iravani et al., 2014). Mientras que los métodos químicos para la síntesis de NPs inorgánicas son ampliamente aceptados y practicados, generalmente se sintetizan por la reducción u oxidación de iones metálicos (Wang et al., 2005), ablación laser (Dolgaev et al., 2002), entre otras. Dentro de este tipo de procesos la reducción química de agentes orgánicos e inorgánicos es el más común, sencillo y con mayor rendimiento (Sarsar et al., 2014; Iravani et al., 2014), el proceso incluye tres componentes: precursores metálicos, agentes reductores y agentes estabilizantes, el proceso consiste principalmente en la reducción de las sales de plata en dos etapas: nucleación y posteriormente su crecimiento (Baker et al., 2005; Wei et al., 2015; Zhang et al., 2016). Los métodos químicos se caracterizan por tener la ventaja de una producción sencilla a bajo costo y con alto rendimiento (Sarsar et al., 2014; Zhang et al., 2016). Generalmente se utilizan compuesto como polivinilpirrolidona (PVP), citrato de sodio, ácido ascórbico, alcohol y borohidruro como agentes reductores (Iravani et al., 2014, Wei et al., 2015; Zhang et al., 2016), además de que se añaden agentes estabilizantes como el polietilenglicol (PEG) que evitan la aglomeración y por lo tanto la precipitación de las nanopartículas (Pinzaru et al., 2018).

Biosíntesis de nanopartículas de plata

Los procesos de síntesis química pueden aumentar la toxicidad de la NPs por su capacidad de absorber sustancias (Hebeish et al., 2010; Iravani, 2011; Iravani et al., 2014), por lo que se ha desarrollado otra alternativa que es la biosíntesis o síntesis verde en la que se sustituyen los agentes reductores y estabilizadores químicos por proteínas, vitaminas, alcaloides, carbohidratos y antioxidantes, que se obtienen de organismos vivos como: bacterias, algas, hongos, levaduras y plantas (Hebeish et al., 2010; Iravani, 2011; Iravani et al., 2014; Wei et al., 2015). Los extractos orgánicos funcionan como agentes reductores, favoreciendo a la transformación de los iones inorgánicos metálicos en nanopartículas de metales aprovechando las capacidades reductoras de los metabolitos presentes en los sistemas biológicos (Gómez-Garzón, 2018) (Figura 5).

Las ventajas que se tienen con esta técnica son: la reducción de costos durante la síntesis, los procesos son más sencillos, son procesos amigables con el medio ambiente, con altos rendimientos y el producto resultante es compatible para aplicaciones farmacéuticas y uso biomédico (Hebeish et al., 2010; Iravani et al., 2014; Zhang et al., 2016; Gómez-Garzón, 2018). Algunos ejemplos de nanopartículas biosintetizadas, así como sus características y aplicaciones se muestran en la Tabla 3.

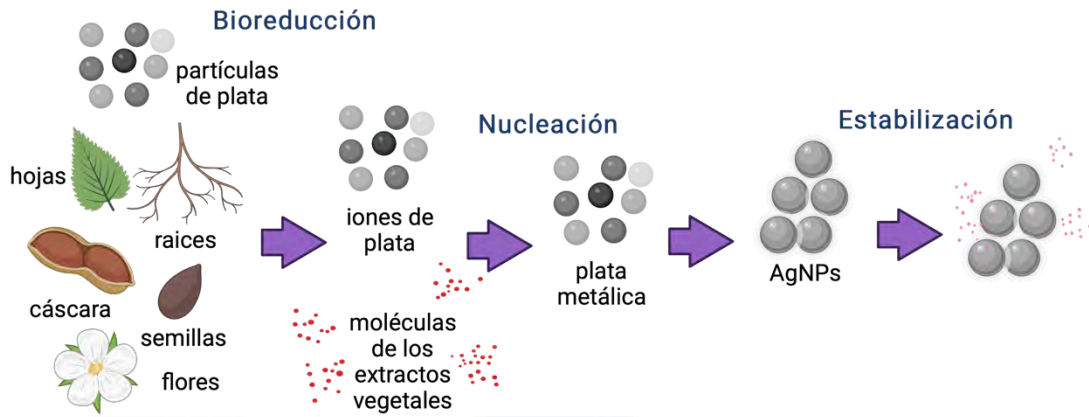


Figura 5. Proceso de biosíntesis de AgNPs a partir de plantas. Realizado en base a Gómez-Garzón, (2018).

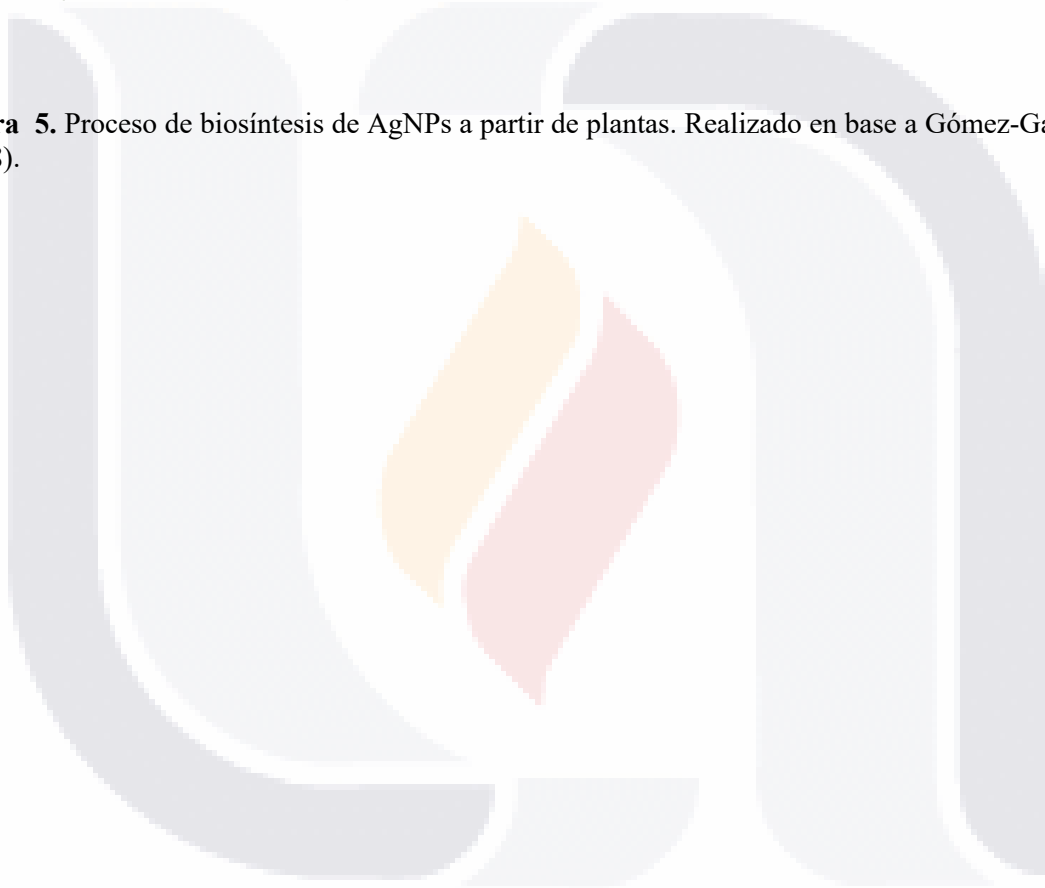


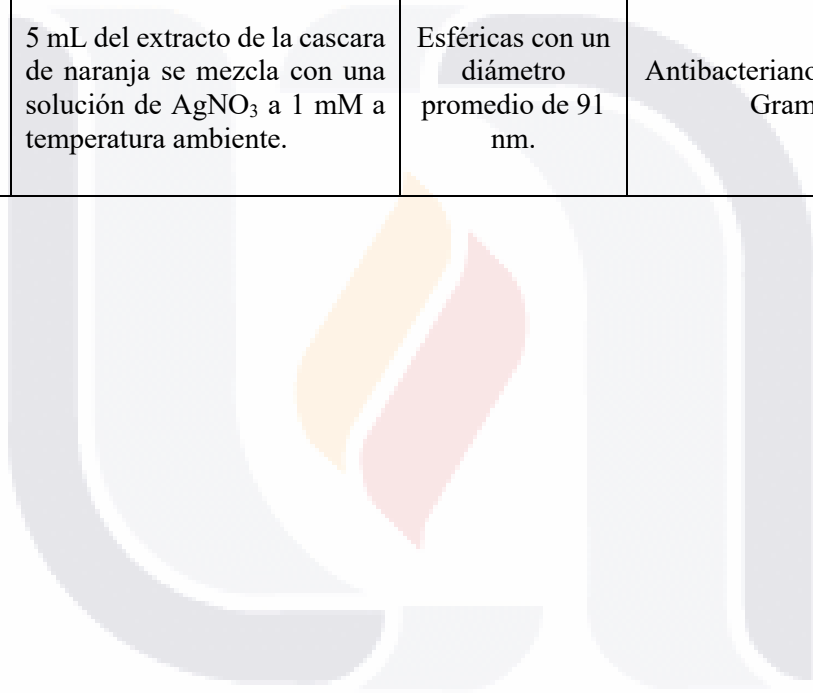
Tabla 3. Trabajos de síntesis verde de AgNPs previamente reportados.

Material vegetal	Tipo de extracto	Metodología de síntesis	Características de las AgNPs	Actividad	Referencia
Piña (<i>Ananas comosus</i>)	Extracto acuoso (jugo de piña)	Relación 1:10 (jugo de piña y de la solución de AgNO ₃ a 10,000 ppm).	Esféricas con un diámetro promedio de 12 nm.	No se reporta	(Ahmad y Sharma, 2012)
Nopal (<i>Opuntia ficus-indica</i>)	Extracto acuoso de cladodios	60 ml de H ₂ O, 4 ml de Hidróxido de amonio 4%, 8 ml de AgNO ₃ 10 mM, 8 ml de suspensión de extracto de nopal (0.2 g/ 8 ml).	Esféricas con un diámetro de 10 nm	No se reporta	(Ledezma et al., 2014)
Manzana roja (<i>Malus domestica</i>)	Extracto acuoso de la manzana	Adición de 5 mL del extracto acuoso a 50 mL de una solución acuosa de nitrato de plata (0.1M) a temperatura ambiente.	Forma similar a una flor con un diámetro promedio de 145 nm	No se Reporta	(Umoren et al., 2014)

<p>Orégano cubano (<i>Coleus aromaticus</i>)</p>	<p>Extracto acuoso de las hojas</p>	<p>Las NPs se preparan por la adición de 90 mL de nitrato de plata 1 mM con 10 mL del extracto acuoso de las hojas y se incubó por 10 min a temperatura ambiente.</p>	<p>Esféricas con un diámetro de entre 40-50 nm</p>	<p>Antibacteriana (<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Klebsiella planticola</i>)</p>	<p>(Vanaja y Annadurai, 2013)</p>
<p>Pasto</p>	<p>Extracto acuoso del pasto</p>	<p>Se añadieron diferentes volúmenes de nitrato de plata (0, 450, 1125, 1800 y 2250 µl) de una solución stock de nitrato de plata (0,1 mol) a 15 ml del extracto; luego, el volumen final de la mezcla de reacción (extracto + nitrato de plata) alcanzó los 45 ml con agua desionizada, lo que llevo a concentraciones finales preparadas de nitrato de plata a 0, 1, 2.5, 4 y 5 mM µg/ml, respectivamente. La mezcla de reacción se mantuvo en la oscuridad a 28°C.</p>	<p>Esférica-ovalada con un diámetro promedio de 15 nm.</p>	<p>Antibacteriana (MIC= 3 µg/ml tienen efecto contra <i>Pseudomonas aureginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i>) Antifúngica (A 20 µg/ml se obtuvo un efecto inhibitorio del 90% contra <i>Fusarium solani</i>) Anticancerígeno (A 5 µg/ml la sobrevivencia de las células cancerígenas decrece un 30%).</p>	<p>(Khatami et al., 2014)</p>
<p>Almácigo de Canarias (<i>Pistacia atlantica</i>)</p>	<p>Extracto acuoso de la semilla</p>	<p>A 1 mL del extracto se le añade a 10 mL de nitrato de plata (AgNO₃) 1 mM y se deja a temperatura ambiente en un agitador.</p>	<p>Esféricas con un diámetro promedio de 35 nm</p>	<p>Antibacteriana (Actividad contra <i>S. aureus</i>)</p>	<p>(Sadegi et al., 2015)</p>

<p>Sauzgatillo chino (<i>Vitex Negundo L.</i>)</p>	<p>Extracto metanoico de las hojas</p>	<p>0.5 g del extracto crudo se añadieron a agua destilada desionizada (100 mL) con agitación vigorosa durante 1 h. Después se agregaron 100 mL de AgNO₃ (1×10^{-1} M) y se mezclaron a temperatura ambiente (25 °C) durante 48 h.</p>	<p>Estructura cubica centrada en las caras con un diámetro promedio de 18.2 nm.</p>	<p>Antibacteriana (Bacterias Gram + y Gram -)</p>	<p>(Zargar et al., 2011)</p>
<p><i>Ferulago macrocarpa</i></p>	<p>Extracto acuoso de las flores</p>	<p>El extracto de las flores se mezcló con una solución de AgNO₃ 1 mM en diferentes volúmenes (1:1, 1:2, 1:4, 3:4 y 3:2), en diferentes pH (4, 5,7, 9 y 11) a diferentes temperaturas (30, 60 y 80 °C), la mezcla se incubó en la oscuridad.</p>	<p>Esféricas con un diámetro promedio de 17 nm.</p>	<p>Antibacteriana y Antifúngica (Las NPs tienen actividad contra <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Klebsiella pneumonia</i>, <i>Bacillus cereus</i>, <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i>).</p>	<p>(Azarbani y Shiravand, 2020)</p>
<p><i>Allium cepa</i></p>	<p>Extracto acuoso de los bulbos</p>	<p>50 mL de la solución de AgNO₃ 0.1 M se mezcló con 25 mL del extracto del ajo, para posteriormente incubarse a la oscuridad.</p>	<p>Esféricas con un diámetro promedio de</p>	<p>Antidiabética y Antioxidante</p>	<p>(Jini y Sharmila, 2020)</p>
<p><i>Camellia Sinensis</i></p>	<p>Extracto acuoso de las hojas</p>	<p>100 mL de AgNO₃ (1 mM) se mezcló con 12 mL del extracto del té a temperatura ambiente.</p>	<p>Estructura cúbica con un tamaño aproximado de 4 nm.</p>	<p>No se reporta</p>	<p>(Loo et al., 2012)</p>

<i>Helicteres isora</i>	Extracto acuoso de las raíces	Una solución de AgNO ₃ 1 mM se mezcló con el extracto de las raíces en una relación 1: se mezcló y se e incubó a temperatura ambiente por 6 horas.	Esféricas con un tamaño de entre 30-40 nm.	Antioxidante Antibacteriano	(Bhakya et al., 2016)
Naranja	Extracto de la cascara de naranja	5 mL del extracto de la cascara de naranja se mezcla con una solución de AgNO ₃ a 1 mM a temperatura ambiente.	Esféricas con un diámetro promedio de 91 nm.	Antibacteriano (Gram + y Gram -)	(Awad et al., 2014)



Caracterización de las AgNPs

La caracterización de las AgNPs es de suma importancia para generar una evaluación de los aspectos funcionales de las partículas sintetizadas, a partir de estas técnicas se obtienen sus propiedades fisicoquímicas como el tamaño, morfología, funcionalización y la carga superficial (Bathia, 2016; Zhang et al., 2016). Las técnicas más comunes de caracterización de NPs se describen a continuación:

1. Espectroscopia UV-visible

Esta técnica es muy usada para generar la caracterización primaria de las NPs sintetizadas, además de que se utiliza para la comprobación de la síntesis (presencia de plata) y de la estabilidad de las AgNPs (Zhang et al., 2016). La coloración de las soluciones coloidales generadas después de la síntesis de las AgNPs se debe a un fenómeno el cual se le conoce como absorbanza de plasmón, el cual resulta de la interacción única de la nanoestructura con la luz. La luz incidida genera oscilaciones en la conducción de electrones de la superficie de las nanopartículas, por lo que la radiación electromagnética es absorbida, el plasmón de resonancia produce un pico cerca de la longitud de onda de los 400 nm con nanopartículas cuyo tamaño va de entre 50-70 nm, por lo que esta técnica es utilizada para predecir el tamaño de la AgNP. El resultado del plasmón de resonancia depende de características fisicoquímicas de la AgNP como: tamaño, forma, ambiente dieléctrico e interacciones electrostáticas dadas por la cercanía de las partículas (Mulfinger et al., 2007; Wei et al., 2015). Esta técnica también nos provee de información como las propiedades ópticas, tamaño, concentración, estado de aglomeración y puede predecir las formas de las NPs (Mourdikoudis et al 2018).

2. Microscopio electrónico de barrido (SEM)

Es una de las técnicas más usadas para la caracterización de nanopartículas y nanoestructuras ya que provee información importante como la morfología de la superficie (textura) y la composición química de la muestra (Sagadevan y Koteeswari, 2015), además de que determina la distribución de tamaño de las partículas y forma partir de la visualización directa de la nanopartícula (Bathia, 2016; Zhang et al., 2016; Some et al., 2018). La técnica consiste en secar la solución de AgNPs para convertirla en un polvo seco, el cual se monta en el soporte y se recubre con un metal conductor como, por ejemplo: oro. La muestra se analiza haciendo incidir un fino haz de electrones, por lo que se generan señales por la interacción de los electrones con la superficie, estas señales son los que determinan las características superficiales de las NPs. Generalmente estos resultados son comparables con los obtenidos en la técnica de dispersión de luz dinámica que nos provee los valores del diámetro hidrodinámico (Goldstein et al., 2003; Bathia, 2016).

3. Espectroscopia de dispersión de rayos X (EDSRX)

Es una técnica cuantitativa que es capaz de realizar un análisis de composición elemental, generalmente se utiliza para estimar la fórmula empírica, es decir se estudia la naturaleza o composición de las AgNPs (Zhang et al., 2016; Some et al., 2018).

4. Dispersión de luz dinámica (DLS)

Esta técnica se utiliza para determinar el tamaño de la partícula y su distribución de tamaño en suspensión o en la solución coloidal (Bathia, 2016). En un medio líquido, una partícula dispersa se adhiere una capa eléctrica dipolar a su superficie, lo que es capaz de influir en su movimiento y en su diámetro (Valerio-García, 2017). Existe una diferencia de tamaños entre el SEM y el diámetro hidrodinámico se explican porque el SEM mide el tamaño físico de la NPs metálica, mientras que el DLS mide el tamaño de la partícula aunado a las biomoléculas que están unidas a la superficie de las AgNPs (Bernardo-Mazariegos et al., 2019).

5. Potencial Z

Esta técnica nos proporciona la carga superficial y la estabilidad de las AgNPs, a partir de la evaluación de la diferencia del potencial entre la superficie de la partícula y el líquido en el cual se encuentra dispersa (Bathia, 2016). Las técnicas combinadas utilizadas son: electroforesis y velocímetro laser doppler (Valerio-García, 2017). Un valor negativo alto de Potencial Z indica la repulsión y por lo tanto la dispersión estable de las AgNPs (Some et al., 2018). Los valores de potencial Z que van de 0 a ± 5 mV indican que las NPs tienden a la floculación o coagulación, valores de ± 5 a ± 30 mV indican inestabilidad, de ± 30 a ± 40 mV presentan estabilidad moderada, ± 40 a ± 60 mV indican buena estabilidad y valores mayores a ± 60 son un indicio de que las NPs presentan excelente estabilidad (Kumar y Dixit, 2017).

6. Espectroscopia de absorción atómica (AAS)

Es un método que se utiliza para determinar la concentración de un elemento en una muestra sólida o líquida, en este caso se utiliza para determinar la cantidad de plata en el material sintetizado (Escobar Falconi, 2015). Se basa en el principio de la absorción atómica en donde los electrones externos de los átomos se llevan a un estado mayor de excitación por la absorción de una cantidad de energía de la luz a una longitud de onda específica. La cantidad de energía absorbida se relaciona con

el número de átomos y puede ser cuantificada a partir del uso de la comparación con concentraciones conocidas de un estándar (Choleva et al., 2019).

Mecanismos de acción antimicrobiana y toxicidad de las AgNPs

Se ha demostrado la eficiencia antibacteriana de las AgNPs tanto para bacterias tanto Gram + como para bacterias Gram - (Tran et al., 2013; Some et al., 2018), así también se ha demostrado que juegan un papel importante como agentes antifúngicos contra hongos patógenos para el ser humano y plantas (Zhang et al., 2016; Kim et al., 2012; Sagar y Ashok, 2012). De tal manera que las AgNPs provocan daño directo a nivel de la membrana celular debido a su interacción y penetración dentro de la célula, así como también las AgNPs liberan iones plata que generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que interactúan y dañan componentes celulares como lípidos, ADN y proteínas (Slavin et al., 2017; Some et al., 2018) (Figura 6). En la actualidad a las AgNPs biosintetizadas se les han atribuido gran potencial como agentes antibacterianos, teniendo actividad contra bacterias Gram (+) y Gram (-), además de que han sido reconocidas como no tóxicas, por lo que su uso es seguro (Some et al., 2018; Pazos-Ortiz et al., 2017; Rauwel et al., 2015). Se ha dado la explicación de que la acción contra las bacterias Gram – se debe a la presencia de una pared celular interna más delgada y en su exterior una capa de lipopolisacáridos, el hecho de que su cubierta sea más delgada la hace más susceptible al efecto de las AgNPs (Slavin et al., 2017; Pazos-Ortiz et al., 2017). Es importante resaltar que los mecanismos de acción tienen una relación directa con las características de las AgNPs como: forma, tamaño, área de la superficie, estado de aglomeración y carga superficial (Pazos-Ortiz et al., 2017).

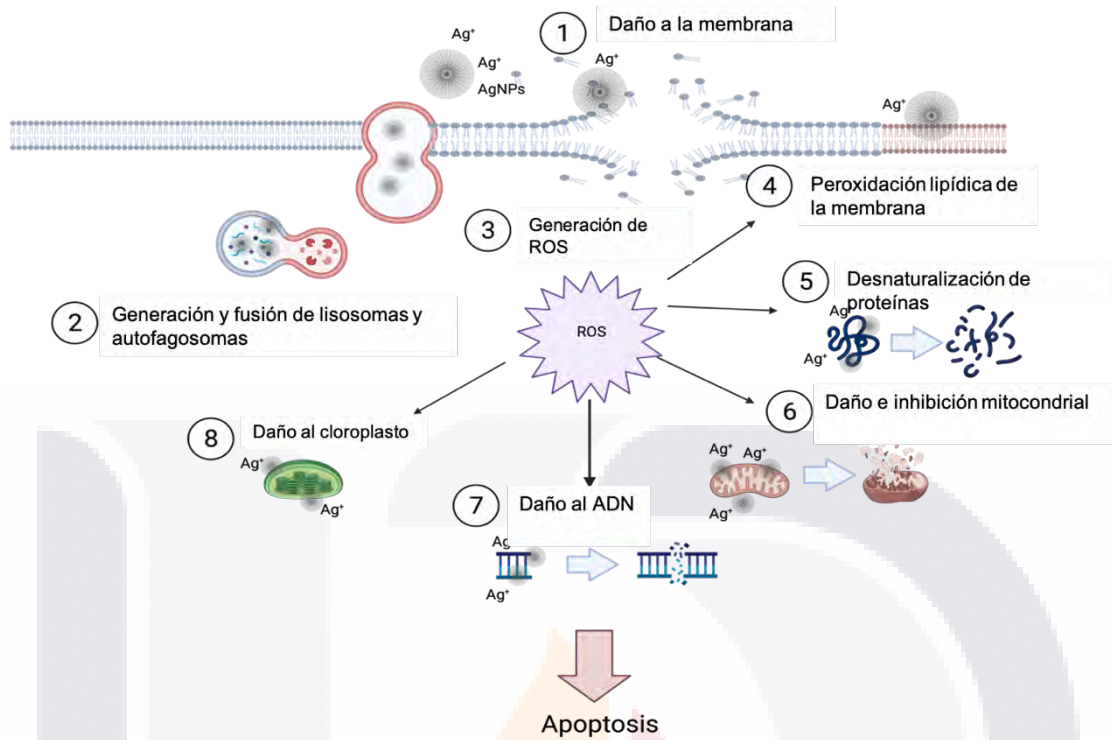


Figura 6. Mecanismos de acción de las AgNPs. Modificado de Some et al., 2018.

III. Justificación

El uso desmedido de los antibióticos en las áreas médica, agrícola y veterinaria ha ido en aumento en los últimos años creando un problema de resistencia a nivel global por lo que se ha buscado generar alternativas para buscar prolongar el tiempo de vida y la calidad de los alimentos y el cuidado de la salud humana. Una alternativa novedosa de compuestos con actividad antimicrobiana es la generación de péptidos antimicrobianos derivados de plantas, los cuales pueden producirse a partir de la tecnología del ADN recombinante y el uso de nanomateriales de plata biosintetizados. Los PAMS y las nanopartículas de plata biosintetizadas son alternativas que presentan ventajas sobre el uso de los antibióticos comerciales, tal es el caso de que sus mecanismos de acción dificultan la generación de resistencia, presentan un amplio potencial terapéutico ya que a bajas concentraciones son capaces de eliminar microorganismos patógenos, no solamente contra bacterias sino también contra hongos, virus, levaduras, protozoarios e incluso se les ha atribuido actividad anticancerígena, además de que son metodologías amigables con el medio ambiente al utilizar residuos de la industria alimentaria. Por lo que se propone identificar y sintetizar PAMs a partir de un péptido similar a Heveína identificado en *Sorghum bicolor* y nanopartículas biosintetizadas a partir de residuos del fruto de *Opuntia ficus-indica* y verificar su funcionalidad como agentes antibacterianos.

IV. Hipótesis

- ✓ Los péptidos antimicrobianos identificados en *Sorghum bicolor* y producidos en las plataformas *E. coli* tendrán efectos bactericidas.
- ✓ Las AgNPs biosintetizadas a partir de extractos de plantas tendrán efectos bactericidas.

V. Objetivo general

Producir las proteínas recombinantes de Heveína y un gen sintético antimicrobiano, además de biosintetizar nanopartículas de plata (AgNPs) a partir de *Opuntia ficus-indica* y evaluar su actividad antibacteriana.

VI. Objetivos específicos

1. Expresar y producir la proteína recombinante Heveína en *E. coli* y verificar la funcionalidad antibacteriana.

2. Expresar y producir la proteína recombinante de un gen sintético antimicrobiano en *E. coli* y verificar la funcionalidad antibacteriana.
3. Biosintetizar y caracterizar AgNPs a partir del extracto de la cáscara de tuna de *Opuntia ficus-indica*; y analizar su actividad antibacteriana.

VII. Metodología

Estrategia 1: Producción de la proteína/péptido recombinante

Se producirán dos proteínas recombinantes: 1) la primera es una proteína similar a Heveina identificada en *Sorghum bicolor*, 2) la segunda proteína se producirá a partir de la identificación *in silico* de las enzimas glioxalosas en el genoma de *Sorghum bicolor*, a partir de las secuencias identificadas se reconocerán probables péptidos antimicrobianos y se diseñará un gen sintético, ambas proteínas se producirán en *E. coli* BL21.

Identificación y análisis *in silico* de las proteínas homólogas a la Heveina y a glioxalosas en el genoma de *Sorghum bicolor*

La proteína SbHevein-like y las enzimas putativas GLYI, GLYII y GLYIII (Dj-1) fueron identificadas a partir de BLASTP en el genoma de *Sorghum bicolor* que se encuentra en Phytozome 12: The plant genomics resource (<http://phytozome.jgi.doe.gov>). SbHevein-like se identificó a partir de la secuencia reportada en *Hevea brasiliensis* (ABW34946.1), mientras que las enzimas glioxalosas a partir de las secuencias reportadas por Ghosh (2017), Mustafiz et al (2011), Ghosh e Islam (2016) y Li et al (2019). La búsqueda de dominios se realizó con la herramienta The Protein Families Database (PFAM) del servidor EBI (<http://pfam.xfam.org>) (El-Gebali et al., 2019), mientras que la búsqueda de motivos se realizó con la herramienta MEME: Motif-based sequence analysis tools (<http://meme-suite.org/index.html>) (Bailey et al., 2009) y se representó en la plataforma Web logo (<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) (Crooks et al., 2004; Schneider y Stephens, 1990). El peso molecular de las proteínas, así como su punto isoeléctrico se determinó con el programa ProtParam tool de ExPasy del Instituto Suizo de Bioinformática (<https://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger et al., 2005). El esquema de la arquitectura de los dominios se realizó con el programa IBS: Illustrator for Biological Sequences (Liu et al., 2015; Ren et al., 2009). La localización subcelular se predijo con el programa WolfPSORT (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) (Horton et al., 2007). Para la determinación del cofactor metálico de cada una de las secuencias de GLY1 y GLY2 se tomaron los

parámetros descritos por Kaur et al., (2017) y se confirmaron con el programa Swiss-Model de Biozentrum: The Center for Molecular Life Science (Waterhouse et al., 2017). Para determinar las regiones conservadas se realizó un alineamiento múltiple con el programa T-Coffee del servidor del Centro de Regulación Genómica de Barcelona (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/index.html>) (Notredame et al., 2000), los resultados se visualizaron con el subprograma EsPrip 3.0 (<http://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>) (Robert y Gouet, 2014). La identificación de los intrones y exones de los genes tipo glioxalinas se identificaron en base al genoma de *Sorghum bicolor* que se encuentra en Phytozome 12: The plant genomics resource (<http://phytozome.jgi.doe.gov>). La predicción de las estructuras tridimensionales y de la estructura terciaria de las proteínas se realizó con el software CPHmodels 3.2 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>) (Lund, 2002) y el modelado gráfico de la estructura 3D se realizó en Chimera 3D 4 (Pettersen et al., 2004).

Identificación de PAMs en las secuencias SbGLY1, SbGLY2 Y Sbdj-1 y diseño de genes sintéticos.

Las secuencias identificadas en *Sorghum bicolor* de GLY1, GLY2 Y Dj-1 se introdujeron en las plataformas AmpA: Antimicrobial Sequence Scanning System (<http://tcoffee.crg.cat/apps/ampa/do>) (Torrent et al., 2009) y en la plataforma AntiBP Server: a server for the prediction of the antibacterial peptides (<http://crdd.osdd.net/raghava/antibp/>) (Lata et al., 2007) para la identificación de los presuntos péptidos antimicrobianos (Anexo 1). Los programas anteriores arrojaron probables péptidos con actividad antimicrobiana dentro de las secuencias de algunas de las enzimas, la presencia de estos péptidos se comprobó con las plataformas: DBAASP: Database of antimicrobial activity and structure of peptides (<https://dbaasp.org/prediction>) (Pirtskhalava et al., 2016), Antimicrobial Peptide Scanner vr.2 (<https://www.dveltri.com/ascan/v2/ascan.html?u=1580492705299>) (Veltri et al., 2018), CAMPr3: Collection of Anti-microbial Peptides (camp.bicnirrh.res.in) (Waghu et al., 2015).

Para determinar el grado de actividad antimicrobiana se usó el modelo de árbol de decisión creado a partir del algoritmo j48 (Anexo 2), que se basa en las propiedades fisicoquímicos y fue descrito por Lira et al., (2013). Los parámetros fisicoquímicos de los péptidos identificados se calcularon con las plataformas The Antimicrobial Peptide Database (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) (Wang et al., 2016), ProtParam de ExpASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger et al., 2005) y MarvinSketch (ChemAxon, 2020).

La predicción de la actividad contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsella pneumonia*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, eritrocitos humanos, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Sacharomyces cerevisiae* con la plataforma DBAASP: Database of antimicrobial activity and structure of peptides (<https://dbaasp.org/prediction>) (Pirtskhalava et al.,

2016). La estructura tridimensional de los péptidos se obtuvo en la plataforma PEP-FOLD 3 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>) (Lamiable et al., 2016). Con base en la predicción de la actividad y similitud con otros péptidos se realizó el diseño de dos genes sintéticos. La verificación del marco de lectura del inserto ligado al vector se realizó con el programa SnapGene Software de GSL Biotech disponible en: www.snapgene.com. A las proteínas codificadas por los dos genes sintéticos se realizó la predicción de algunas propiedades que ayudan a verificar la funcionalidad y su facilidad de producción por la tecnología del ADN recombinante. La solubilidad de las proteínas se evaluó en las plataformas ProteinSol (<https://protein-sol.manchester.ac.uk>) (Hebditch et al., 2017). La flexibilidad se evaluó en Predyflexy (https://www.dsimb.inserm.fr/dsimb_tools/predyflexy/) (de Breven et al., 2020) y el índice terapéutico en la plataforma Therapeutic index estimation (<http://split4.pmfst.hr/split/dserv1/>) (Jurétic et al., 2009). Los valores del índice de estabilidad, valor de GRAVY, tiempo estimado de vida y el porcentaje de hidrofobicidad se obtuvo mediante la plataforma ProtParam de ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger et al., 2005).

Diseño de oligonucleótidos específicos para amplificar la parte codificante de la proteína SbHevein-like.

Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó como molde la secuencia del ARNm, disponible en NCBI (National Center for Biotechnology Information) y Phytozome con el número de acceso Sobic.005G112700. El diseño se realizó en el programa DNASTar con el subprograma Primer Select 5.0 de DNASTAR, Inc. (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA). A los oligonucleótidos se les añadió los sitios de restricción Eco RI en el forward y Hind III en el reverse para su posterior ligación en el vector de expresión pET 32 a (+). La verificación del marco de lectura del inserto ligado al vector se realizó con el programa SnapGene Software de GSL Biotech disponible en: www.snapgene.com.

Extracción de ARN de *Sorghum bicolor*

La extracción de ARN de hojas se realizó con el kit PureZol (Biorad) siguiendo los protocolos especificados por el fabricante. El ARN se cuantificó en un Nanodrop 2000 Spectrophotometer de ThermoScientific.

Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc se realizó con el kit Scientific First Strand Synthesis (Thermo scientific) siguiendo los protocolos especificados por el fabricante. El ADNc se cuantificó en un Nanodrop 2000 Spectrophotometer de ThermoScientific.

Identificación de los genes por RT-PCR en *Sorghum bicolor* (L) Moench

La amplificación se llevó a cabo mediante la técnica de RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa con transcriptasa reversa). Se utilizó el kit comercial Hot Start de Agilent.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Peltier, la cual consistió en 10 µl de Hot Start PCR Master mix 2X (2.5 mM de MgCl₂ y 250 µM de cada DNTPs), 1 µl de oligonucleótido forward y reverse (10 µM), 1 µl de ADNc templado (100 ng) y 7 µl de agua libre de nucleasas para llevar a un volumen final de 20 µl. El programa consistió en una desnaturalización previa a 94°C durante 5 min, cada uno de los 30 ciclos de la reacción de PCR consistió en: 1 min para la desnaturalización a 94 °C, 1 min para la hibridación de los oligonucleótidos con el ADN a 55 °C y 1 min para la elongación de las cadenas a 72 °C. Al concluir todos los ciclos, las muestras se sometieron a 72 °C durante 7 min. Los fragmentos amplificados se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizadas con luz Ultravioleta (UV). La purificación de los fragmentos amplificados por PCR se realizó con el kit Wizard SV Gel (Promega) siguiendo los protocolos especificados por el fabricante.

Ligación del fragmento amplificado de Sb-likeHevein en el vector pGEM®-T Easy

El fragmento amplificado Sb-likeHevein se ligó al vector de clonación pGEM®-T Easy (Promega), la reacción de ligación se realizó con la enzima T4 ADN Ligasa. El volumen final fue de 10 µl y se siguió las condiciones de reacción sugeridas por el fabricante. El tubo de reacción se incubó a 4 °C por 16-18 h.

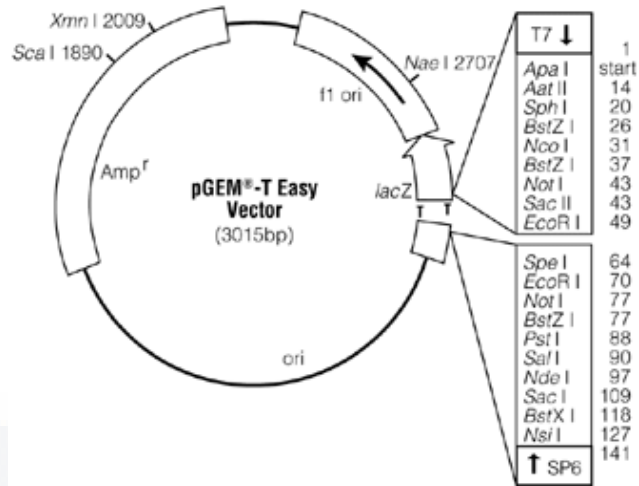


Figura 7. Mapa del pGEM®-T Easy de la compañía PROMEGA. Este vector contiene sitios promotores de la ARN polimerasa (T7), el sitio de inserción del fragmento, sitios de restricción múltiple, el gen de resistencia a ampicilina (Amp), el sitio inicial para la replicación del ADN (ori) y el gen que codifica para la β-galactosidasa (lacZ).

Transformación genética de *E. coli* DH5α con el péptido SbHevein-like

Se prepararon células competentes a partir de la bacteria *E. coli* DH5α, las cuales se cultivaron en medio LB sólido a 37 °C durante 16-20 h. Se tomó una colonia aislada y se sembró en 3 ml de LB, se incubó con agitación a 37 °C de 16-20 h. Se inoculó 1 ml de las células cultivadas un día anterior en 10 ml de LB a 37 °C por 3 h aproximadamente, el cultivo se repartió en 10 microtubos de 1.5 ml y se dejó enfriar en hielo por 10 min, se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 s, se eliminó el sobrenadante en solución con cloro y se resuspendió la pastilla muy suavemente con 1 ml de CaCl₂ (0.1 M) estéril y frío, se incubó en hielo por 10 min, se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 s. Se eliminó el sobrenadante y se secó la pastilla, después se resuspendió la pastilla muy suavemente con 30 µl de CaCl₂ (0.1 M con DMSO al 7%) y se almacenó a -70 °C. La transformación se llevó a cabo por el método de “choque térmico” (Sambrook et al., 1989). El choque térmico consistió en añadir 3 µl del plásmido a 30 µl de células competentes, en este caso sería a dos tubos: A) Ligación pGEM®-T Easy – Sb-likeHevein y B) sin plásmido, posteriormente se mezcló suavemente y se incubó en hielo durante 20 min. Después se calentó a 42°C por 90 s para rápidamente transferir a hielo e incubar durante 2 min. Se añadió 200 µl de medio LB y se incubó a 37 °C durante 45 min con agitación y se esparció en medio sólido de LB suplementado con ampicilina (50 mg/ml). Después de aproximadamente 18-24 h de incubación a 37°C, se aislaron las colonias obtenidas y se realizó su crecimiento. Cada colonia fue recuperada utilizando un palillo estéril, la cual fue inoculada en medio LB sólido con ampicilina (50 mg/ml) y posteriormente el palillo se depositó en un tubo que contenía

6 ml de medio LB líquido con la misma proporción de ampicilina, se incubó a 37 °C con agitación constante 200 rpm durante toda la noche. La ligación se comprobó mediante PCR y digestión con la enzima Eco RI.

Extracción del ADN plasmídico (Miniprep)

La purificación del ADN plasmídico se realizó a partir del método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979), con algunas modificaciones que se describen a continuación. Se tomó dos veces una alícuota de 1.5 ml de cultivo bacteriano crecido en agitación y se centrifugó a 12,000 rpm por 2 min. La pastilla obtenida se resuspendió en 100 µl de Birnboim I (Tris HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, glucosa 50 mM) y se incubó en hielo por 5 min. Posteriormente se agregó 200 µl de Birnboim II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se neutralizó con 150 µl de Birnboim III (60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de agua destilada) y se incubó en hielo durante 5 min. Se realizó una centrifugación a 12,000 rpm por 5 min. Posteriormente se realizaron dos extracciones, una con 200 µl de fenol-cloroformo 1:1 y otra con 200 µl de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1. El ADN plasmídico presente en la fase acuosa se precipitó agregando 1 volumen de isopropanol y se dejó incubando a - 20 °C durante 1 h. Se centrifugó por 5 min a 12,000 rpm. La pastilla obtenida se lavó con 200 µl de etanol al 70% y por último se resuspendió en 40 µl de agua destilada estéril.

Digestión del plásmido pGEM®-T Easy con la enzima Eco RI

La digestión del vector para la liberación del inserto se realizó con la enzima Eco RI (Promega). La mezcla de reacción contenía lo siguiente: 1 µl de restriction enzyme 10x Buffer (Buffer H), 0.1 µl de Acetylated BSA, 7 µl del plásmido, 0.5 µl de la enzima Eco RI, 1 µl de agua destilada estéril y 0.4 µl de RNasa para llevar a un volumen final de 10 µl, se incubó 1 h a 37°C. Las digestiones se corrieron en geles de agarosa al 1%, se tiñeron en bromuro de etidio y visualizadas con luz Ultravioleta (UV).

Ligación del fragmento codificante SbHevein-like al vector de expresión pET 32 a (+) y transformación genética de *E. coli* BL star

Se realizó la digestión del producto de PCR y del vector de expresión con las enzimas de restricción Eco RI y con la enzima Hind III para posteriormente realizar la ligación al vector pET 32 a (+). Para la digestión con la enzima Eco RI se realizó el mismo procedimiento que en el apartado 1.92. Posteriormente se precipitó tanto el fragmento como el vector con 15 µl de Acetato de amonio 7.5 M

y 40 µl de isopropanol, se dejó incubando 15 min a -20°C para posteriormente centrifugarlo a 12,000 rpm por 15 min y resuspenderlos en 7 µl de agua destilada estéril. A los 7 µl tanto del vector como del plásmido se les añadió 1 µl de Restriction enzyme 10x buffer (Buffer E), 0.1 µl de Acetylated BSA, 0.5 µl de la enzima Hind III, 1 µl de agua destilada estéril y 0.4 µl de RNAsa para llevarlo a un volumen final de 10 µl. La digestión se incubó a 37°C por 1 h. La ligación del fragmento al vector de expresión se realizó a partir de la siguiente reacción: 1 µl de ligasa T4, 5 µl de Buffer 2x, 1 µl de inserto previamente digerido, 3 µl del vector previamente digerido para llevarlo a un volumen final de 10 µl. La ligación se dejó toda la noche a 4 °C y se comprobó por PCR con los oligonucleótidos pET 32-F: CGATGCGTCCGGCGTAGAG y pET 32-R: GCTTCCTTTCGGGCTTTGTTAG (Quezada-Rivera, 2018). La transformación de *E. coli* BL star se llevó a cabo por el método de “choque térmico” (Sambrook et al., 1989). Los plásmidos con el inserto fueron enviados a secuenciar al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) donde fueron secuenciados de manera bidireccional.

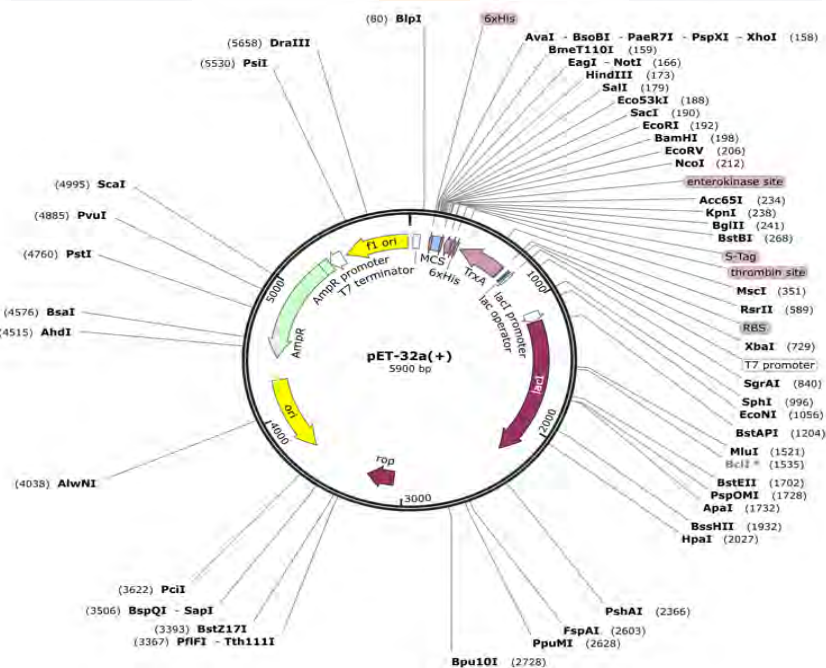


Figura 8. Mapa del vector pET 32 a (+) de la compañía Novagen. Este vector contiene sitios promotores de la ARN polimerasa (T7), el sitio de inserción del fragmento, sitios de restricción múltiple, el gen de resistencia a ampicilina (Amp), el sitio inicial para la replicación del ADN (ori) y el gen que codifica para la β-galactosidasa (lacZ), una cola de histidinas y sitios de corte para la enzima enteroquinasa.

Expresión del péptido recombinante

Se tomó una clona positiva de *E. coli* BL21 star con el vector pET 32 a (+) con el gen de interés y sin el gen de interés, y se inoculó 100 µl del pre-cultivo en 10 ml de medio LB y se incubó a 37°C durante toda la noche en agitación constante hasta llegar a una $DO_{600}=0.5$. Posteriormente se añadió 10 µl de IPTG y se incubó a 37°C en agitación. Se tomaron alícuotas de 1 ml a 1 h, 2 h y 4 h. Cada alícuota se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se analizó la pastilla. Se corrió un gel de poliacrilamida al 30% en donde cada una de las muestras se prepararon con 50 µl de agua destilada estéril y 50 µl 2x SDS-PAGE, se mezclaron y se calentaron a 90°C por 3 min, se centrifugaron, se recuperó sobrenadante de cada una de ellas para cargar 10 µl en el gel de poliacrilamida. Los geles se tiñeron en una solución de tinción (Azul de Coomassie R-250) por 2 h y se dejó destiñendo en la solución destiñidora por 2 días.

Extracción y cuantificación de proteínas recombinantes totales solubles (PTS)

Cultivos líquidos de las cepas transgénicas de *E. coli* fueron lisadas por sonicación. La biomasa se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min en una centrifuga Sorvall ST16 Centrifuge de Thermo scientific para concentrarla y después ser resuspendida en Buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM NaCl, 5 mM DTT y 0.1% de Tween 20), se incubó la suspensión celular en hielo por 10 min. Posteriormente se realizó la lisis por sonicación a 40% amplitud durante 10 ciclos con pulsos de 10 s de lisis y 10s de descanso, siempre evitando la formación de espuma. El lisado se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min para recuperar la fracción soluble y cuantificar las PTS por el ensayo de Bradford y evaluarse su calidad en SDS-PAGE al 15%.

Actividad antibacteriana de los PAMs recombinantes

Se evaluó la actividad antibacteriana de los péptidos sintéticos recombinantes por la técnica de difusión en disco. La actividad antibacteriana fue evaluada en las cepas *E. coli* (DH5α), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) y *S. aureus* (ATCC 29213). De cultivos axénicos de cada cepa se tomó una colonia, se inoculó en 5 mL de medio LB líquido y se incubó a 37 °C, a 160 rpm de agitación, por 16 h. La densidad óptica de las bacterias se ajustó a 0.5 de la escala de Mc Farland, con una concentración de 1.2×10^8 a una longitud de onda de 600 nm. Posteriormente placas de cultivo con medio LB fueron inoculadas con la bacteria ajustada al estándar mediante un isotopo estéril. Se colocaron confetis

estériles en el medio de cultivo con la concentración de proteína recombinante a probar: 0, 50 y 100 µg y como control positivo se utilizó ampicilina a una concentración de 0.5 mg/L. Las placas se incubaron a 37°C por 16 horas, la actividad antibacteriana se verificó mediante la aparición de un halo de inhibición (Rojas et al., 2005; Quezada-Rivera, 2018). Los ensayos se realizaron por triplicado.

Estrategia 2: Síntesis verde, caracterización y análisis microbiológico de *OfAgNPs*

Preparación del extracto de tuna.

Las cáscaras de tuna se lavaron con agua destilada estéril, se pesaron 50 gr y se molieron con nitrógeno líquido y se mezclaron con 250 ml de agua destilada estéril. El extracto fue calentado a 80 °C en baño María por 30 min y se filtró con papel Whatman 1.

Biosíntesis de *OfAgNPs*.

En un matraz de 250 ml, se mezcló 10 ml del extracto filtrado con 90 ml de una solución de AgNO₃ 2 mM (relación 9:1), protegidos de la luz con papel aluminio y en agitación constante a 90 rpm a temperatura ambiente. La síntesis de nanopartículas se verificó mediante el análisis de cambio coloración de amarillo a rojizo marrón. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min y se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó tres veces con agua destilada estéril y una con alcohol al 96%. Las AgNPs se secaron a 37 °C por 24 h y después se pulverizaron y sonicaron por 20 min para su dispersión. Al material sintetizado se les denominó *OfAgNPs*.

Caracterización de las *OfAgNPs*.

Obtención del plasmón de resonancia.

Los coloides obtenidos se caracterizaron mediante espectrofotometría UV-Visible en un espectrofotómetro Génesis 10s UV-Vis de Thermo scientific, se realizó un barrido en un rango de longitud de onda de 300-800 nm.

Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Las muestras secas se pusieron en el disco de grafito adherible de 1 cm x 1 cm, y fueron recubiertas con el bañador de oro (Dentom Vacuum). Se introdujo un flujo de corriente a un tiempo estimado de 80-150 s. La muestra se introdujo en la cámara del microscopio electrónico de barrido y se midió el

diámetro de las *OfAgNPs* a partir de las micrografías con el programa Image J2 (Rueden et al., 2017). Se midieron 300 NPs para obtener el histograma de distribución de tamaño y se determinó el coeficiente de variación a partir de la siguiente fórmula: Desviación estándar/Media*100.

Espectroscopia de energía Dispersiva de rayos X (EDS Rx).

La muestra sólida de *OfAgNPs* se montó en la cámara de vacío del microscopio electrónico de barrido. La muestra se observó a 12 mm de distancia entre el lente y el plano focal, a un voltaje de aceleración de 20 kV, spotsize de 42 en el monitor del SEM. En el monitor del analizador de espectrofotómetro de energía dispersiva de Rx (EDS Rx) se seleccionó la imagen que aparece en la pantalla para análisis cuantitativo y cualitativo. Se analizaron 4 sitios de interés en un área circular de 144 mm². Cada uno de los cuatro sitios se analizó a 4000x aumentos, a 200 segundos para obtener la composición de elementos.

Espectroscopia de absorción atómica.

Se pesó 79.5 mg de polvo que contenían las *OfAgNPs* y se realizó una digestión ácida con 10 ml de HNO₃ 1:1, se calentó a ebullición, posteriormente se filtró en papel Whatman 1, y se aforó a un volumen de 25 ml con H₂O destilada. Las muestras se analizaron en un equipo Perkin Elmer 3110 y se realizó una curva de calibración con 1, 2.5 y 5 ppm a partir del estándar de plata. Se utilizó una lámpara de cátodo hueco de absorción atómica para plata a una longitud de onda de 328.1 nm.

Diámetro hidrodinámico y Potencial Z.

El diámetro hidrodinámico en agua desionizada se determinó a partir de la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) en un equipo Zetasizer ZS90 (Malvern). A partir de un ajuste por cumulantes hasta orden dos de la función de correlación de la intensidad dispersada a 90°, como se describe en la literatura (Berne y Pecore, 2000). El potencial Z se obtuvo a partir de movilidad electroforética utilizando el modelo Smoluchowski (Delgado et al., 2005) disponible en el software del equipo. Los análisis se realizaron con una solución de *OfAgNPs* en agua ultra pura (Milli-Q) a una concentración de 100 mgL⁻¹. Las medidas se tomaron por triplicado a los tiempos 0, 72, 96 y 120 h.

Se analizaron suspensiones de 100 mg L⁻¹ de *OfAgNPs* en agua desionizada, buffer de fosfatos (PO₄⁻) y medio ISO, a una temperatura de 25 °C en un ángulo de 90 ° en celdillas desechables y se determinó los valores de potencial Z y radio hidrodinámico a partir de las técnicas de dispersión de luz dinámica

(DLS) y dispersión de luz electroforética (ELS) con el equipo Litesizer Series de la compañía Anton Paar. La velocidad de la partícula fue calculada por el equipo de acuerdo con la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = K_B T / 6\pi\eta R_H$$

Donde:

D= Coeficiente de difusión traslacional o velocidad de las partículas (m^2s^{-1})

K_B = Constante de Boltzmann (m^3kgKs^{-2})

T= Temperatura ($^{\circ}K$)

η = Viscosidad (Pa s)

R_H = Radio hidrodinámico (m)

La ELS se calculó en base a la siguiente ecuación:

$$\mu_e = V/E$$

Donde:

μ_e = Movilidad electroforética

V = Velocidad

E= campo eléctrico

Análisis de actividad antibacteriana de las *OfAgNPs* en muestras de agua residual tratada.

Exposición de muestras de agua residual tratada con *OfAgNPs*.

Para la recolección de las muestras se tomaron 50 ml de agua residuales tratadas en recipientes estériles. Las muestras se tomaron antes y después de la cloración (Figura 9), a cada una de las muestras se le añadió 200 μ l de tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$) al 10%.

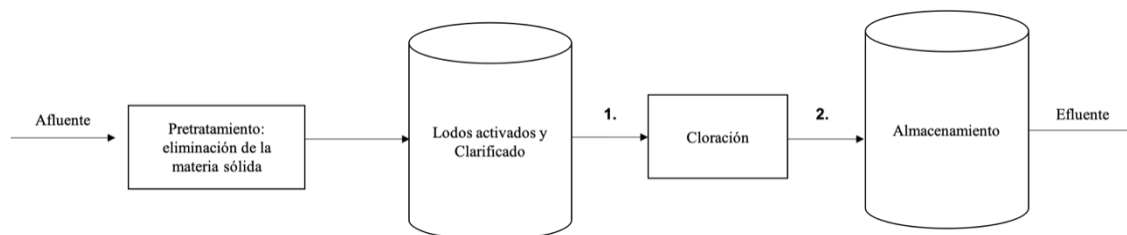


Figura 9. Esquema de la planta tratadora de agua de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), 1. Toma de muestras de agua residual tratada antes de la cloración, 2. Toma de muestras de agua residual tratada después de la cloración.

Se preparó una solución stock de 5 mg/ml de OfAgNPs en buffer de fosfatos pH de 7. Para determinar el tiempo mínimo de inhibición, se expusieron alícuotas de 1 ml de aguas residuales tratadas antes y después de la cloración a la concentración de 0.5 mg/ml de AgNPs en los tiempos 0.5, 1, 2, 4 y 6 h, a cada uno de los tiempos se plaqueó a partir de la técnica de extensión en placa en medio Lb, se verificó la presencia de colonias y a partir de estos resultados se determinó que el tiempo mínimo de inhibición fue de 0.5 h.

Se prepararon suspensiones de AgNPs a las concentraciones de 0.5 y 1.0 mg/ml en un volumen de 20 ml con muestras de agua de la planta de tratamiento. El tiempo de exposición fue de 0.5 h en agitación constante a 90 rpm para posteriormente realizar el análisis microbiológico. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: sin tratamiento (control), cloración, 0.5 mg/ml de OfAgNPs, 1.0 mg/ml de OfAgNPs, cloración con 0.5 mg/ml de OfAgNPs y cloración con 1.0 mg/ml de OfAgNPs.

Análisis microbiológico de aguas residuales tratadas.

Determinación de coliformes totales y fecales.

Se realizaron diluciones seriadas del agua residual tratada de los seis tratamientos a 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} . La determinación de microorganismos coliformes totales y fecales se realizó por el método del Número más Probable (NMP) que se divide en dos fases: la presuntiva y la confirmativa. En la fase presuntiva se inoculó 1 ml de cada una de las diluciones de la muestra de agua en el medio líquido caldo rojo fenol con lactosa y se incubó a 37 °C en un periodo de 24-48 h, se consideraron positivos aquellos tubos que presentaron crecimiento bacteriano, un cambio de coloración del medio de rojo a amarillo y la presencia de gas. Para la fase confirmativa de coliformes totales se realizó la inoculación con dos asadas a partir de los tubos positivos de la fase presuntiva en el medio líquido caldo bilis verde brillante (BRILA) con una incubación a 37 °C en un periodo de 24-48 h, considerándose positivo la presencia de crecimiento bacteriano y de gas. Para la fase confirmativa de coliformes fecales se inoculó dos asadas a partir de los tubos positivos de la fase confirmativa en el medio líquido

caldo *Escheritia coli* (EC) a una temperatura de 44.5 °C por un periodo de 24-48 h, considerándose positivos aquellos tubos que presentaban crecimiento bacteriano y gas. Los cultivos en caldo BRILA que mostraron evidente crecimiento bacteriano, se sembraron en el medio sólido selectivo diferencial de eosina azul de metileno (EMB) de las cuales se seleccionaron colonias típicas para luego realizar las pruebas bioquímicas para su identificación (IMViC: Indol, Movilidad, Voges Proskauer, Citrato de Simmons). Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Los coliformes totales y fecales se reportan como el número más probable por cada 100 ml de muestra (NMP/100 ml).

Determinación de mesofilicos aerobios.

El conteo de los organismos mesofilicos aerobios se realizó por la técnica de vertido en placa en el medio agar para métodos estándar, la técnica consiste en añadir 1 ml de cada una de las diluciones de cada uno de los tratamientos en 20 ml de medio agar para métodos estándar fundido, mezclar y dejar a que se solidifique, para posteriormente dejarse a una incubación a 37 °C en un periodo de 24-48 h y realizar el conteo de las colonias que crecieron en cada una de las diluciones. A partir del conteo se calculó la inhibición log ($\log_{10}N_0/N$) para cada tratamiento donde N_0 es el conteo inicial, y N es el conteo después del tratamiento (Garcidueñas-Piña et al., 2016). Los resultados se analizaron mediante ANOVA de un factor seguido de una prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$). Los gráficos se realizaron en el programa GraphPad Prism 6.0 (Graphpad), considerando el promedio de las repeticiones \pm una desviación estándar.

Bioensayo de toxicidad aguda para embriones de pez cebra (*Danio rerio*)

Se obtuvieron huevos fecundados de *D. rerio* de acuerdo con el protocolo “Fish Embryo Toxicity” (FET) propuesto por la OCDE (OCDE, 2013). Se colocaron machos y hembras (3:1) de *D. rerio* sexualmente maduros, en tanques a 25 °C y fotoperiodo (16 h luz) a las 24 h. Los huevos se recolectaron por pipeteo y se lavaron con medio ISO (2.94 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.23 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.6475 g de NaHCO_3 y 0.0575 g KCl para 10 L), se seleccionaron los huevos fecundados y viables con apoyo de un estereoscopio Olympus Sz61. Se realizaron bioensayos de toxicidad aguda siguiendo el protocolo 236 (FET) (OECD, 2013): se colocaron huevos fecundados en medio ISO suplementado con *OfAgNPs* a concentraciones de 0, 0.075, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2 mg L^{-1} , y utilizando como control 0.874 mg L^{-1} de extracto acuoso de cáscara de tuna. Se realizaron observaciones a las 24, 48, 72 y 96 h posfecundación (hpf) para observar la eclosión de los embriones, determinar letalidad y efectos subletales. Para la letalidad se observó coagulación sin desprendimiento de la cola, sin formación de somites y sin latido cardíaco; y los efectos subletales analizados fueron la presencia de edemas

pericárdicos y malformaciones de embriones y larvas. Las observaciones se documentaron con fotografías, y se valoró cualitativamente como presencia o ausencia, y cuantitativamente como números de embriones y larvas afectados. Se calculó la concentración letal media (CL₅₀) siguiendo el modelo log-logistic usando la paquetería *drc* con el software R Studio (v.3.5.1), con los correspondientes intervalos de confianza del 95 %.

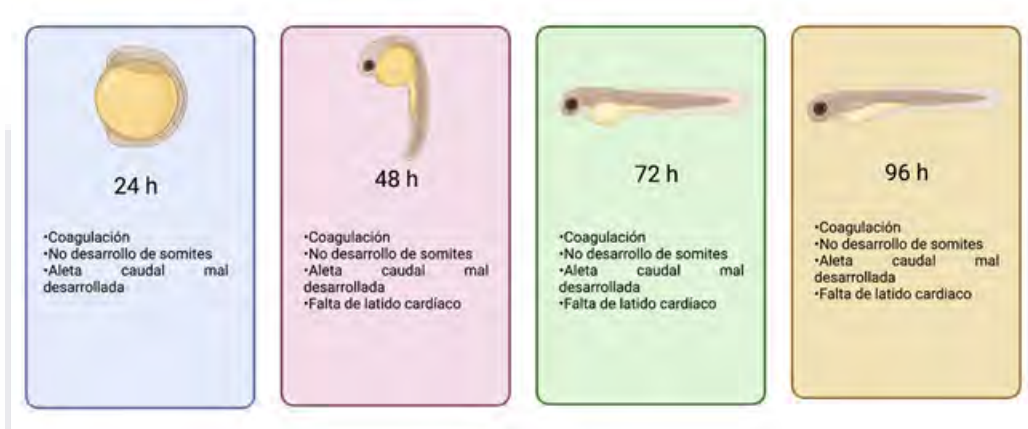


Figura 10. Efectos teratogénicos en *Danio rerio* analizados durante la prueba FET (OECD, 2013).

Evaluación de los efectos de *OfAgNPs* en *Arabidopsis thaliana*

Se utilizaron semillas de *A. thaliana* ecotipo Columbia Col-0, las cuales se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % y Tween 20 al 0.15 % por 8 min. Las semillas se sembraron en medio MS sólido suplementado con *OfAgNPs* a concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 0 mg L⁻¹. Se incubaron a 25 °C en la oscuridad durante 2 días, y 17 días en fotoperiodos (16 h luz). Se analizaron 30 semillas por tratamiento. Se analizó el contenido de clorofila y carotenoides de las plántulas, y la elongación de las raíces con el programa Image J2 (Rueden et al., 2017).

Evaluación del contenido de pigmentos fotosintéticos

Plántulas expuestas a diferentes concentraciones con *OfAgNPs* (0, 6.26, 12.5, 25, 50 y 100 ppm) durante 19 días, se pesaron, pulverizaron y se colocaron en metanol al 90 % en un tubo eppendorf (10 mg tejido vegetal triturado: 5 ml de metanol) Del extracto metanoico se colocaron 200 µL en un tubo de vidrio, se agregaron 5 mL de metanol al 90 % y se dejó 5 min en ebullición; posteriormente, se incubó a 4 °C en la oscuridad durante toda la noche. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 665, 649y 470 nm (A₆₆₅, A₆₄₉, A₄₇₀) de longitud de onda, con el espectrofotómetro Termo Scientific

Genesys 10 s UV-visible. El procedimiento se realizó por triplicado. El contenido de los pigmentos se calculó en g g^{-1} de peso fresco de las plántulas, con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila } a \text{ (Cl}_a\text{)} = (12.19 A_{665} - 3.45 A_{649}) / 1000 P$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (Cl}_b\text{)} = (21.99 A_{649} - 5.32 A_{665}) / 1000 P$$

$$\text{Carotenoides} = (1000 A_{470} - 2.86 \text{Cl}_a - 129.2 \text{Cl}_b / 221) / 1000 P$$

Donde:

A = absorbancia

P = peso de la muestra (g)

Evaluación de la actividad antibacteriana en cepas ATCC

La actividad antibacteriana de las *OfAgNPs* se evaluó en *E. coli* (DH5 α), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) y *S. aureus* (ATCC 29213). De cultivos axénicos de cada cepa se tomó una colonia, se inoculó en 5 mL de medio LB líquido y se incubó a 37 °C, a 160 rpm de agitación, por 16 h. De este cultivo se tomó una muestra de 1 mL, se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla bacteriana se resuspendió en buffer de PO_4^{4-} (0.05 M pH 7) estéril, para tener un título de 10^6 y 10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL^{-1}). A muestras de 1 mL de estas suspensiones bacterianas se adicionaron *OfAgNPs* para tener concentraciones de 1, 0.5 y 0.25 mg L^{-1} , a partir de una suspensión de 1g L^{-1} . Se utilizó como control negativo una suspensión bacteriana sin *OfAgNPs*. Se tomaron alícuotas de 0.01 mL después de diferentes tiempos de exposición, al tiempo cero y después de 5, 10, 15, 30, 45 y 60 min, se inocularon en medio LB sólido, y se incubaron a 37 °C durante 18 h. Se contaron las colonias desarrolladas y se calculó el número de UFC mL^{-1} . Los experimentos se realizaron por triplicado. La inactivación logarítmica se calculó (según Garcidueñas-Piña et al., 2016; Quezada-Rivera et al., 2018) como:

$$\log_{10} (N/N_0)$$

Donde N_0 representa las UFC mL^{-1} iniciales y N las UFC mL^{-1} después del tratamiento.

Evaluación de la actividad antifúngica

La actividad antifúngica de las *OfAgNPs* se evaluó en: *Aspergillus* sp., *Collecotrichum* sp. y *Cladosporium* sp. Se recuperaron esporas maduras de cada uno de los hongos para realizar el conteo de esporas en la Cámara de Neubauer en base a la siguiente formula:

$$\text{Número de esporas/ml} = \frac{(\text{Número de células x dilución})(1 \times 10^4)}{\text{No. áreas mm}^2 \text{ contadas}}$$

Se expusieron 2.4×10^4 esporas/a las concentraciones de 1, 0.5 y 0.25 mg L⁻¹, a partir de una suspensión de 1g L⁻¹ durante 24 h. Se utilizó como control negativo una suspensión de esporas sin *OfAgNPs*. Posteriormente una alícuota de 10 µL se inoculó en medio PDA sólido y se incubó a 25 °C durante 4 días. Se realizaron tres réplicas. Los diámetros del crecimiento de los hongos fueron medidos y se calculó el porcentaje de inhibición radial (% IR), que considera el diámetro del hongo sin *OfAgNPs* (D) y el diámetro del hongo expuesto a las *OfAgNPs* (d), en la siguiente formula (según Garcidueñas-Piña et al., 2016).

$$\% IR = (D-d) 100/D$$

Análisis estadístico

Los resultados son expresados como la media ± una desviación estándar. La diferencia entre los tratamientos se determinó usando ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey con el programa PRISMA (versión 5.01; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Valores $\alpha < 0.05$ se consideraron significativos.

VIII. Resultados y Discusión

Estrategia 1: Producción de la proteína/péptido recombinante

Generación de una construcción del PAM SbHevein-like

El péptido SbHevein-like presentó el mismo dominio Barwin que el péptido Heveina identificado en *Hevea brasiliensis* (Figura 11). El dominio tipo Barwin se encuentran en proteínas tipo Barwin, en los genes inducidos por heridas tipo win 1 y win 2 de la papa, en la Heveina del árbol de látex y en la proteína 4 relacionada a procesos de patogénesis en el tabaco (Caruso, 1996), además que este dominio presenta características estructurales como que predomina una lamina β antiparalela de cuatro hebras bien definida, presenta dos laminas β paralelas empaquetadas en forma antiparalela entre sí y cuatro α hélices cortas (Ludvigsen y Poulsen, 1992). Van Damme et al (1999) aislaron la proteína SN-HLLPf del fruto de *Sambucus nigra* la cual es una proteína quimérica que conserva el dominio Barwin y un sitio de unión a la quitina por lo que los autores afirman su capacidad antifúngica. Las estructuras tridimensionales y el alineamiento múltiple entre las secuencias para comprobar su similitud se muestran en las Figuras 12 y 13.



Figura 11. Esquema representativo de SbHevein-like El esquema se realizó en el programa IBS, 2015.

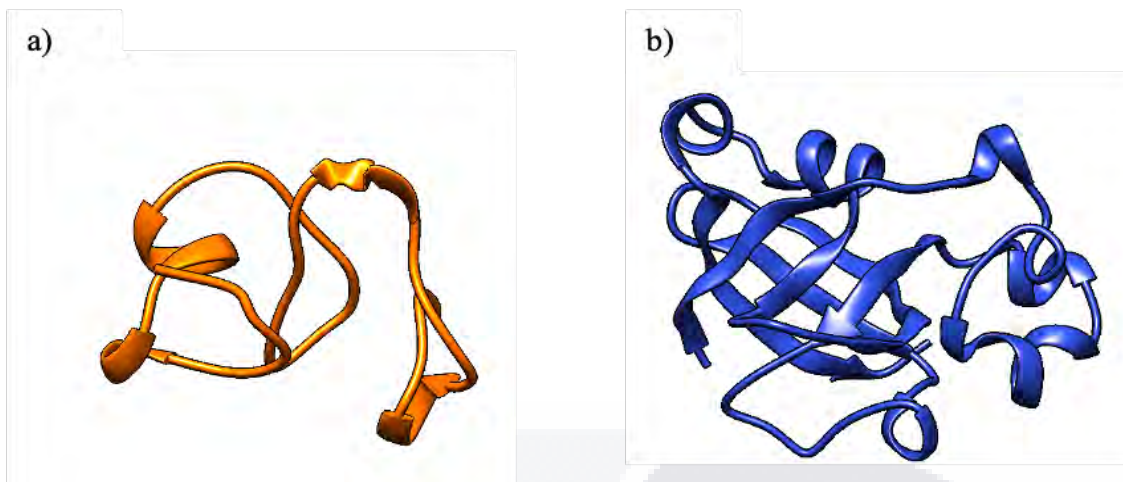


Figura 12. Estructura tridimensional de las proteínas Heveina a) Heveina de *Hevea brasiliensis*, b)SbHevein-like

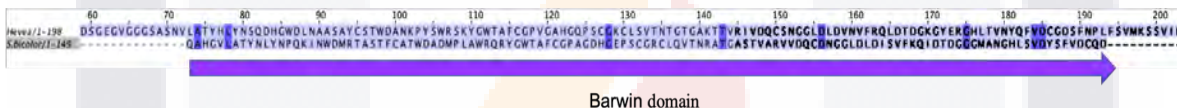


Figura 13. Alineamiento múltiple entre la secuencia Heveina de *Hevea brasiliensis* y SbHevein-like. El alineamiento se realizó en el programa T-coffee (expresso) y se visualizó en el programa Javaview.

Los péptidos similares a Heveina se caracterizan por su alta similitud entre ellas, además de tener la habilidad de unión a sacáridos, lo que sugiere que la función de este dominio está relacionada con los mecanismos de defensa de las plantas principalmente contra los hongos por su facilidad de unión a la quitina (Svensson et al., 1992; Ludvigsen et al., 1992). A partir de la secuencia de SbHevein-like identificada, se diseñaron oligonucleótidos que amplificaron un fragmento de 450 pb. En la Figura 14, se observa la electroforesis del fragmento amplificado de SbHevein-like en donde se probaron las temperaturas de alineamiento de 53°, 55° y 57°; a pesar de que amplificó en las tres temperaturas se decidió trabajar con una temperatura de alineamiento de 55 °C ya que la banda nos indica mayor eficiencia de la amplificación.

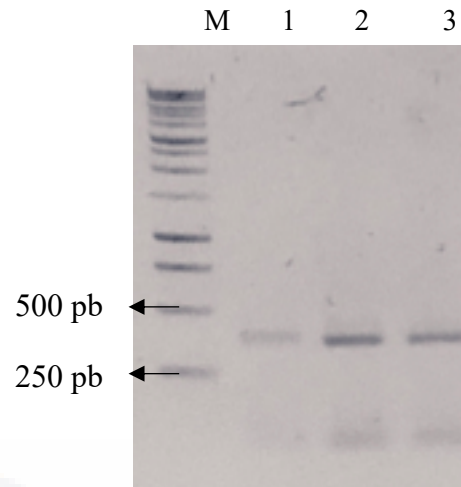


Figura 14. Amplificación por RT-PCR del fragmento codificante de SbHevein-like. M. Marcador de peso molecular 1 kb. 1) Amplificación a 53°C. 2) Amplificación a 55°C. 3) Amplificación a 57°C.

El fragmento amplificado se ligó en el vector de clonación pGEM®-T Easy con la finalidad de mantener múltiples copias del fragmento, la inserción del fragmento se comprobó por digestión y por PCR. En la Figura 15a, se observa la electroforesis de la digestión y la PCR para comprobar la inserción del fragmento; en el carril 1, se muestra la digestión del vector con la enzima Eco RI y se libera un fragmento de aproximadamente 450 pb que coincide con el tamaño del fragmento amplificado, mientras que por PCR se amplificó un fragmento del tamaño del inserto (Figura 15b).

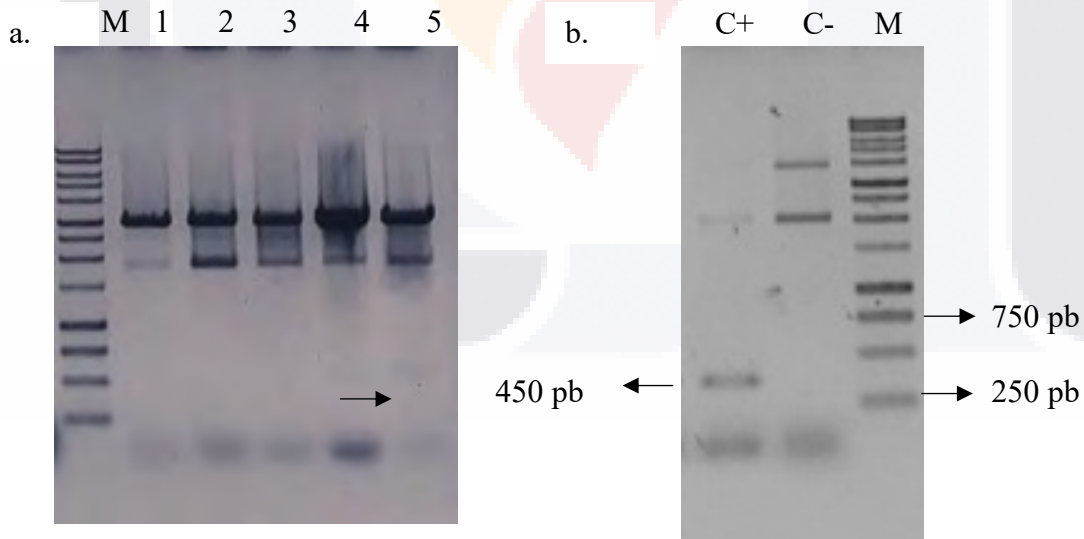


Figura 15. Comprobación de la ligación del inserto SbHevein-like en el vector pGEM®-T Easy. A. Digestión del vector con la enzima Eco RI; M: marcador de peso molecular 1 Kb, 1-4 vector sin la liberación del inserto, 5 liberación de un inserto de 450 pb. B. PCR para comprobar la ligación del

inserto; M: marcador de peso molecular 1 Kb, C+: vector con el inserto ligado, C- control negativo: vector sin la ligación del inserto.

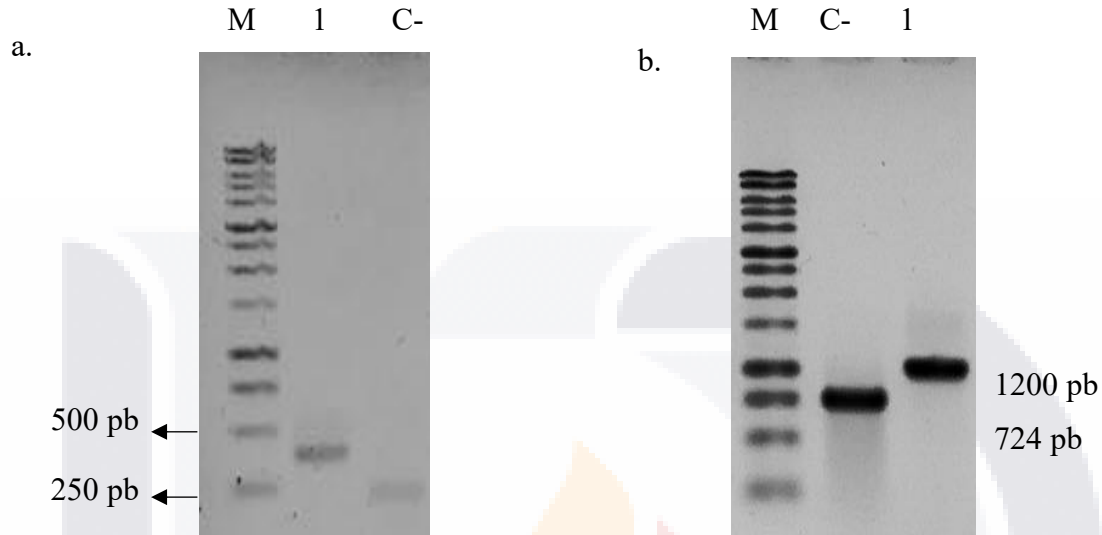


Figura 16. Comprobación de la del inserto SbHevein-like en el vector pET 32 a (+). a. PCR para comprobar la ligación del inserto al vector de expresión; M: marcador de peso molecular 1 kb, 1: amplificación del fragmento SbHevein-like en el vector de expresión, C-: control negativo (vector sin el inserto), b. PCR del SMC M: marcador de peso molecular 1 kb, C-: vector sin el inserto, 1: vector con el inserto.

Posterior a la ligación en el vector de clonación se procedió a ligar el fragmento en el vector de expresión de *E. coli*: pET32 a (+), usando las enzimas de restricción Eco RI y Hind III presentes en los oligonucleótidos previamente diseñados. Esto permite asegurar que la inserción del fragmento quede en el sentido adecuado para la producción del péptido recombinante. La comprobación de la ligación del inserto al vector de clonación se comprobó mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos con los que se amplificó el fragmento (Figura 16a) y se realizó una PCR para amplificar el sitio múltiple de clonación del vector, en donde si el vector no contiene el inserto se obtendrá un fragmento de 724 pb, y si hay inserto el tamaño será de 1200 pb (Figura 16b). El vector con el inserto se mandó secuenciar para comprobar la identidad del fragmento y su marco de lectura abierta.

Inducción del péptido recombinante

Se realizó la inducción para la producción del péptido recombinante SbHevein-like, donde se utilizó una concentración de IPTG a 0.1 M a los tiempos de 1 h, 2 h y 4 h. Los tiempos de inducción y la concentración de IPTG se eligieron con base a lo reportado por Quezada-Rivera, 2018. La inducción se realizó tanto para la bacteria con la construcción del vector más inserto, y bacteria solo con el vector. Existió una mayor inducción a las 4 h, únicamente en aquellas bacterias que contenían el vector con el inserto. El peso molecular del péptido recombinante es de aproximadamente 16.14 kDa lo que coincide con el tamaño de la proteína inducida por el IPTG (Figura 17).

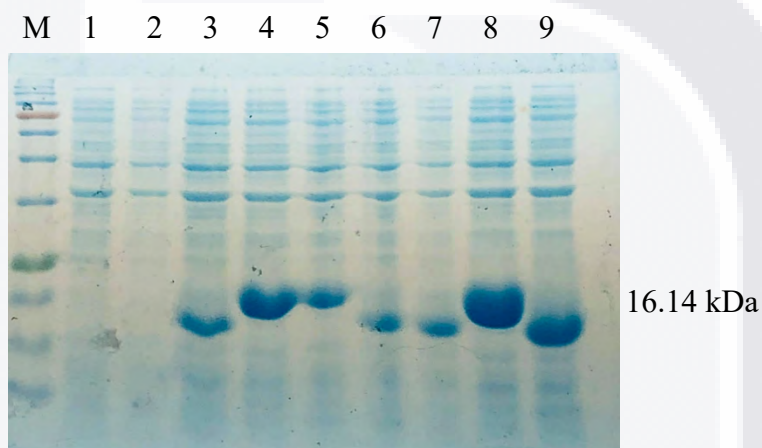


Figura 17. Expresión de la proteína SbHevein-like contenida en proteínas totales de *E. coli* BL star. Gel de poliacrilamida al 30%. 1) pET 32 sin IPTG/1 h, 2) pET 32 con IPTG/1 h, 3. Construcción pET 32/Sb-likeHevein sin IPTG/1 h, 4. Construcción pET 32/Sb-likeHevein con IPTG/1 h, 5. Construcción pET 32 sin IPTG/2 h, 6. Construcción pET 32 con IPTG/2 h, 7. Construcción pET 32/Sb-likeHevein sin IPTG/2 h, 8. Construcción pET 32/Sb-likeHevein con IPTG/2 h. 9. Construcción pET 32 sin IPTG/4 h, 10. Construcción pET 32 con IPTG/4 h, 11. Construcción pET 32/Sb-likeHevein sin IPTG/4 h, 4. Construcción pET 32/Sb-likeHevein con IPTG/4 h.

Se realizó la extracción de proteínas totales solubles (PTS) y se cuantificaron obteniendo una concentración de 14.86 µg/ml como máxima concentración. Las pruebas de inhibición fueron con *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aureginosa*. Las concentraciones de las proteínas totales solubles fueron de 14.86 y de 7.43 µg/ml, en todas las muestras analizadas no se observó inhibición del crecimiento bacteriano, mientras que en los controles positivos de ampicilina (100 mg/mL) si hubo inhibición demostrando la susceptibilidad de las cepas (Figura 18). Esto puede ser por la

concentración baja de PTS o que sea necesario digerir el péptido para que tenga actividad antibacteriana. Se han identificado proteínas similares como Hevein-like protein de *Wasaba japónica* que presentó actividad contra diferentes cepas de hongos a concentraciones menores (8.5-22 $\mu\text{g/ml}$) y bacterias como *E. coli* y *A. tumefaciens* a concentraciones mayores (12.5-27.5 $\mu\text{g/ml}$) (Kiba et al., 2003). Es necesario probar concentraciones más altas para poder concluir si el péptido tiene o no actividad antibacteriana e incluso descartar que es necesario purificar o diferir la proteína recombinante para que obtenga su actividad antibacteriana.

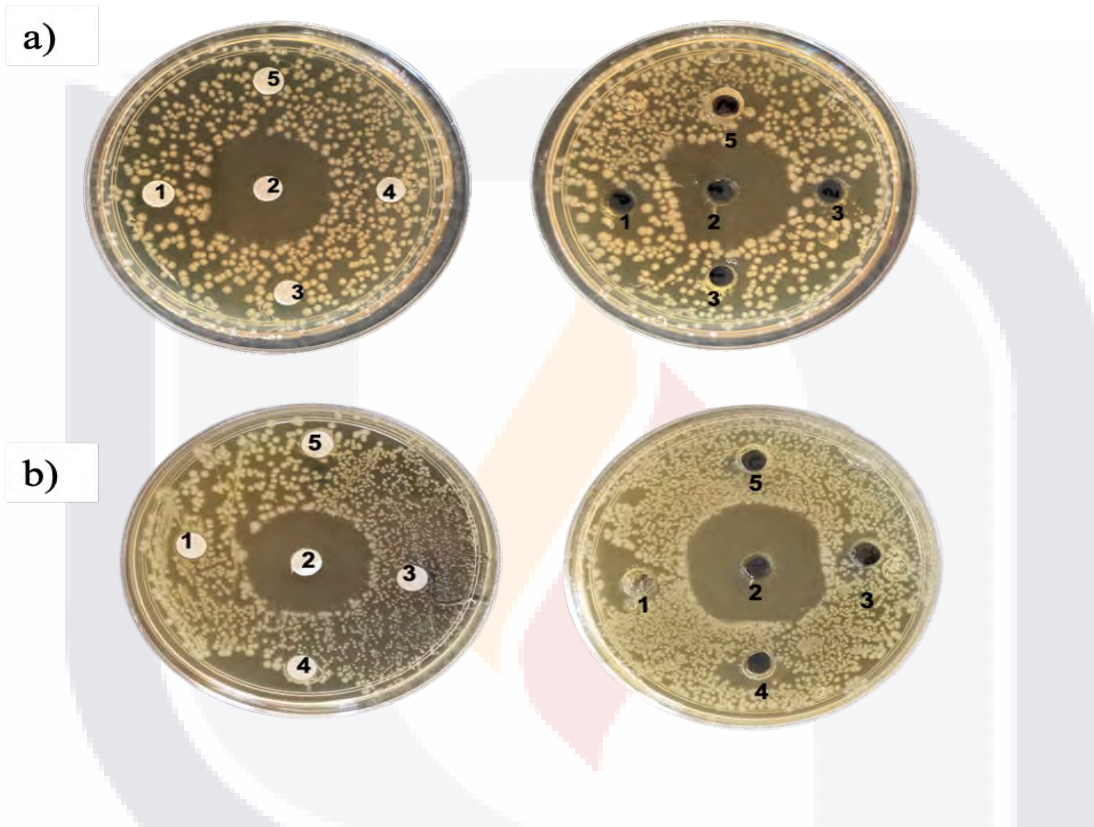


Figura 18. Ensayos de inhibición a diferentes concentraciones con el péptido SbHevein-like de a) *P. aureginosa* y b) *Staphylococcus aureus* con PTS 1) Inducida PTS 14.86 $\mu\text{g/ml}$, 2) 0.5 mgL^{-1} ampicilina, 3) Inducida PTS 7.43 $\mu\text{g/ml}$, 4) No inducida PTS 4 h, 5. Buffer de extracción de PTS.

Identificación de proteínas glioxalosas en *Sorghum bicolor*

A partir de las secuencias de glioxalosas previamente identificadas en el genoma de *Sorghum bicolor*, se realizó la búsqueda de péptidos con presunta actividad antimicrobiana haciendo uso de la plataforma Antimicrobial Sequence Scanning System, en la plataforma AntiBP Server, Collection of Antimicrobial-peptides (CAMPr3) y Antimicrobial peptide Database (DBAAS). Únicamente se encontraron péptidos en las secuencias de SbGLY1-3.1, SbGLY2-2.1, SbDj1-B.1, SbDj1-C.1 y SbDj1-C.1.2, las secuencias en aminoácidos completas se reportan en el Anexo 1. Los péptidos identificados como antimicrobianos se reportan en la Tabla 4. Se eligieron los péptidos en los cuales de acuerdo con los algoritmos de las diferentes plataformas tienen una mayor probabilidad de presentar actividad antimicrobiana.

Tabla 4. Predicción *in silico* de actividad antimicrobiana de los péptidos identificados en glioxalosas de *Sorghum bicolor*.

Proteína	Péptido	DBAAS	CAMPr3				AntiBP Server	Antimicrobial Peptide Scanner vr.2
			SVM	RFC	ANN	DAC		
SbGLY1-3.1	CLYGGRVVGGVV	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI
	DRRLLHVYRVG	SI	SI	NO	NO	SI	SI	NO
SbGLY2-2.1	PCHTKGHISYYVTS	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
SbDj1-B.1	SKKAGNICRTAVHQ	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO
SbDj1-C.1	RSRILKLLNLQ	SI	NO	SI	SI	SI	SI	NO
SbDj1-C.1.2	IRKFFGHGRAKAV	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI

Se realizó la predicción y comprobación de la actividad antimicrobiana a partir de plataformas bioinformáticas, y a partir del modelo de árbol de decisión creado a partir del algoritmo j48 basado

en las propiedades fisicoquímicas de los péptidos (Anexo 2), el cual fue descrito por Lira et al., (2013).

En la secuencia SbGLY1-3.1, se identificaron dos péptidos con presunta actividad antimicrobiana y de acuerdo con las diferentes plataformas de predicción se indicó que el que tiene una mayor probabilidad de tener actividad es CLYGGRVVGGVV. La predicción se basó en sus propiedades fisicoquímicas y a la similitud con otros péptidos reportados en las bases de datos. En la proteína SbGLY2-2.1 se identificó un probable péptido (Tabla 4), sin embargo, las plataformas que se utilizaron para confirmar indican que no es probable que cumpla esta función. En SbDj1-B.1 se identificó un péptido con pocas probabilidades de ser funcional, mientras que el péptido IRKFFGHGRAKAV identificado en SbDj1-C.1.2 (Tabla 4) todas las plataformas coinciden en que tendrá actividad antimicrobiana. Las plataformas utilizadas para la identificación y confirmación de la probable actividad antibacteriana realizan una predicción *in silico* en base a la similitud de los presuntos péptidos con aquellos que ya han sido reportados en bases de datos, principalmente se basan en la composición en cuanto aminoácidos. Por otro lado, a partir de las características fisicoquímicas se puede predecir el grado de actividad en la interacción con la membrana, su estabilidad y modo de acción dependiendo de los organismos que interactúa (Pirtskhalava et al., 2021).

La predicción *in silico* se realiza a partir de algoritmos, por ejemplo, la plataforma antimicrobial Peptide Scanner vr2 trabaja a partir del algoritmo deep learning, el cual proporciona una probabilidad, mayor a 0.5, se considera el péptido con actividad antimicrobiana. El programa AMP predictor utiliza los algoritmos support vector machines (SVM), random forests (RF), artificial neuronal network (ANN) y discriminant analysis (DA), los cuales generan un puntaje que va de entre 0-1, a mayor sea este puntaje es mayor la probabilidad de que sea un péptido con actividad antimicrobiana (Veléz et al., 2021).

Todos los péptidos identificados tienen carga positiva con valores mayor a 2, con excepción de los péptidos CLYGGRVVGGVV y PCHTKGHISYYVTS que tienen valores de 1 y 1.5 respectivamente. Se relaciona la carga con la actividad antimicrobiana de los péptidos ya que la mayoría de los péptidos funcionales reportados son anfifílicos y cargados positivamente con cargas netas que van desde +2 a +9 por la presencia de un fragmento hidrofóbico y uno hidrófilico (Lei et al., 2019). Los PAMs con cargas positivas a pH fisiológico son considerados péptidos catiónicos, esto se debe a la alta proporción de arginina y lisina, los cuales son aminoácidos con carga positiva en relación de aquellos con carga negativa como el ácido aspártico y el ácido glutámico (Téllez y Castaño, 2011). La carga positiva de los péptidos facilita el modo de interacción con las paredes y membranas celulares (unión

a cabezas aniónicas de fosfolípidos) principalmente de las bacterias (Yeaman and Yount, 2003, Téllez y Castaño, 2011). La carga positiva es atraída por la carga negativa de las paredes, por los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de las Gram + o en el caso de las Gram – por los lipopolisacáridos, esta interacción genera estabilización de la membrana externa causando daños o modificaciones, es de aquí su modo de acción en las cuales genera poros, laminas o dobladuras que llevan a la lisis de la célula. El grado de cationicidad del péptido está estrechamente relacionado con la actividad antimicrobiana (Yeaman and Yount, 2003).

Se ha reportado que el porcentaje de residuos hidrofóbicos en un péptido con actividad antimicrobiana debe de ser mayor o igual al 30% (Téllez y Castaño, 2011). La mayoría de los péptidos reportados en las bases de datos de identificación de péptidos con actividad antimicrobiana tienen un porcentaje mayor al 50% (Yeaman and Yount, 2003), todos los péptidos con excepción del identificado en SbGLY2-2.1 presentan porcentajes mayores al 30%. El peso molecular tiene una relación directa con la longitud y composición del péptido, generalmente los péptidos que presentan actividad antimicrobiana son de poca longitud y de bajo peso molecular (menor a 10 kDa) (Osorio et al., 2015). En los péptidos identificados en las glioxalinas de sorgo todos se encuentran por debajo de los 10 kDa. En cuanto el punto isoeléctrico es capaz de afectar la solubilidad del péptido, ya que el pH del solvente es igual a la pI del péptido y va a tender a precipitarse y por lo tanto a perder su actividad biológica; estos péptidos tienden a tener un pI cercano a 10 (Torrent et al., 2011; Osorio et al., 2015). En nuestro resultado todos los péptidos oscilan su pI cercana al 10. Se cree que los péptidos antimicrobianos tienden a ser más termoestables, la termoestabilidad se basa en la presencia de aminoácidos alifáticos como A, I, L y V (Osorio et al., 2015), los péptidos que presentan un mayor porcentaje de aminoácidos alifáticos con un 41% son CLYGGRVVGGVV y RSRILKLLNLQ por lo que los podemos clasificar como estables a temperaturas altas.

El índice de Boman es un parámetro que indica la interacción y facilidad de unión del péptido con la membrana, estos péptidos no tienden a interactuar con otras proteínas, los valores de este índice tienden a ser negativos o muy cercanos al 0 (Osorio et al., 2015).

El coeficiente de partición (log P) indica el grado de hidrofobicidad del péptido o afinidad por los lípidos, es decir que es la predicción del comportamiento en fluidos biológicos y como es capaz de pasar a través de la membrana (por afinidad a los fosfolípidos). Cuando un péptido tiene una alta afinidad a los lípidos se va a mantener en el interior lipídico de la membrana. Al tener un valor de log P alto, el péptido va a tener una solubilidad baja y a partir de los valores de log de 2-3 se empieza a

ver afectada la solubilidad del péptido (Bergstrom et al., 2018; Ugwuja et al., 2019), nuestros valores de log P son negativos por lo que su solubilidad se puede predecir como buena.

De acuerdo con los resultados obtenidos se dedujo que el péptido RSRILKKLLNLQ identificado en Sbdj1-C.1 es el que tendría actividad contra más organismos como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *B. subtilis*. El péptido identificado en la proteína Sbdj1-B.1 inhibe el crecimiento únicamente el crecimiento de *B. subtilis* (Tabla 6). La predicción *in silico* realizada contra especies particulares de bacterias y hongos se basa en la concentración mínima inhibitoria (MIC), si la plataforma predice que la MIC de ese péptido para cada especie en particular es menor a 25 µg/ml se supone que este es un péptido activo contra esa especie en particular, mientras que si el valor de MIC es mayor a 100 µg/ml se predice que es un péptido no activo (Pirtskhalava et al., 2016).

Los péptidos CLYGGRVVGGVV y PCHTKGHISYYVT presentan la estructura de lámina β , mientras que el péptido IRKFFGHGRAKAV se clasifica dentro de la familia ni- $\alpha\beta$ ya que no presenta ni la estructura de α -hélice ni la de lámina β (Figura 19). Estos estudios *in silico* son de suma importancia para el diseño y el mejoramiento de péptidos con actividad antimicrobiana, el comprender sus características fisicoquímicas que regulan su actividad da la pauta para modificarlas y potenciar su acción.

Los péptidos con actividad antimicrobiana generalmente se clasifican en cuatro grupos de acuerdo con su estructura secundaria: α , β , $\alpha\beta$, y ni- $\alpha\beta$ (Wang, 2014). La familia α se caracterizan por tener una estructura de α -hélice y es la familia más grande que contiene este tipo de péptidos, los péptidos DRRLLHVYRVG, SKKAGNICRTAVH y RSRILKKLLNLQ presentan esta estructura. La familia β se caracteriza por ser estructuras anfipáticas con varias repeticiones de láminas β (mínimo dos repeticiones), frecuentemente estas estructuras se encuentran acomodadas de modo antiparalelas y pueden estabilizarse a partir de puentes disulfuro, debido a esto presentan residuos de cisteína (Yeaman and Yount, 2003).

Tabla 5. Predicción de la actividad antimicrobiana de los péptidos identificados en glioxalinas de *Sorghum bicolor* a partir de sus características fisicoquímicas.

Proteína	Péptido	Formula molecular	Peso molecular (kDa)	Hidrogeno	Oxigeno	Log P	pI	Carga	Residuos hidrofóbicos (%)	IB (kcal/mol)	Energía de Drending (kJ/mol)	ASA_P (Å)	PA
SbGLY1-3.1	CLYGGRVVGGVV	C52H87N15O14S1	1.17	87	14	-3.62	8.22	+1	50	-0.92	630.82	440.14	Actividad alta
	DRRLLHVYR VG	C72H123N27O17S0	1.63	123	17	-5.94	11.5	+3.25	38	3.86	914.38	741.15	Sin actividad
SbGLY2-2.1	PCHTKGHSYYVTS	C71H105N19O21S1	1.59	105	21	-5.08	8.58	+1.5	21	1.13	982.3	434.62	Actividad media
SbDj1-B.1	SKKAGNICRTAVHQ	C62H110N22O19S1	1.51	110	19	-10.86	10.0	+3.25	35	2.43	973.05	468.31	Actividad alta
SbDj1-C.1	RSRILKLLNLQ	C66H125N21O16S0	1.48	125	16	-4.98	12.0	+4	41	2.65	679.55	532.73	Sin actividad
SbDj1-C.1.2	IRKFFGHGRAKAV	C69H111N23O14S0	1.48	111	14	-5.30	12.0	+4.25	46	1.93	842.53	508.62	Actividad media

pI: punto isoeléctrico
 IB: Index Boman
 PA: Probable actividad
 ASA_P: Área accesible para péptidos

Tabla 6. Predicción *in silico* de actividad de los péptidos contra diversos microorganismos

Proteína	Péptido	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumonia</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Eritrocitos humanos</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
SbGLY1-3.1	CLYGGRVVGGVV	-	-	+	-	-	-	-	-
	DRRLLHVYRVG	-	-	+	-	-	-	-	-
SbGLY2-2.1	PCHTKGHISYYVTS	-	-	+	-	+	-	-	-
SbDj1-B.1	SKKAGNICRTAVHQ	-	-	-	-	-	+	-	-
SbDj1-C.1	RSRILKLLNLQ	+	+	+	+	-	+	-	-
SbDj1-C.1.2	IRKFFGHGRAKAV	+	+	-	-	-	-	-	-

+ péptido con actividad antimicrobiana

-péptido sin actividad antimicrobiana

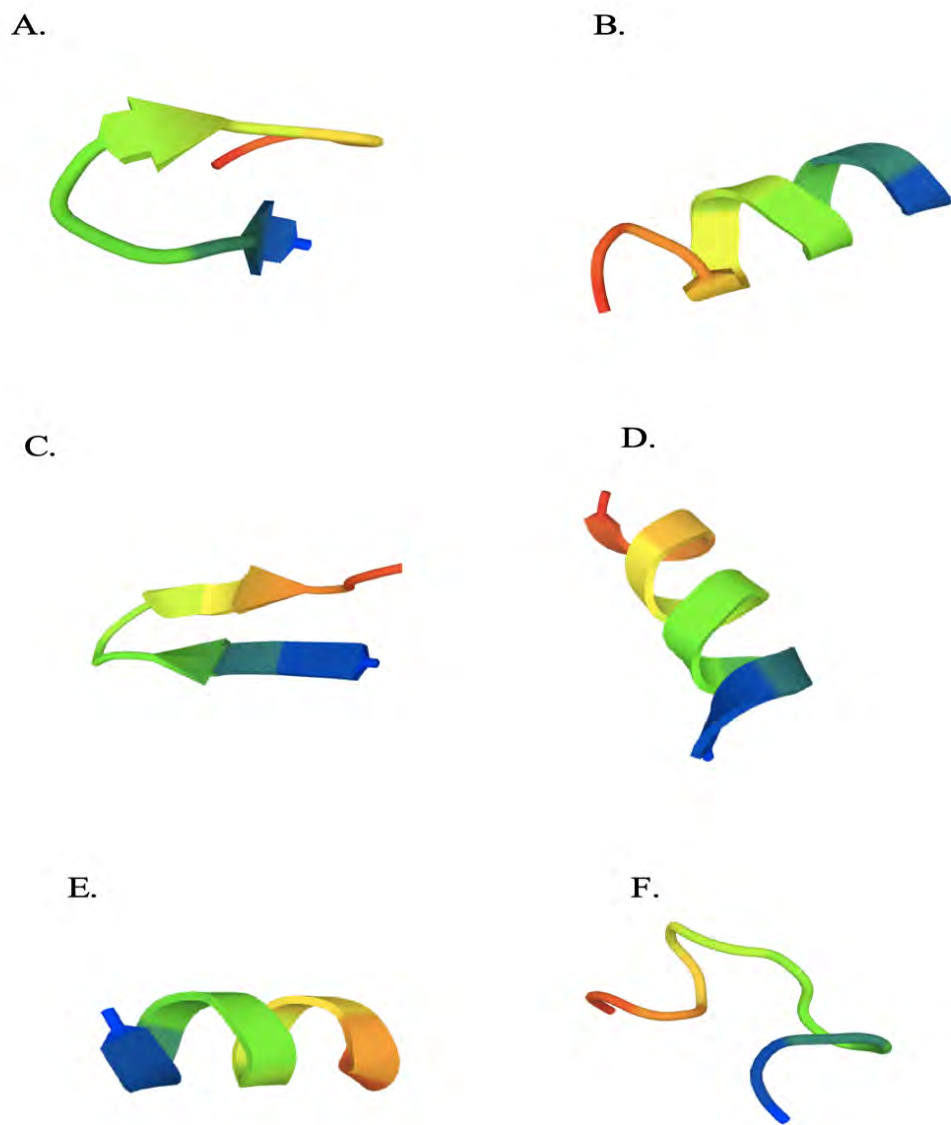


Figura 19. Modelado hipotético de PAMs identificados en glioxalinas de *Sorghum bicolor* A) CLYGGRVVGGVV, B) DRRRLLHVYRVG, C) PCHTKGHISYYVT, D) SKKAGNICRTAVH, E) RSRILKLLNLQ, F) IRKFFGHGRAKAV.

Diseño del gen sintético a partir de los péptidos antimicrobianos identificados en *Sorghum bicolor*.

Con base en la predicción de la actividad y similitud con otros péptidos se realizó el diseño de dos genes sintéticos. Los péptidos elegidos fueron los siguientes:

- **CLYGGRVVGGVV** → actividad alta
- **PCHTKGHISYYVT** → actividad media
- **IRKFFGHGRAKAV** → actividad media

Con la secuencia de cada uno de los péptidos se realizó una búsqueda de péptidos similares en diferentes bases de datos de péptidos con actividad antimicrobiana, únicamente el péptido CLYGGRVVGGVV presentó una similitud del 75% con el péptido dermaseptina, el cual se ha comprobado su actividad contra bacterias (Gram + y Gram -), hongos, protozoarios, levaduras y virus (Abassi et al., 2013). Con base a estos 3 péptidos se realizó el diseño de dos genes sintéticos. El primero se le llamó GSUNION, el cual es la unión de los tres péptidos previamente identificados (Figura 20) y el segundo se le llamó GSLINK (Figura 21) en el cual los péptidos se separan por regiones ricas en glicina y serina [(GGGS)]₃, los cuales sirven como separadores, y ayudan a que los péptidos puedan actuar independientemente, favorecen a la flexibilidad y al plegamiento de las proteínas fusionadas (Baghbeheshti et al. 2021; Grawe y Stein, 2021). A los péptidos codificadas por los dos genes sintéticos se realizó la predicción de algunas propiedades que ayudan a verificar la funcionalidad y su facilidad de producción por la tecnología del ADN recombinante (Figura 22-24), así como una clonación *in silico* para verificar el marco de lectura correcto (Figura 25 y 26).

Gen sintético GSUNION
CLYGGRVVGGVVPCHTKGHISYYVTSIRKFFGHGRAKAV

No. aa	39
GRAVY	0.156
Carga neta	6.75
pl	10.04
% de hidrofobicidad	38%
Índice de estabilidad	33.51
PM	4.22 kDa
Índice terapéutico	6.63
Tiempo estimado de vida	1.2 hours (mammalian reticulocytes, in vitro) >20 hours (yeast, in vivo) >10 hours (<i>Escherichia coli</i> , in vivo)

Figura 20. Secuencia y propiedades del gen sintético GSUNION. El péptido sintético tiene una longitud de 39 aa, un índice GRAVY de 0.156, una carga positiva neta de 6.75, tiene un peso molecular de 4.22 kDa y un tiempo de vida menor a 10 horas en bacterias.

Gen sintético GSLINK
CLYGGRVVGGVVGGGGSGGGGSGGGGSPCHTKGHISYYVT
SGGGGSGGGGSGGGGSIRKFFGHGRAKAV

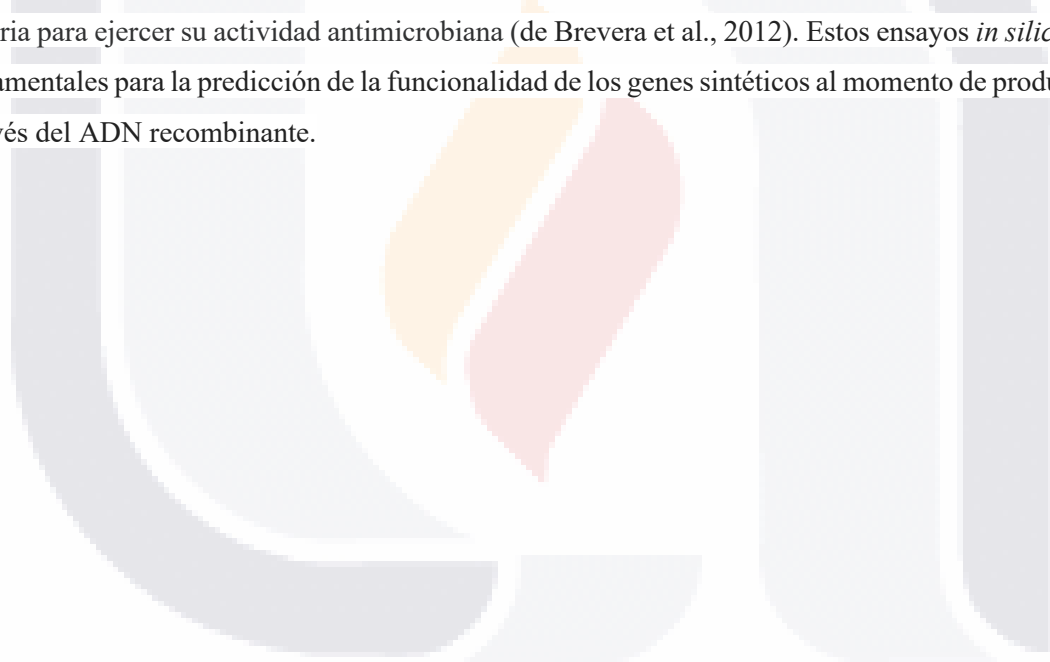
No. aa	69
GRAVY	-0.120
Carga neta	6.75
pI	10.04
% de hidrofobicidad	21%
Índice de estabilidad	57.82
PM	6.11 kDa
Índice terapéutico	80.74
Tiempo estimado de vida	1.2 hours (mammalian reticulocytes, in vitro) >20 hours (yeast, <i>in vivo</i>) >10 hours (<i>Escherichia coli</i> , in vivo)

Figura 21. Secuencia y propiedades del gen sintético GSLINK. El péptido sintético tiene una longitud de 69 aa, un índice GRAVY de -0.120, una carga positiva neta de 6.75, tiene un peso molecular de 6.11 kDa y un tiempo de vida menor a 10 horas en bacterias.

La predicción *in silico* de actividad antimicrobiana y su mecanismo de acción de los péptidos sintéticos se muestran en la Figura 22. El gen sintético GSUNION presentó un índice de estabilidad de 33.5 por lo que se considera una proteína estable (Gurupradas et al., 1990), mientras que la proteína GSLINK es inestable. El valor de GRAVY ayuda a predecir la solubilidad de la proteína, a valores menores 0 la proteína es hidrofílica y valor por encima a 0 son hidrofóbicas (Magdeldin, 2012). Ambos péptidos son hidrofílicos por lo que tienen una conformación globular (Shen, 2019), esto es un indicativo que los péptidos van a encontrar en la fracción de las proteínas totales solubles. El índice terapéutico es otro parámetro que indica la relación de toxicidad con la eficiencia, es decir que

tan selectivo es el péptido, entre más grande sea el valor indica que el péptido es más selectivo (Greco et al., 2020). El porcentaje de hidrofobicidad tiene una relación directa con la toxicidad, a menor hidrofobicidad mayor solubilidad en agua, menor toxicidad, en ambos casos son porcentajes relativamente pequeños. El tiempo estimado de vida es un valor importante para establecer los tiempos de inhibición bacteriana, en *E. coli* se obtuvo un tiempo de vida de ambos péptidos mayor a 10 horas por lo que es un buen intervalo de tiempo en donde se podría probar diferentes tiempos de inhibición (Guruprasad et al., 1990).

Se analizó la flexibilidad de los péptidos, esperando que la proteína GSLINK tuviera una mayor flexibilidad a comparación de GSUNION, esto debido a que presenta los separadores ricos en guanina y serina. La flexibilidad de ambos péptidos se puede comprobar en la Figura 23 y 24. Si el valor de predicción de flexibilidad es igual o mayor 1, se puede confirmar que ese fragmento del péptido es soluble, de acuerdo con esto se comprueba que la proteína GSLINK es mas flexible lo que probablemente facilitara la función e interacción individual de cada péptido con la membrana de la bacteria para ejercer su actividad antimicrobiana (de Brevera et al., 2012). Estos ensayos *in silico* son fundamentales para la predicción de la funcionalidad de los genes sintéticos al momento de producirse a través del ADN recombinante.



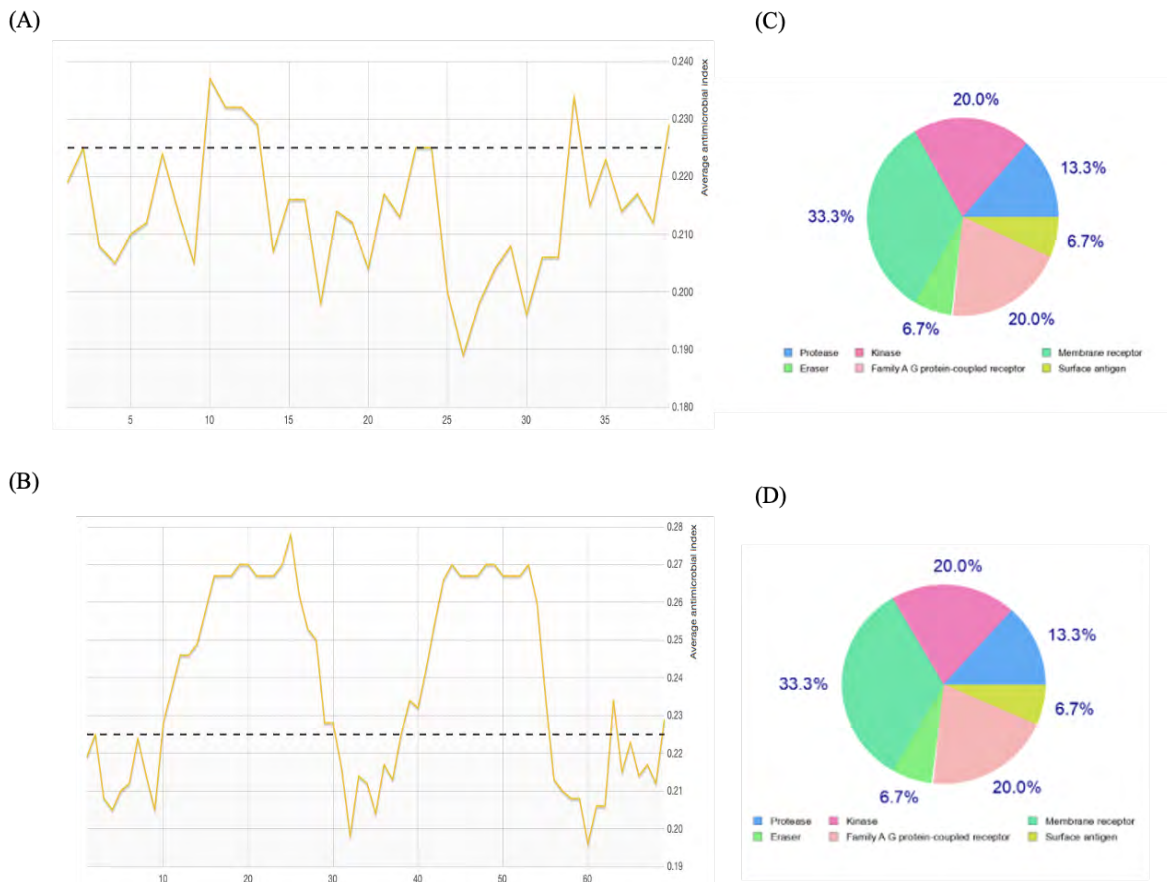


Figura 22. Predicción de la actividad antimicrobiana del péptido codificada por A) GSUNION, B) GSLINK, Predicción del mecanismo de actividad antibacteriana, C) GSUNION, D. GSLINK.

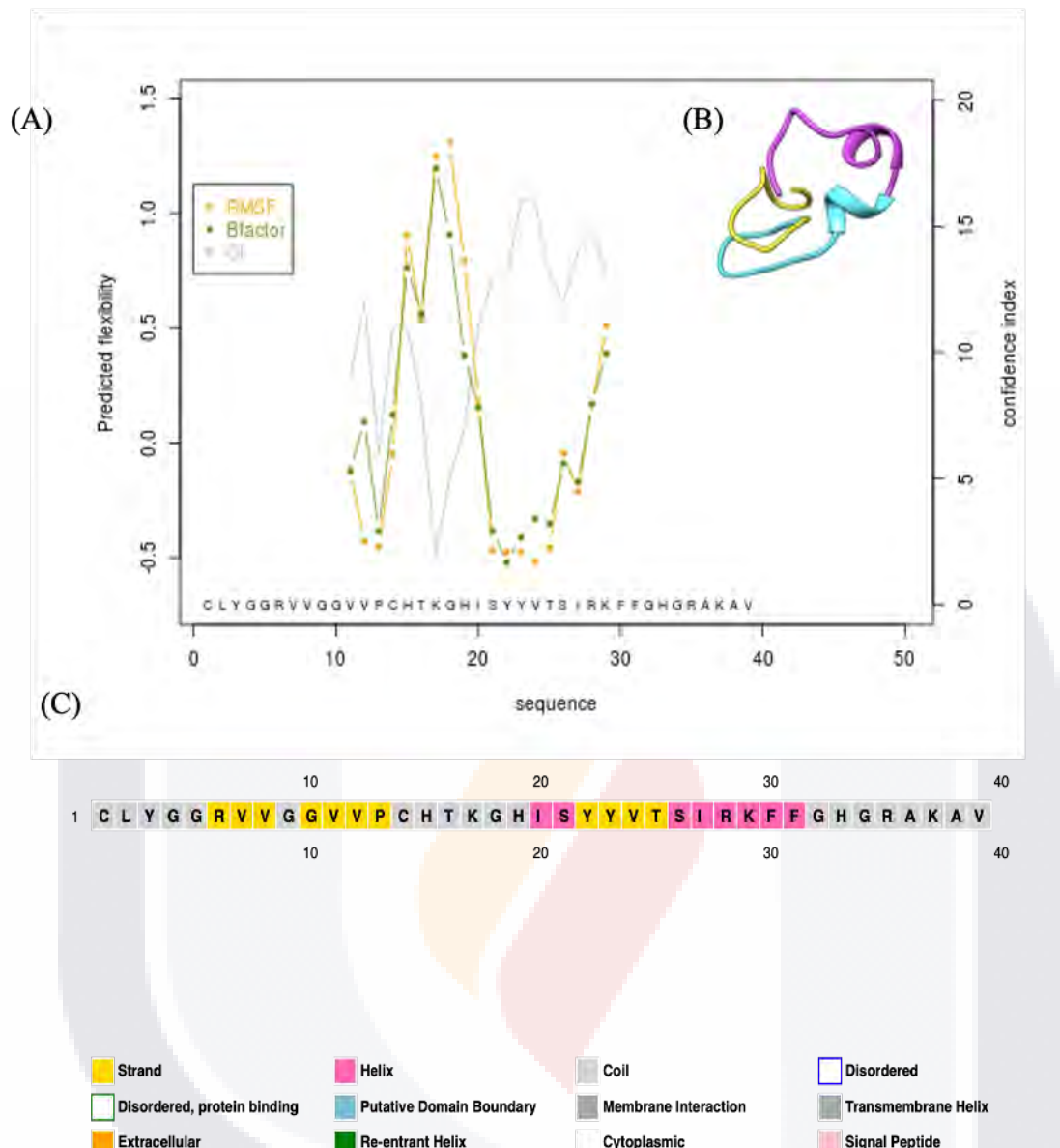


Figura 23. A. Predicción *in silico* de la flexibilidad del péptido GSUNION, B. Estructura tridimensional de la proteína GSUNION, C. Estructura secundaria de la proteína GSUNION.

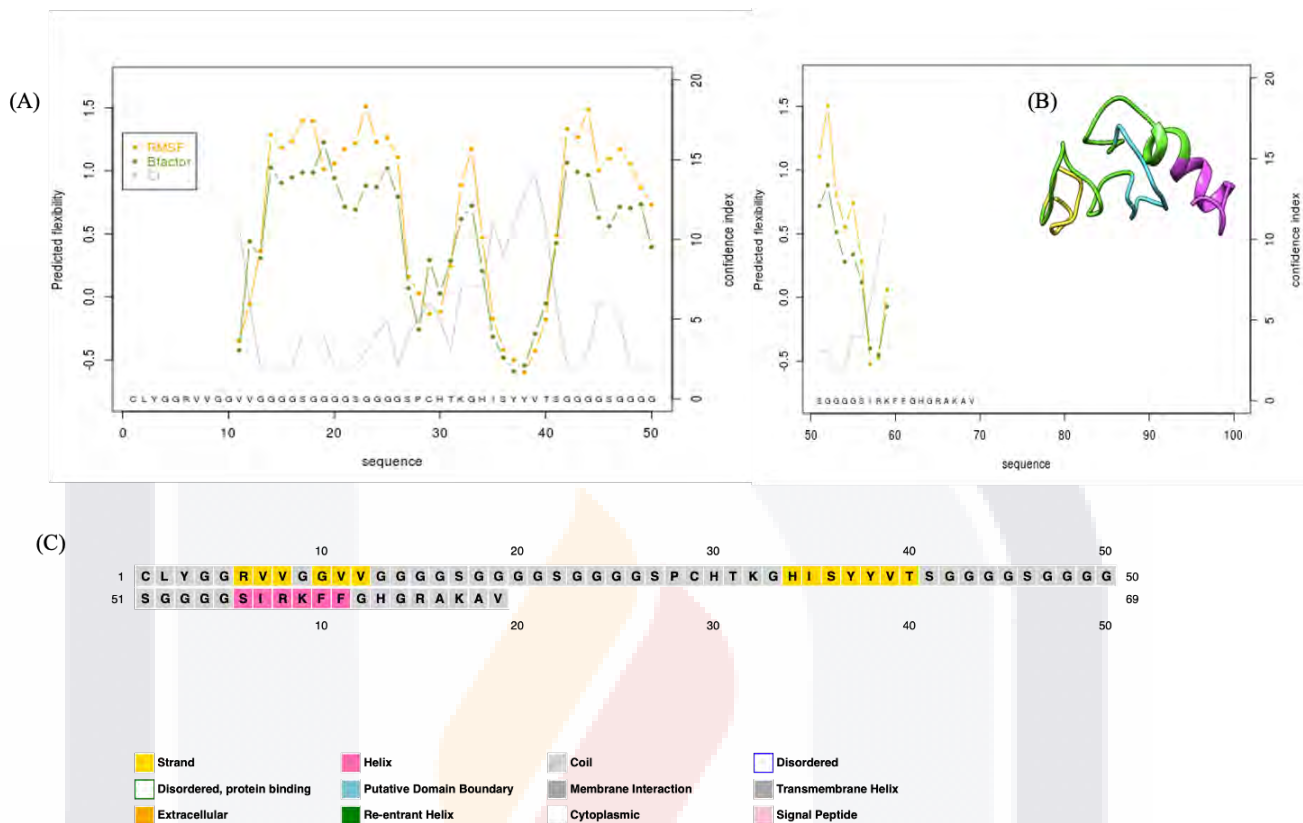


Figura 24. A. Predicción *in silico* de la flexibilidad del péptido GSLINK, B. Estructura tridimensional del péptido GSLINK, C. Estructura secundaria del péptido GSLINK.

Created with SnapGene®

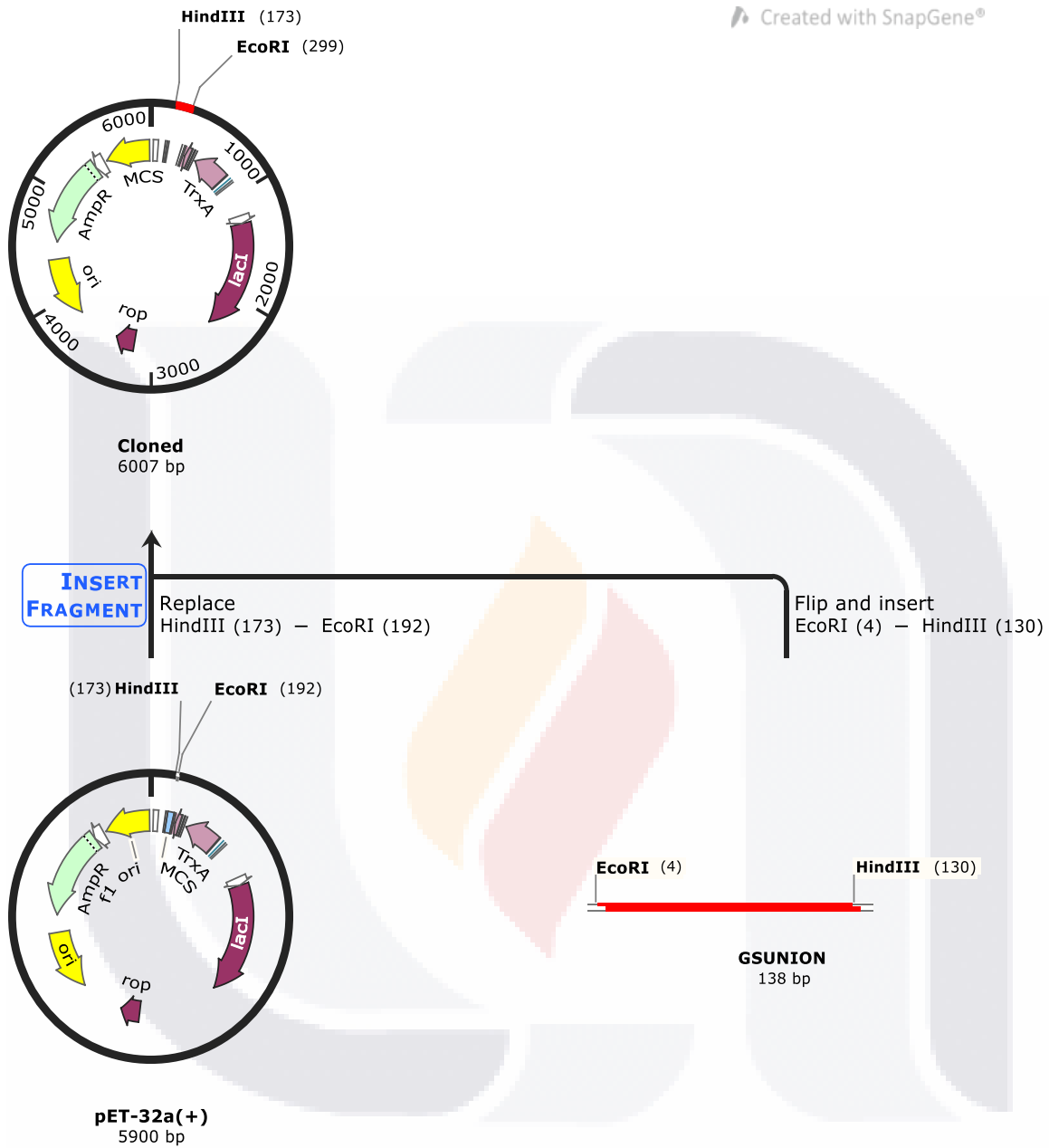


Figura 25. Comprobación del marco de lectura del gen GSUNION. El fragmento tiene una longitud de 138 pb y se utilizan las enzimas de restricción Eco RI y Hind III para clonarlo en sentido en el vector de expresión pET-32a(+).

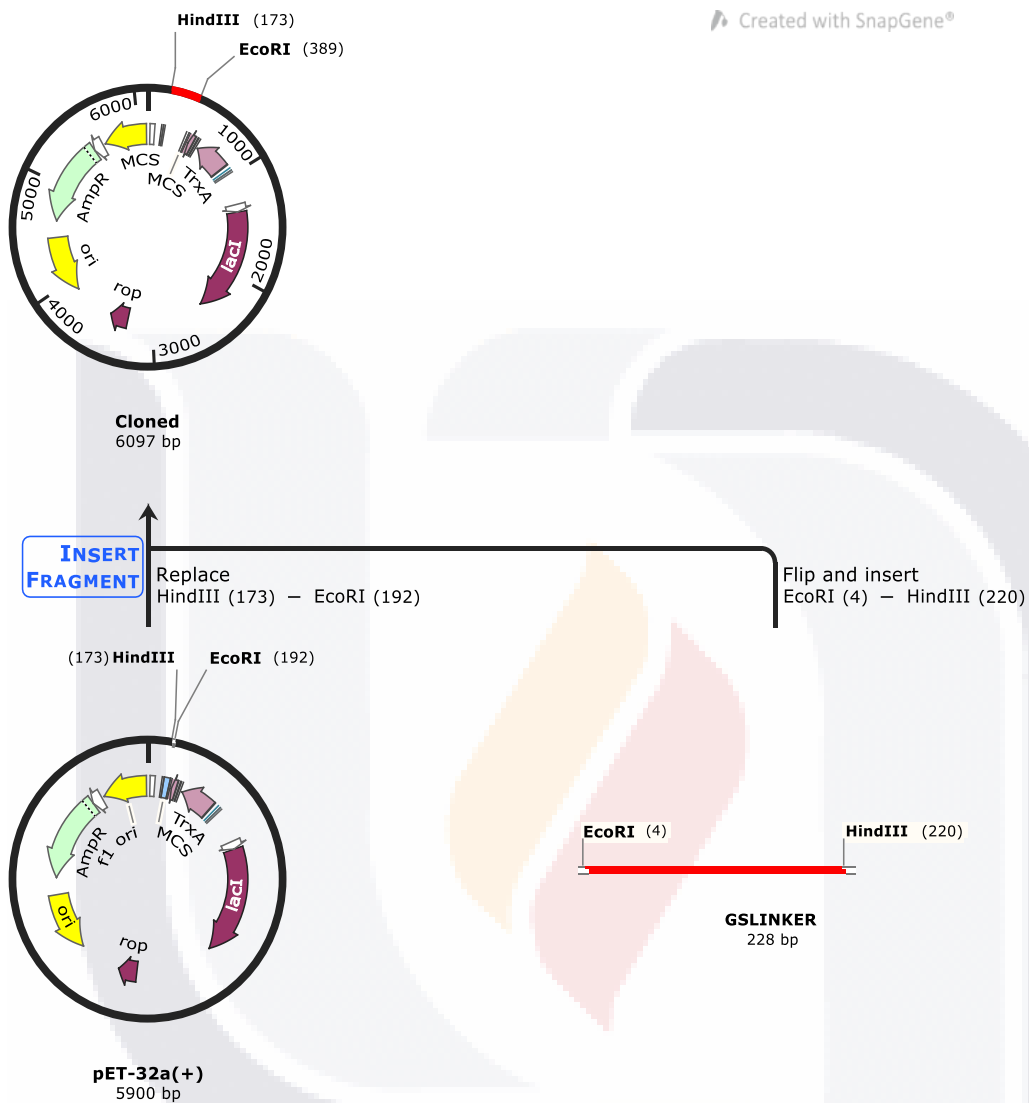


Figura 26. Comprobación del marco de lectura del gen GSLINK. El fragmento tiene una longitud de 228 pb y se utilizan las enzimas de restricción Eco RI y Hind III para clonarlo en sentido en el vector de expresión pET-32a(+).

Estrategia 2. Síntesis verde y caracterización de AgNPs a partir del extracto de cáscara de tuna (*Opuntia ficus-indica*)

Síntesis verde y caracterización de las *OfAgNPs*.

La síntesis de *OfAgNPs* se comprobó inicialmente por el cambio de coloración a marrón oscuro en la solución coloidal (Figura 27a). El color de la solución depende del tamaño y la forma de las AgNPs (Oldenburg, 2014). De acuerdo con el plasmón se pueden predecir características espectrales de las nanopartículas de plata, la longitud máxima obtenida fue de 435 nm y el ancho del pico del plasmón fue de 150 nm (Figura 27b), por lo que se infiere que el tamaño de nuestras nanopartículas es de aproximadamente de entre 60-80 nm, esta predicción se basa en resultados recopilados por Mulfingher et al., 2007 (Chhatre et al., 2012; Mulfingher et al., 2007). Las propiedades ópticas de las AgNPs resultan de la interacción con la luz, por lo que el plasmón de resonancia depende de diferentes factores como: forma, tamaño, composición, índice de refracción del metal, presencia de especies adsorbidas, ambiente dieléctrico, interacciones electromagnéticas mutuas y la distancia entre las AgNPs, estos ajustan el pico de absorción en el rango de 393-738 nm (Wei et al., 2015; Chhatre et al., 2012; Ren y Tilley, 2007; Huang y Xu, 2010).

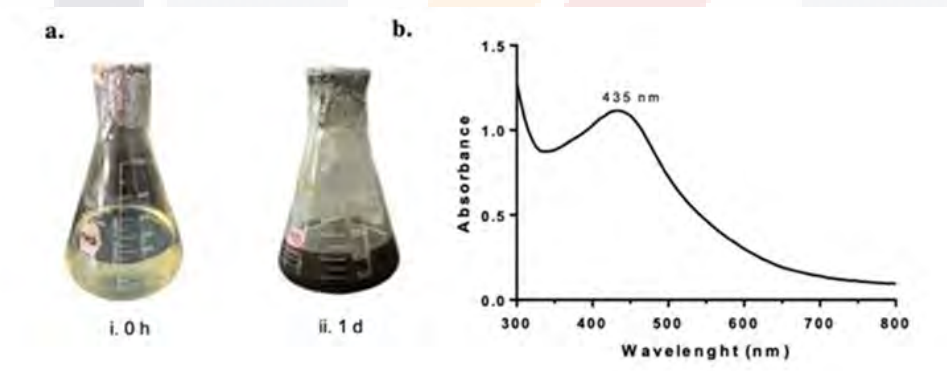


Figura 27. Síntesis de *OfAgNPs* a. Cambio de coloración característico de la síntesis de *OfAgNPs* (i) a las 0 h y (ii) 1 día de síntesis. b. Plasmón de resonancia de *OfAgNPs*, Se muestra un barrido de absorbancias a las longitudes de onda de 300-800 nm.

El análisis SEM mostró que las *OfAgNPs* presentan una forma esférica y se encuentran aglomeradas (Figura 28a). En el histograma de distribución de tamaños se observó que el diámetro promedio es de 64.28 ± 11.82 nm (Figura 28b), lo que coincide con los resultados predictivos obtenidos a partir del plasmón de resonancia. El coeficiente de variación fue de 18.39 lo que comprueba que existen nanopartículas monodispersas en el coloide, y las *OfAgNPs* son en su mayoría homogéneas y uniformes en tamaño.

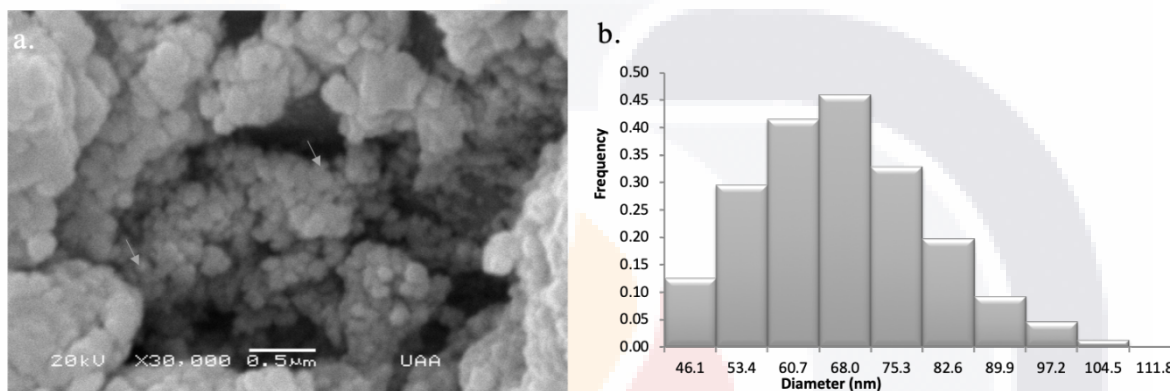


Figura 28. Morfología y diámetro de *OfAgNPs*. (a) Micrografía SEM, se observan que las *OfAgNPs* tienen una morfología esférica y se encuentran aglomeradas debido a la preparación de la muestra. (b) Histograma de distribuciones de los tamaños de las *OfAgNPs*, el diámetro de las *OfAgNPs* se distribuye entre los 46.1-104.5 nm, con un promedio de 64.28 ± 11.82 nm ($n=300$).

Los valores del diámetro hidrodinámico tienen poca variación a través del tiempo, en el tiempo 0 es de 264 ± 0.015 nm y a las 120 h es de 220 ± 0.018 nm (Figura 29a). Estos valores sobrepasan la escala nanométrica, además son mayores que el valor obtenido en las mediciones del SEM. Las diferencias de tamaños entre el SEM y el diámetro hidrodinámico se explican porque el SEM mide el tamaño real o físico de la nanopartícula, mientras que el DLS mide el tamaño de la partícula aunado a las biomoléculas que están unidas a la superficie de las *AgNPs* (Bernardo-Mazariegos et al., 2019). Los compuestos fitoquímicos que se encuentran en el extracto de la cáscara de la tuna participan como

agentes reductores en la síntesis y en el recubrimiento, como agentes estabilizantes de las AgNPs, siendo una ventaja de nuestra metodología de síntesis, ya que no es necesario añadir agentes químicos estabilizadores. Se ha reportado la estabilización y recubrimiento de nanopartículas metálicas de biosíntesis en plantas por aldehídos, cetonas, ácido tartárico, compuestos heterocíclicos solubles en agua como: alcaloides, flavonas, antracenos, terpenoides y flavonoides presentes en los extractos del material vegetal (Narayanan y Sakthivel, 2010). Debido a que se ha encontrado que los extractos acuosos de cáscara de tuna contienen ácidos fenólicos y flavonoides como: quercetina, kaempferol; algunas vitaminas como: k1, alfa-tocoferol, beta-tocoferol; y esteroides como: campesterol, lanosterol y estigmasterol, estos compuestos podrían ser los que recubren las OfAgNPs (El-Mostafa et al., 2014). Los valores de potencial Z fueron: en el tiempo 0 de -25.1 ± 0.03 mV y a las 120 h de -24.2 ± 0.06 mV (Figura 29b), indicando que las OfAgNPs son relativamente estables a través del tiempo y que poseen carga negativa. Estas características son proporcionadas por las moléculas integradas en su superficie durante el proceso de síntesis, las cuales generan repulsión electrostática o estérica, dándoles estabilidad, evitando la aglomeración y por lo tanto la precipitación en solución (Lee y Jun, 2019).

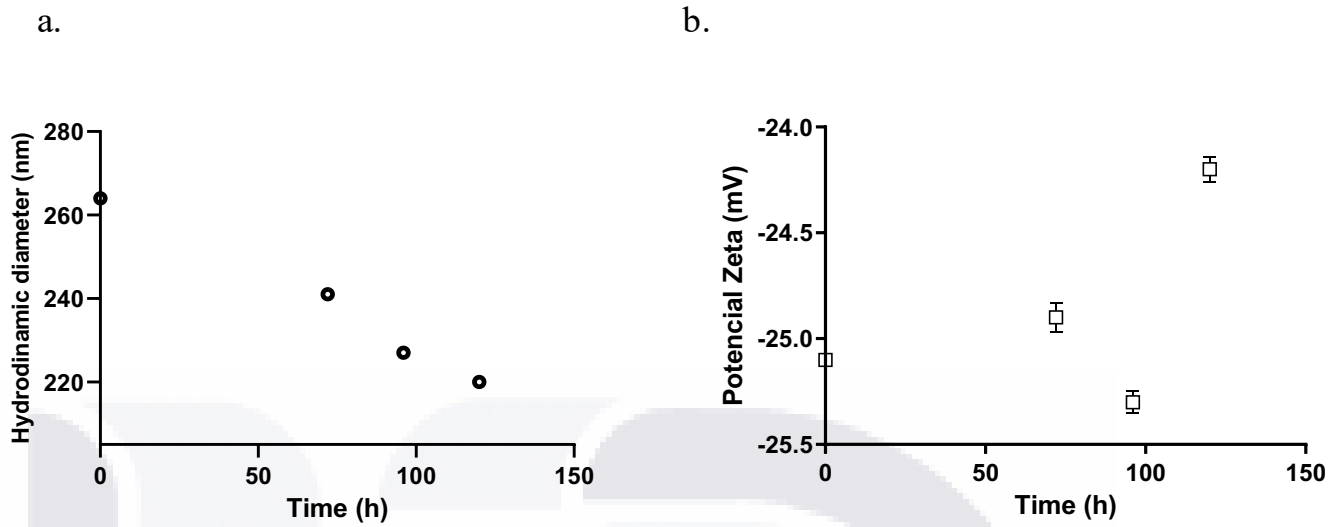


Figura 29. Gráficas del comportamiento del diámetro hidrodinámico y Potencial Z de las *OfAgNPs* a través del tiempo en agua ultrapura a temperatura ambiente. (a) Diámetro hidrodinámico, el valor promedio del diámetro hidrodinámico es de 238 ± 0.015 nm. (b) Potencial Z, los valores nos indican que las *OfAgNPs* son relativamente estables y que tienen carga negativa con un valor promedio de -24.87 ± 0.05 mV. Las mediciones se realizaron por triplicado, se muestra el promedio con su desviación estándar, en los datos que no se observa la desviación estándar se debe a que es menor al tamaño del símbolo.

Para conocer el comportamiento de las *OfAgNPs* en los medios en que se realizaron las evaluaciones de toxicidad y de actividad antibacteriana, se determinó su potencial Z y radio hidrodinámico. Los valores de potencial Z obtenidos del análisis de las *OfAgNPs* en agua desionizada, buffer de PO_4^- y en medio ISO fueron de -23 ± 0.2 , -21.82 ± 1.09 mV y -9.72 ± 0.26 mV, respectivamente (Tabla 7). Estos resultados muestran que las *OfAgNPs* tienen carga negativa en todos los medios de dilución, y que en agua desionizada y en buffer PO_4^- son estables, mientras que en medio ISO son inestables (Tabla 7). Entre más estables son las NPs en el medio, permanecen en suspensión coloidal por más tiempo, y son más biodisponibles para los sistemas biológicos los agentes estabilizantes influyen con la interacción con el organismo expuesto (De Leersnyder et al., 2019). En lo que respecta a los valores

del radio hidrodinámico que se pueden observar en la Tabla 7, indica que en estos medios el tamaño de las AgNPs sobrepasa la escala nanométrica. La carga, el tamaño de las partículas y la estabilidad son afectadas por el medio en el que estén dispersas (De Leersnyder et al., 2019; Quevedo et al. 2021). Además, condiciones del medio como pH, fuerza iónica y composición de electrolitos, afectan no solo las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs sino también su toxicidad (Lekamge et al., 2018; De Souza et al., 2019).

Tabla 7. Radio hidrodinámico y potencial Z al tiempo 0, en tres diferentes medios de dilución.

Medio de dilución	pH	Radio hidrodinámico (nm)	Potencial Zeta (mV)	Conductividad (mS cm⁻¹)	Movilidad electroforética (µm cm Vs⁻¹)
Agua desionizada	7	137.33 ± 4.42	-23 ± 0.2	0.011	-1.805
Buffer PO ₄ ⁻	7	149.1 ± 2.66	-21.82 ± 1.09	13.167	-1.729
Medio ISO	8	317.36 ± 205.10	-9.72 ± 0.26	2.203	-0.7501

El análisis de elementos por EDS RX de las *OfAgNPs*, demostró que el elemento que se encuentra en mayor porcentaje es la plata con 61.29%, también se identificó la presencia de otros elementos como el carbono (15.40 %), nitrógeno (1.17 %), oxígeno (6.59 %), magnesio (0.29 %), cloro (14.68 %) y calcio (0.58 %) (Figura 30a, 30b y 30c). El calcio y magnesio son elementos presentes en la cáscara de tuna (Becerril y Valdivia, 2006), por lo que es lógico que formen parte de las nanopartículas sintetizadas. La distribución de los elementos en la muestra se observa en la Figura 30a, donde el mayor porcentaje de distribución en la muestra es la plata. Por espectroscopia de absorción atómica se calculó el rendimiento de plata, en donde se observó que, por 100 gr de material sintetizado, existe 24.15 gr de plata, es decir un porcentaje del 24.15%. Esto comprueba que su recubrimiento por compuestos fitoquímicos proveniente del extracto, que es el restante del peso de la muestra.

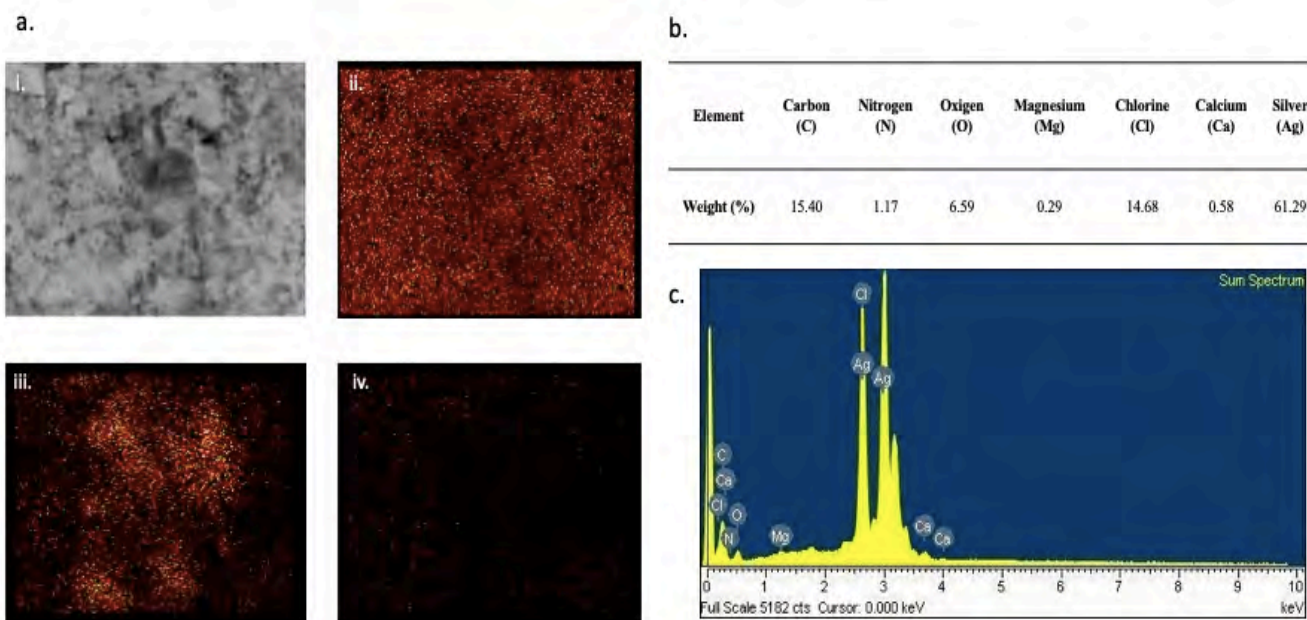


Figura 30. Composición de elementos de las *OfAgNPs*. (a) Micrografías SEM-EDS (i) micrografía de las *OfAgNPs*, (ii) distribución de plata, (iii) distribución de carbono, (iv) distribución de oxígeno. Las manchas de coloración roja muestran la distribución de algunos de los elementos que componen a las *OfAgNPs*. (b) Estimación cuantitativa por EDS RX de la composición de elementos. (c) Imagen EDS RX del microanálisis químico de la muestra de *OfAgNPs*

Análisis de actividad antibacteriana de las *OfAgNPs* en agua residual

En la muestra de agua residual tratada no clorada se identificaron bacterias coliformes: *E. coli* var 1, *Aerobacter aerogenes* var 1, *Citrobacter freundii* var 2 y de una *E. coli* atípica, estas bacterias generan enfermedades en el ser humano: *E. coli* es la causante de diarrea, infecciones intestinales, tracto urinario, y meningitis (Kaper et al., 2004), *Enterobacter aerogenes* causa infecciones en el tracto urinario, gastrointestinales y en el sistema respiratorio (Davin-Regli, 2015) y *Citrobacter freundii* es el causante de sepsis y meningitis en el período neonatal (Doran, 1999). Además, estos microorganismos son considerados indicadores de la presencia de organismos patógenos (Tallon et al., 2005).

En el análisis microbiológico del agua clorada de la planta de tratamiento, se observó una eliminación del 79% de las bacterias coliformes totales, el único microorganismo coliforme detectado fue *E. coli* var 1, lo que indica la presencia de contaminación fecal (Tabla 8). Las muestras de agua, tanto las que pasaron por un proceso de cloración como las que no, se trataron con 0.5 y 1.0 mg/ml de *OfAgNPs* por 0.5 h, estas condiciones se determinaron de acuerdo con el tiempo mínimo de inhibición y la disponibilidad de Ag^+ en el material sintetizado, ya que de acuerdo con el análisis de espectroscopia de absorción atómica equivale a 0.120 mg y 0.241 mg de Ag^+ respectivamente. En las muestras de agua residual tratadas expuestas con 0.5 y 1.0 mg/ml de *OfAgNPs*, independientemente al proceso de cloración, se obtuvo un valor de coliformes totales y fecales de 0.03 NMP/100 ml (Tabla 8), esto indica la ausencia de estas bacterias. No así en las muestras que fueron solo sometidas al proceso de cloración, con las que se obtuvo un valor de coliformes totales de 91 NMP/100 ml.

Se observó que, en la inhibición de organismos mesofílicos aerobios, los procesos que involucran exposición a las *OfAgNPs* son significativamente más efectivos que el de cloración (Figura 31). Además, ante estos organismos, no se observaron diferencias significativas entre las dos concentraciones evaluadas de *OfAgNPs* en ambas muestras de agua (sin cloro y clorada) (Figura 31). Estos resultados muestran la eficacia de 0.5 mg/ml de *OfAgNPs* en un tratamiento de 0.5 h tanto para coliformes como para microorganismos mesofílicos aerobios, y comprueban su acción contra bacterias Gram -, lo que nos permitirían el reusó del agua residual tratada, ya que la norma mexicana nos indica que para usarla en servicio al público con contacto directo se requiere un límite máximo

permisible de 240 NMP/100 ml y para servicios al público con contacto indirecto u ocasional se maneja un límite máximo de 1,000 NMP/100 ml (NOM, 1997). Se ha documentado que la acción del daño que generan las nanopartículas sobre las bacterias con los mecanismos de acción tiene una relación directa con sus características de las AgNPs: como: forma, tamaño, área de superficie, estado de aglomeración y carga superficial. De tal manera que las AgNPs provocan daño directo a nivel de la membrana celular debido a su interacción y penetración dentro de la célula y así también las AgNPs generan la liberación de iones plata que generan especies reactivas de oxígeno (ROS) generando la producción de radicales libres que interactúan con la materia orgánica y generar daños en componentes celulares como lípidos, el ADN y las proteínas, y la generación (Slavin et al., 2017; Some et al., 2018). En la actualidad a las AgNPs biosintetizadas se les han atribuido gran potencial como agentes antibacterianos, teniendo actividad contra bacterias Gram + y Gram -, además de que han sido reconocidas como no tóxicas, por lo que su uso es seguro (Some et al., 2018; Pazos-Ortiz et al., 2017; Rauwel et al., 2015). Debido a esto proponemos el uso de *OfAgNPs* como una alternativa a los procesos terciarios de desinfección utilizados en las plantas tratadoras de agua residuales (cloración).

Tabla 8. Cuantificación de coliformes totales y fecales en muestras de agua, antes y después del proceso de cloración, expuestas a diferentes concentraciones de *OfAgNPs* a partir de la técnica del número más probable.

Tratamiento	Coliformes totales	Coliformes fecales	Especies identificadas
	NMP/100 ml		
Sin tratamiento	430	150	<i>E. coli</i> var 1, <i>Enterobacter aerogenes</i> var 1, <i>Citrobacter freundii</i> var 2, <i>E. coli</i> atípica
Cloración	91	0.03	<i>E. coli</i> var 1
0.5 mg/ml de <i>OfAgNPs</i> (0.120 mg de Ag ⁺)	0.03	0.03	Ninguna
1.0 mg/ml de <i>OfAgNPs</i> (0.241 mg de Ag ⁺)	0.03	0.03	Ninguna
Cloración + 0.5 mg/ml de <i>OfAgNPs</i>	0.03	0.03	Ninguna
Cloración + 1.0 mg/ml de <i>OfAgNPs</i>	0.03	0.03	Ninguna

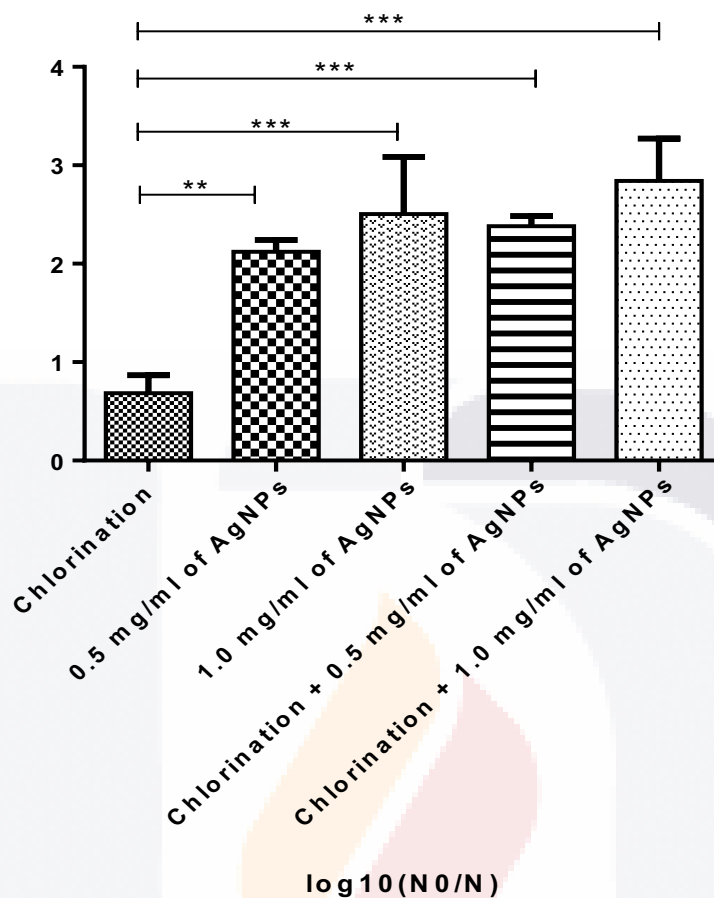


Figura 31. Inactivación de organismos mesofílicos aerobios. Las muestras de agua fueron expuestas durante 0.5 h. El valor de $N_0 = 1.70 \times 10^4$. El ensayo se realizó por triplicado y se graficó la media con sus respectivas desviaciones estándar ($n=3$). Se determinó la variabilidad entre los tratamientos con un ANOVA de un factor y se realizó una prueba de Tukey ($\alpha 0.05$) para evaluar las significancias de las diferencias observadas.

Bioensayo de toxicidad agudo de *OfAgNPs* en embriones de pez cebra (*Danio rerio*)

En las pruebas de toxicidad en *D. rerio* se observó una relación directa entre la concentración de *OfAgNPs*, el tiempo de exposición y los efectos toxicológicos. Se observó una disminución del porcentaje de eclosión a las mayores concentraciones evaluadas (Figura 32A). Los embriones de *D. rerio* del grupo control, del extracto vegetal los expuestos a las concentraciones de 0.075, 0.15 y 0.3 mg L⁻¹ de *OfAgNPs* comenzaron a eclosionar a las 48 hpf, con una eclosión del 100 % a las 72 hpf (Figura 32A). Mientras que con 0.6 y 1.2 mg L⁻¹ se observó una eclosión del 60 y 0 %, respectivamente, a las 72 hpf (Figura 31A). En el análisis de letalidad se determinó una CL₅₀ de 1.02 mg L⁻¹ a las 24 h, de 0.85 mg L⁻¹ a las 48 h, de 0.63 mg L⁻¹ a las 72 h y de 0.53 mg L⁻¹ a las 96 h (Figura 32B). Es decir, a mayor tiempo de exposición los valores de CL₅₀ fueron menores. El valor más alto de CL₅₀ observado para *D. rerio* fue de 0.53 mg L⁻¹ de las *OfAgNPs*, que es mayor que el reportado para AgNPs sintetizadas por métodos químico (0.08 mg L⁻¹) y biosintetizadas por otros protocolos (0.4 mg L⁻¹) (Ottoni et al., 2020).

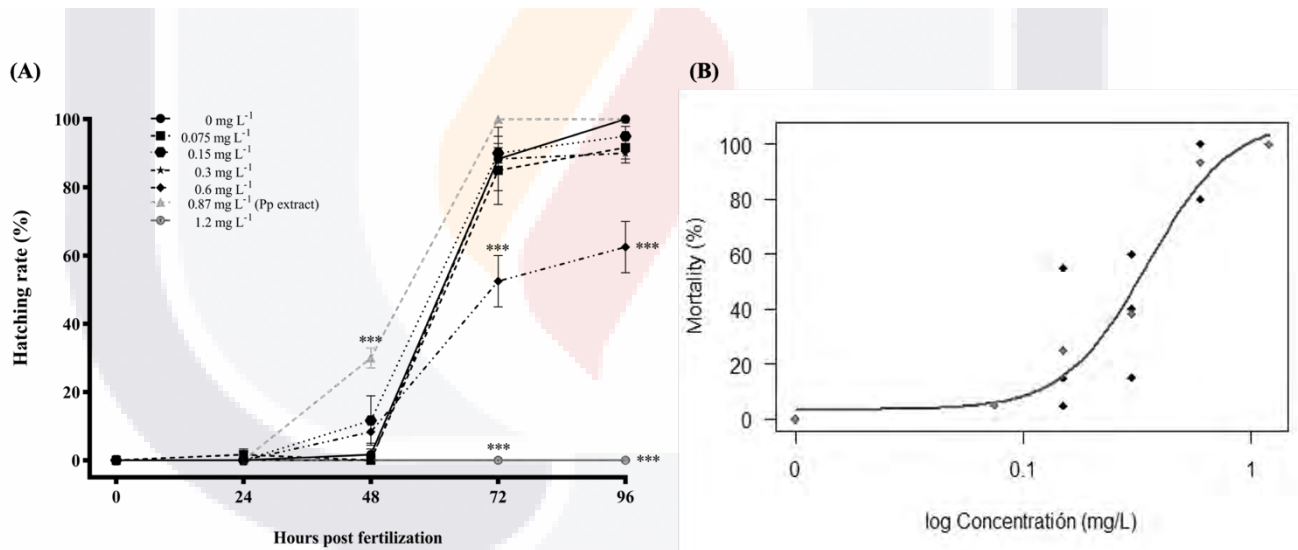


Figura 32. Toxicidad en *D. rerio* por exposición a *OfAgNPs*. (A) Eclosión de embriones de *D. rerio* en diferentes concentraciones de *OfAgNPs*. (B) Curva dosis-respuesta de *OfAgNPs* en *D. rerio*, que representa los embriones muertos en 96 h.

Por su parte, los efectos teratogénicos fueron más notorios en la medida en que se incrementó tanto la concentración de *OfAgNPs* como el tiempo de exposición (Figura 33). Tanto los embriones como las larvas del grupo control, y de las expuestas al extracto de la cáscara de tuna y a 0.075 mg L⁻¹ de *OfAgNPs* mostraron un desarrollo normal en los cuatro tiempos de observación. En la concentración de 0.15, 0.3 y 0.6 mg L⁻¹ de *OfAgNPs*, las larvas presentaron una aleta caudal mal desarrollada. El 100 % de los embriones expuestos a 1.2 mg L⁻¹ coagularon desde las 24 hpf, no presentaron desarrollo de somites y se observaron edemas pericárdicos. Efectos similares teratogénicos, aumento en la producción de enzimas antioxidantes, y apoptosis se observaron en otros trabajos con *D. rerio* (Qiang et al., 2020, Van aerle et al., 2013). En la Figura 33, se muestra el porcentaje de la población evaluada que mostró efectos teratogénicos como coagulación, no formación de somites, mal desarrollo de aleta caudal, edema y ausencia de latido cardíaco. Las AgNPs penetran los embriones de *D. rerio* a través de los poros que se encuentran en el corion, sin embargo, el efecto tóxico se cree que es mediado por la liberación de iones Ag⁺ generando daño oxidativo, alteración en las enzimas regulatorias, cambios en la expresión génica que intervienen en el proceso de apoptosis y afectaciones en la maquinaria celular que interviene en la eliminación de metales (Van Aerie et al., 2013). Esto sugiere que, los componentes biológicos que se adicionan a las *OfAgNPs* en la síntesis con extracto de cáscara de tuna aportan propiedades que hacen que reduzca su actividad toxicológica.

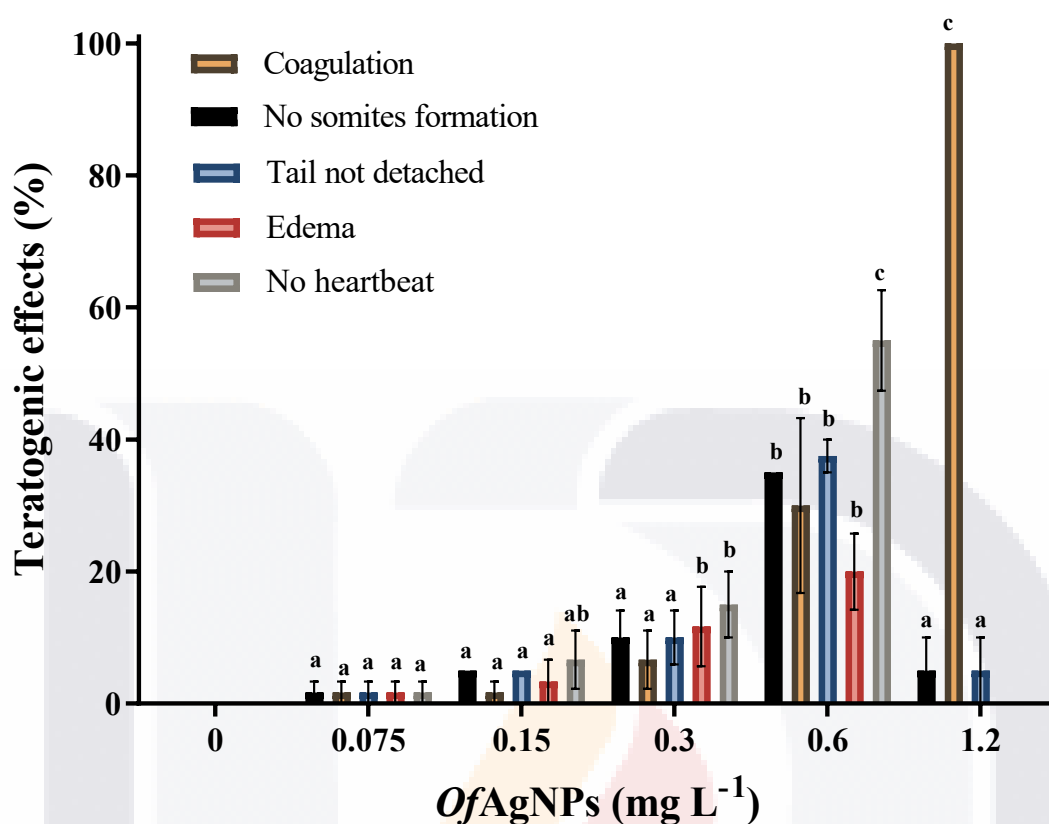


Figura 33. Efectos teratógenos de *OfAgNPs* en *D. rerio*. Los efectos incluyen coagulación, no formación de somites, mal desarrollo de aleta caudal, edema y ausencia de latido cardiaco. Se graficó el porcentaje promedio \pm el error estándar.

Evaluación de los efectos de *OfAgNP's* en *Arabidopsis thaliana*

En la evaluación de toxicidad en *A. thaliana* se encontró que la exposición de las semillas a las *OfAgNPs* no afecta la germinación. Las semillas de *A. thaliana* expuestas a diferentes concentraciones de *OfAgNPs*, mostraron un porcentaje de germinación cercano al 100 %, similar a las del grupo control. Esto ya ha sido reportado con otras *AgNPs* funcionalizadas con citrato de sodio en semillas de *A. thaliana* (Geisler-Lee et al., 2013) y de *Phaseolus*

vulgaris, en las que sólo a partir de la concentración de 120 mg L⁻¹ se afectó la germinación (Verma et al., 2020). Posiblemente a concentraciones bajas, las *OfAgNPs* permiten el flujo de agua al interior de las semillas, necesario para la germinación, y ni las partículas ni los iones plata ingresan en cantidad suficiente para producir daño (Prazak et al., 2020).

En cuanto al crecimiento de la raíz, se observó una elongación de la raíz principal de las plántulas expuestas a 25 mg L⁻¹ *OfAgNPs* aproximadamente 50 % menor que las del control. También se apreciaron diferencias en la morfología entre la raíz de las plantas control y de las tratadas con *OfAgNPs*. En las del grupo control únicamente se observó raíz primaria, sin desarrollo de raíces secundarias; mientras que las tratadas con las *OfAgNPs*, presentaron raíces secundarias (Figura 34A). Al parecer, las *OfAgNPs* detienen el crecimiento apical, por lo que en compensación se desarrollan las raíces laterales, que le permiten a la plata absorber agua y nutrientes para crecer y desarrollarse (Geisler-Lee et al., 2014).

También se evaluó el contenido de clorofilas y carotenoides en las plántulas, ya que estos pigmentos son biomarcadores que muestran el estado fisiológico de una planta (Salachna et al., 2019). En cuanto a las clorofilas, se observó un contenido significativamente menor en las plántulas expuestas a *OfAgNPs* que en las del grupo control (Figura 34B). Estos resultados coinciden con lo reportado por Qian et al (2013) que trabajaron en el mismo intervalo de concentraciones de *AgNPs*. Posiblemente por el daño que las *NPs* son capaces de producir en las membranas del cloroplasto como resultado de la peroxidación lipídica por estrés oxidativo producido por el exceso de metal (Nair and Chung, 2014). Sin embargo, a las concentraciones de 50 y 100 mg L⁻¹ hubo un aumento en la concentración de clorofila a, aunque en ninguno de los casos alcanzó a ser similar a la encontrada en el control (Figura 34B). Esto probablemente debido al aporte de nitrógeno y magnesio, elementos asociados a la síntesis de clorofila, que pudieron ser proporcionados por las *OfAgNPs*, como se ha reportado en *Stevia rebaudiana* (Castro-González et al., 2019). Por su parte, la cantidad de

los carotenoides encontrada en todos los grupos expuestos a las *OfAgNPs* fue significativamente menor que el grupo control (Figura 34B).

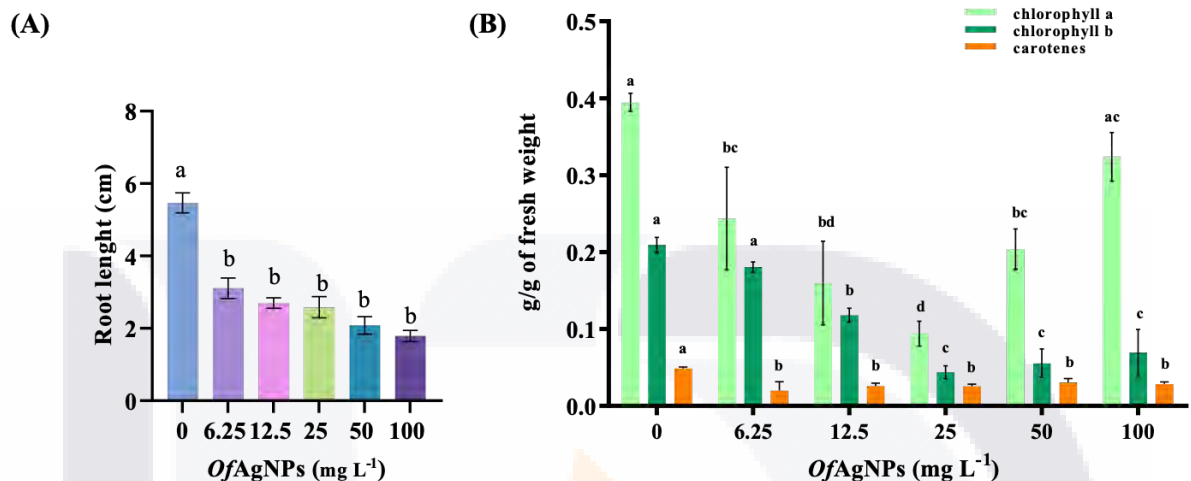


Figura 34. Crecimiento y contenido de pigmentos en *A. thaliana* expuesta a *OfAgNPs*. (A) Elongación de la raíz principal. (B) Contenido de clorofilas y carotenoides. Las barras representan el promedio ± el error estándar.

Evaluación de la actividad antibacteriana en cepas ATCC

Las *OfAgNPs* mostraron actividad contra *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus*, a las concentraciones de 0.25, 0.5 y 1 mg L⁻¹ (Figura 35). Las *OfAgNPs*, a concentraciones de 0.5 y 1 mg L⁻¹ mostraron una inhibición de *E. coli* de 11 U log a los 10 min de exposición, en tanto que con 0.25 mg L⁻¹, se logró la misma inhibición hasta los 60 min (Figura 35A). En otros trabajos se ha reportado la actividad de AgNPs contra *E. coli*, por ejemplo, las NPs obtenidas a partir de extractos de *Aloe vera* (Tippayawat et al., 2016). Con concentraciones de 0.5 y 1 mg L⁻¹ de *OfAgNPs* se observó una inhibición de *P. aeruginosa* de 9 U log a los 10 min de exposición, mientras que a la concentración de 0.25 mg L⁻¹ se alcanzó la misma inhibición hasta los 45 min (Figura 35B). La actividad contra *P. aeruginosa* de AgNPs

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

biosintetizadas a partir de los extractos de *Trianthema decandro* (Geethalakshmi and Sarada, 2013) y *Tribulus terrestris* (Gopinath et al., 2012) ya se ha demostrado. En el caso de *S. aureus*, se presentó una inhibición de 11 U log con 1 mg L⁻¹ de las *OfAgNPs* a los 5 min de exposición, mientras que a las concentraciones de 0.25 y 0.5 mg L⁻¹ se observó la misma inhibición a los 30 min (Figura 35C). Las *AgNPs* biosintetizadas a partir de *Azadirachta indica* (Ahmed et al., 2016), *Solanum indicum* (Sengottaiyan et al., 2016) y *Hibiscus rosa-sinensis* (Nayak et al., 2015) también mostraron actividad contra *S. aureus*. En *E. coli* y *P. aeruginosa* se observó una mayor sensibilidad a la actividad de las *OfAgNPs* que *S. aureus*, a la concentración de 0.5 mg L⁻¹ (Figura 35). Lo que coincide con los resultados reportados por Khalil et al. (2014), que encontraron que *E. coli* es más sensible que *S. aureus* a la actividad de *AgNPs* biosintetizadas a partir del extracto de la hoja del olivo. Esto puede deberse a que *E. coli* y *P. aeruginosa* son bacterias gramnegativas, y que *S. aureus* es grampositiva (Rajeshkumar and Bharath, 2017), y existen diferencias en la estructura de la pared celular, que podría hacer la diferencia en el acceso de las *AgNPs* a las células. La pared celular de las bacterias gramnegativas está formada por una delgada capa de peptidoglicano y una membrana de lipopolisacáridos, mientras que la pared de las grampositivas es una capa gruesa de peptidoglucano (Loo et al., 2018). Sin embargo, los mecanismos de acción de las *AgNPs* podrían ser similares en ambos tipos de bacterias, incluyendo daño directo o mediante la generación de radicales libres, en la membrana citoplasmática, la pared celular, en el interior de la célula, en mitocondrias, vacuolas, ribosomas, ADN, lípidos e inactivación de proteínas (Loo et al., 2018). Li (2010), observaron en *E. coli* expuesta a *AgNPs* presenta una disminución de azúcares reductores, que podría inducir la inactivación de la cadena de transporte de electrones afectando la permeabilidad de las membranas bacterianas. En *P. aeruginosa* se evidenció que las *AgNPs* provocan daño tanto en la pared celular como en la membrana celular, y como consecuencia, pérdida de componentes celulares y generación de estrés oxidativo, que no puede ser neutralizado ya que las enzimas antioxidantes (catalasa, superperóxido dismutasa, peroxidasa) son inactivadas por las *NPs* (Liao et al., 2019).

Además del tipo de bacteria, la actividad antibacteriana depende del pH, temperatura y el protocolo de biosíntesis (Rajeshkumar and Bharath, 2017).

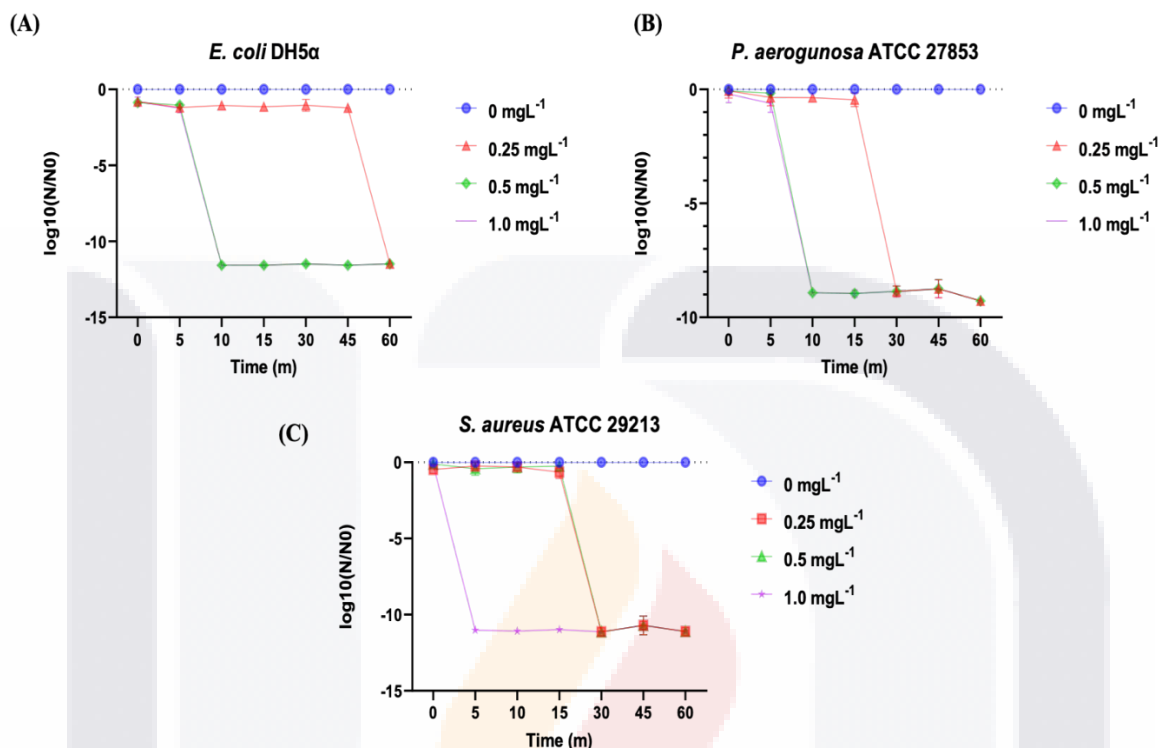


Figura 35. Inactivación logarítmica de microorganismos a diferentes concentraciones de *OfAgNPs*. (A) *E. coli* DH5α, (B) *P. aeruginosa* ATCC 27853, y (C) *S. aureus* ATCC 29213. Cada punto en las gráficas representa el promedio ± desviación estándar. Time (m).

Evaluación de la actividad antifúngica de las *OfAgNPs*

Las *OfAgNPs* mostraron actividad antifúngica al inhibir la expansión radial de los hongos *Colletotrichum sp*, *Cladosporium sp* y *Aspergillus sp* (Tabla 9, Figura 36). Se observó un 100% de inhibición con una concentración mínima de 0.25 mg L⁻¹ de las *OfAgNPs* para *Colletotrichum sp* y *Cladosporium sp*, y de 0.5 mg L⁻¹ para *Aspergillus sp*. Los resultados

indican que *Aspergillus* sp es ligeramente más resistente que los otros hongos evaluados. La actividad antifúngica se ha relacionado con la acción de los iones Ag^+ que pueden unirse a las proteínas o enzimas del micelio, dañando estructuras celulares, generando especies reactivas de oxígeno o interfiriendo en las rutas celulares de los hongos (Pittol et al., 2017). También se ha observado que las AgNPs aumentan la permeabilidad de la membrana celular provocando la fuga de proteínas y azúcares, y que inhiben la respiración celular, lo que detiene el crecimiento del micelio y la esporulación (Hirpara & Gajera, 2019; Mohammadi et al, 2019).

Tabla 9. Porcentaje de inhibición observado en tres especies de hongos por acción de distintas concentraciones de *OfAgNPs*

Especie de hongo	% Inhibición a diferente concentración de <i>OfAgNPs</i>		
	0.25 mg L ⁻¹	0.5 mg L ⁻¹	1 mg L ⁻¹
<i>Colletotrichum sp</i>	100	100	100
<i>Aspergillus sp.</i>	71.43	100	100
<i>Cladosporium sp.</i>	100	100	100

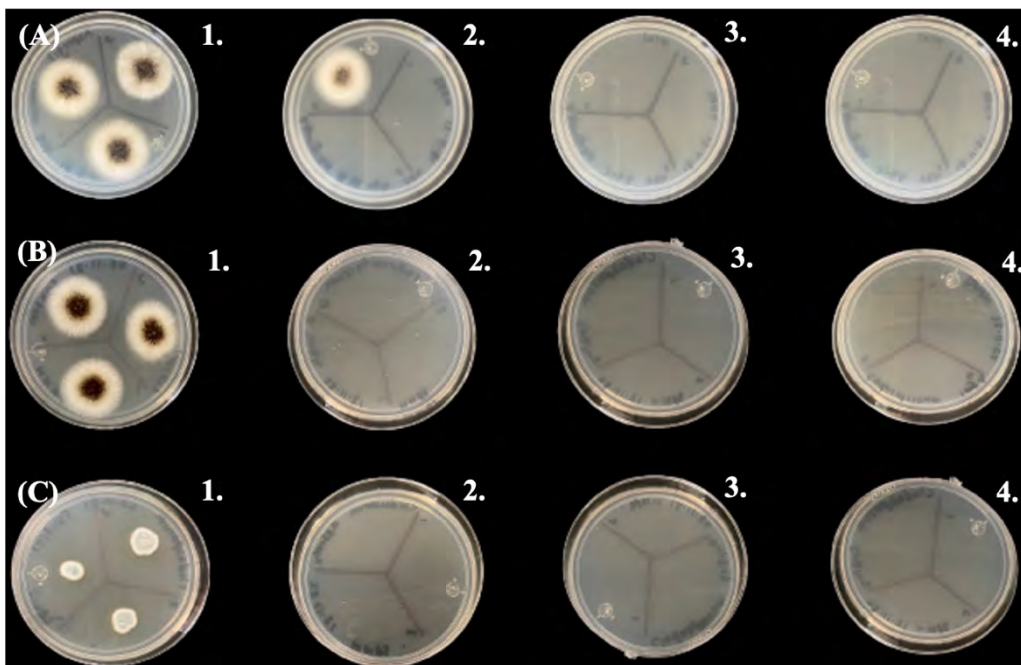


Figura 36. Inhibición antifúngica a las 24 h de *OfAgNPs*. A) *Aspergillus* sp., B) *Colletotrichum* sp., 3) *Cladosporium* sp. 1. 0 mg/L^{-1} , 2. 0.25 mg/L^{-1} , 3. 0.5 mg/L^{-1} , 4. 1.0 mg/L^{-1}

IX. Conclusiones

Mediante PCR se amplificó un fragmento del gen de la Heveina de Sorgo el cual tiene actividad antimicrobiana (SbHevein-like). Se obtuvo la proteína recombinante de SbHevein-like mediante *E. coli* y se analizó su funcionalidad antibacteriana demostrándose que a concentraciones inferiores de 14.86 µg/ml de PTS no tienen actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aureginosa*.

Se identificaron PAMs mediante técnicas bioinformáticas dentro de las secuencias proteicas de las enzimas Glioxalidas de *Sorghum bicolor*, se seleccionaron aquellos que tuvieran una predicción de actividad antimicrobiana moderada o alta, y se sintetizaron dos genes 1) GSUNIÓN, que es la unión de los PAMs que tenían una mayor predicción de tener actividad antimicrobiana y 2) GSLINK, que son los PAMs separados por unos linker que favorecen a la flexibilidad y actividad individual de los péptidos. Ambos genes están disponibles para futuras investigaciones.

Se sintetizó AgNPs a partir de extractos acuosos de la cáscara de tuna; las cuales fueron designadas como *OfAgNPs*. Las *OfAgNPs* tienen una morfología esférica, carga negativa y son relativamente estables. A una concentración de 0.5 mg/ml por 0.5 h mostraron inhibición de crecimiento en bacterias coliformes *E. coli* var 1, *E. aerogenes* var 1, *C. freudi* var 2 y de una *E. coli* atípica y de microorganismos mesofílicos aerobios provenientes de agua residual tratada. Las *OfAgNPs* mostraron efectos toxicológicos en *D. rerio* y *A. thaliana* sólo a concentraciones elevadas. Sin embargo, se observó que a concentraciones por debajo de la CL_{50} calculada para *D. rerio*, tienen actividad antibacteriana y antifúngica, lo que demuestran que pueden ser utilizadas en la eliminación de bacterias y hongos de interés clínico, de una manera segura para el ambiente.

x. Bibliografía

1. Abbasi, E., Aval, S. F., Akbarzadeh, A., Milani, M., Nasrabadi, H. T., Joo, S. W., & Pashaei-Asl, R. (2014). Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale research letters*, 9(1), 1-10.
2. Aboye, T. L., Strömstedt, A. A., Gunasekera, S., Bruhn, J. G., El-Seedi, H., Rosengren, K. J., & Göransson, U. (2015). A Cactus-Derived Toxin-Like Cystine Knot Peptide with Selective Antimicrobial Activity. *ChemBioChem*, 16(7), 1068-1077.
3. Ahmed, A., Siman-Tov, G., Hall, G., Bhalla, N., & Narayanan, A. (2019). Human antimicrobial peptides as therapeutics for viral infections. *Viruses*, 11(8), 704.
4. Ahmed, S., Saifullah, Ahmad, M., Swami, B. L., & Ikram, S. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract. *Journal of radiation research and applied sciences*, 9(1), 1-7.
5. Almeida, M. S., Cabral, K. M., Kurtenbach, E., Almeida, F. C., & Valente, A. P. (2002). Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. *Journal of molecular biology*, 315(4), 749-757.
6. Andrade Guel, M. L., López López, L. I., & Sáenz Galindo, A. (2012). Nanotubos de carbono: funcionalización y aplicaciones biológicas. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 43(3), 9-18.
7. Archer, B. L. (1976). Hevamine: a crystalline basic protein from *Hevea brasiliensis* latex. *Phytochemistry*, 15(2), 297-300.
8. Arole, V. M., & Munde, S. V. (2014). Fabrication of nanomaterials by top-down and bottom-up approaches-an overview. *J. Mater. Sci*, 1, 89-93.
9. Awad, M. A., Hendi, A. A., Ortashi, K. M., Elradi, D. F., Eisa, N. E., Al-lahieb, L. A., ... & Awad, A. A. (2014). Silver nanoparticles biogenic synthesized using an orange peel extract and their use as an anti-bacterial agent. *International journal of physical sciences*, 9(3), 34-40.
10. Ayuk, E. L., Ugwu, M. O., & Aronimo, S. B. (2017). A review on synthetic methods of nanostructured materials. *Chemistry Research Journal*, 2(5), 97-123.
11. Azarbani, F., & Shiravand, S. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles by *Ferulago macrocarpa* flowers extract and their antibacterial, antifungal and toxic effects. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 13(1), 41-49.
12. Baghbeheshti, S., Hadadian, S., Eidi, A., Pishkar, L., & Rahimi, H. (2021). Effect of flexible and rigid linkers on biological activity of recombinant tetramer variants of S3 antimicrobial peptide. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(1), 457-462.
13. Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543-1575
14. Baig, N., Kammakakam, I., & Falath, W. (2021). Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials Advances*, 2(6), 1821-1871.
15. Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., ... & Noble, W. S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids research*, 37(suppl_2), W202-W208.
16. Baker, C., Pradhan, A., Pakstis, L., Pochan, D. J., & Shah, S. I. (2005). Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 5(2), 244-249.

17. Ballard, E., Yucel, R., Melchers, W. J., Brown, A. J., Verweij, P. E., & Warris, A. (2020). Antifungal activity of antimicrobial peptides and proteins against *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Fungi*, 6(2), 65.
18. Barbosa Pelegrini, P., R. Perseghini del Sarto, O. Nascimento Silva, O.L. Franco & M.F. Grossi-de-Sa (2011) Antibacterial peptides from plants: What they are and how they probably work. *Biochem. Res. Int.* 2011:1-9.
19. Bathia, S. (2016). *Natural Polymer Drug Delivery Systems: Nanoparticles, Plants, and Algae*. Gurgaon, India: Springer. doi, 10, 978-3.
20. Becerril, G. A., & Valdivia, C. B. P. (2006). Alteraciones fisiológicas provocadas por sequía en nopal (*Opuntia ficus-indica*). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29(3), 231-237.
21. Beintema, J.J. Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. *FEBS Lett.* 1994, 350, 159–163.
22. Bergström, C. A., & Larsson, P. (2018). Computational prediction of drug solubility in water-based systems: qualitative and quantitative approaches used in the current drug discovery and development setting. *International journal of pharmaceutics*, 540(1-2), 185-193.
23. Bernardo-Mazariegos, E., Valdez-Salas, B., González-Mendoza, D., Abdelmoteleb, A., Camacho, O. T., Duran, C. C., & Gutiérrez-Miceli, F. (2019). Silver nanoparticles from *Justicia spicigera* and their antimicrobial potentialities in the biocontrol of foodborne bacteria and phytopathogenic fungi. *Revista Argentina de microbiología*, 51(2), 103-109
24. Berne, B. J., & Pecora, R. (2000). *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. Courier Corporation.
25. Berthelot, K., Peruch, F., & Lecomte, S. (2016). Highlights on *Hevea brasiliensis* (pro) hevein proteins. *Biochimie*, 127, 258-270.
26. Bhakya, S., Muthukrishnan, S., Sukumaran, M., & Muthukumar, M. (2016). Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their antioxidant and antibacterial activity. *Applied Nanoscience*, 6(5), 755-766.
27. Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7(6), 1513-1523.
28. Boholm, M., & Arvidsson, R. (2016). A definition framework for the terms nanomaterial and nanoparticle. *NanoEthics*, 10(1), 25-40.
29. Bucki, R., Leszczyńska, K., Namiot, A., & Sokołowski, W. (2010). Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 58(1), 15-25.
30. Buda De Cesare, G., Cristy, S. A., Garsin, D. A., & Lorenz, M. C. (2020). Antimicrobial peptides: A new frontier in antifungal therapy. *Mbio*, 11(6), e02123-20.
31. Caruso, C., Caporale, C., Chilosi, G., Vacca, F., Bertini, L., Magro, P., ... & Buonocore, V. (1996). Structural and antifungal properties of a pathogenesis-related protein from wheat kernel. *Journal of protein chemistry*, 15(1), 35-44.
32. Castro-González, C. G., Sánchez-Segura, L., Gómez-Merino, F. C., & Bello-Bello, J. J. (2019). Exposure of stevia (*Stevia rebaudiana* B.) to silver nanoparticles in vitro: transport and accumulation. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
33. Cerezal, P., & Duarte, G. (2004). Influencia sensorial de aditivos químicos en tunas (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller) peladas en almíbar conservada por métodos combinados. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 6, 102-119.

34. Chhatre, A., Solasa, P., Sakle, S., Thaokar, R., & Mehra, A. (2012). Color and surface plasmón effects in nanoparticle systems: Case of silver nanoparticles prepared by microemulsion route. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 404, 83-92.
35. Choleva, T. G., Tsogas, G. Z., & Giokas, D. L. (2019). Determination of silver nanoparticles by atomic absorption spectrometry after dispersive suspended microextraction followed by oxidative dissolution back-extraction. *Talanta*, 196, 255-261
36. Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome research*, 14(6), 1188-1190.
37. Croy, S. R., & Kwon, G. S. (2006). Polymeric micelles for drug delivery. *Current pharmaceutical design*, 12(36), 4669-4684.
38. Davin-Regli, A. (2015). *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in microbiology*, 6, 392.
39. De Brevern, A. G., Bornot, A., Craveur, P., Etchebest, C., & Gelly, J. C. (2012). PredyFlexy: flexibility and local structure prediction from sequence. *Nucleic acids research*, 40(W1), W317-W322
40. De Leersnyder, I., De Gelder, L., Van Driessche, I., & Vermeir, P. (2019). Revealing the importance of aging, environment, size and stabilization mechanisms on the stability of metal nanoparticles: A case study for silver nanoparticles in a minimally defined and complex undefined bacterial growth medium. *Nanomaterials*, 9(12), 1684.
41. De Souza, T. A. J., Souza, L. R. R., & Franchi, L. P. (2019). Silver nanoparticles: An integrated view of green synthesis methods, transformation in the environment, and toxicity. *Ecotoxicology and environmental safety*, 171, 691-700.
42. Delgado, Á. V., González-Caballero, F., Hunter, R. J., Koopal, L. K., & Lyklema, J. (2007). Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *Journal of colloid and interface science*, 309(2), 194-224.
43. Dolgaev, S. I., Simakin, A. V., Voronov, V. V., Shafeev, G. A., & Bozon-Verduraz, F. (2002). Nanoparticles produced by laser ablation of solids in liquid environment. *Applied surface science*, 186(1-4), 546-551.
44. Doran, T. I. (1999). The role of *Citrobacter* in clinical disease of children. *Clinical infectious diseases*, 28(2), 384-394.
45. Duncan, R., & Izzo, L. (2005). Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Advanced drug delivery reviews*, 57(15), 2215-2237.
46. El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., ... & Finn, R. D. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic acids research*, 47(D1), D427-D432.
47. El-Mostafa, K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbij, M. H. S., ... & Cherkaoui-Malki, M. (2014). Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules*, 19(9), 14879-14901.
48. Piñon-Segundo, E., Mendoza-Muñoz, N., & Quintanar-Guerrero, D. (2019). Nanoparticles as dental drug-delivery systems. In *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry* (pp. 567-593). Elsevier.
49. Elnagdy, S., & AlKhazindar, M. (2020). The potential of antimicrobial peptides as an antiviral therapy against COVID-19. *ACS pharmacology & translational science*, 3(4), 780-782.
50. Escobar Falconí, V. E. (2015). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por espectroscopia de infrarrojos (FT-IR), UV-Vis, absorción atómica de llama (FAAS) y microscopía de barrido electrónico (SEM)* (Bachelor's thesis, PUCE).

51. Foss Hansen, S., Larsen, B. H., Olsen, S. I., & Baun, A. (2007). Categorization framework to aid hazard identification of nanomaterials. *Nanotoxicology*, 1(3), 243-250.
52. Gaikwad, S., Ingle, A., Gade, A., Rai, M., Falanga, A., Incoronato, N., ... & Galdiero, M. (2013). Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. *International journal of nanomedicine*, 8, 4303.
53. Garcidueñas-Piña, C., Medina-Ramírez, I. E., Guzmán, P., Rico-Martínez, R., Morales-Domínguez, J. F., & Rubio-Franchini, I. (2016). Evaluation of the antimicrobial activity of nanostructured materials of titanium dioxide doped with silver and/or copper and their effects on *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Photoenergy*, 2016.
54. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The proteomics protocols handbook*, 571-607.
55. Geethalakshmi, R., & Sarada, D. V. L. (2013). Characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles synthesized using saponin isolated from *Trianthema decandra* L. *Industrial Crops and Products*, 51, 107-115.
56. Geisler-Lee, J., Brooks, M., Gerfen, J. R., Wang, Q., Fotis, C., Sparer, A., ... & Geisler, M. (2014). Reproductive toxicity and life history study of silver nanoparticle effect, uptake and transport in *Arabidopsis thaliana*. *Nanomaterials*, 4(2), 301-318.
57. Ghosh, A. (2017). Genome-wide identification of glyoxalase genes in *Medicago truncatula* and their expression profiling in response to various developmental and environmental stimuli. *Frontiers in plant science*, 8, 836.
58. Ghosh, A., & Islam, T. (2016). Genome-wide analysis and expression profiling of glyoxalase gene families in soybean (*Glycine max*) indicate their development and abiotic stress specific response. *BMC plant biology*, 16(1), 87.
59. Ghosh, B., & Biswas, S. (2021). Polymeric micelles in cancer therapy: State of the art. *Journal of Controlled Release*, 332, 127-147.
60. Gidrol, X.; Chrestin, H.; Tan, H.L.; Kush, A. Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 9278–9283.
61. Gillies, E. R., & Frechet, J. M. (2005). Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug discovery today*, 10(1), 35-43.
62. Giovati, L., Ciociola, T., Magliani, W., & Conti, S. (2018). Antimicrobial peptides with antiprotozoal activity: current state and future perspectives. *Future Medicinal Chemistry*, 10(22), 2569-2572.
63. Goldstein J, Newbury DE, Joy DC, Lyman CE, Echlin P, Lifshin E, Sawyer L, Michael JR (2003) Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. Springer Third edition XIX, pp 689
64. Gómez-Garzón, M. (2018). Nanomateriales, nanopartículas y síntesis verde. *Revista Repertorio de Medicina y Cirugía*, 27(2).
65. Gopinath, V., & Velusamy, P. (2013). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus* sp. GP-23 and evaluation of their antifungal activity towards *Fusarium oxysporum*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 106, 170-174.
66. Gopinath, V., MubarakAli, D., Priyadarshini, S., Priyadharshini, N. M., Thajuddin, N., & Velusamy, P. (2012). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Tribulus terrestris* and its antimicrobial activity: a novel biological approach. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, 96, 69-74.

67. Graf, M., Mardirossian, M., Nguyen, F., Seefeldt, A. C., Guichard, G., Scocchi, M., ... & Wilson, D. N. (2017). Proline-rich antimicrobial peptides targeting protein synthesis. *Natural product reports*, 34(7), 702-711
68. Gräwe, A., & Stein, V. (2021). Linker engineering in the context of synthetic protein switches and sensors. *Trends in Biotechnology*, 39(7), 731-744.
69. Greco, I., Molchanova, N., Holmedal, E., Jenssen, H., Hummel, B. D., Watts, J. L., ... & Svenson, J. (2020). Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. *Scientific reports*, 10(1), 1-13.
70. Guruprasad, K., Reddy, B. B., & Pandit, M. W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering, Design and Selection*, 4(2), 155-161.
71. Hebditch, M., Carballo-Amador, M. A., Charonis, S., Curtis, R., & Warwicker, J. (2017). Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence. *Bioinformatics*, 33(19), 3098-3100.
72. Hebeish, A. A., El-Rafie, M. H., Abdel-Mohdy, F. A., Abdel-Halim, E. S., & Emam, H. E. (2010). Carboxymethyl cellulose for green synthesis and stabilization of silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 933-941.
73. Hilpert, K., Volkmer-Engert, R., Walter, T., & Hancock, R. E. (2005). High-throughput generation of small antibacterial peptides with improved activity. *Nature biotechnology*, 23(8), 1008-1012.
74. Hirpara, D.G. & Gajera, H.P. (2019). Green synthesis and antifungal mechanism of silver nanoparticles derived from chitin-induced exometabolites of *Trichoderma interfusant*. *Applied Organometallic Chemistry*. 34(3): e5407.
75. Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., & Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W585-W587.
76. Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Frontiers in microbiology*, 2559.
77. Huang, T., & Xu, X. H. N. (2010). Synthesis and characterization of tunable rainbow colored colloidal silver nanoparticles using single-nanoparticle plasmonic microscopy and spectroscopy. *Journal of materials chemistry*, 20(44), 9867-9876.
78. Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638-2650.
79. Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V., & Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in pharmaceutical sciences*, 9(6), 385.
80. Jini, D., & Sharmila, S. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles from *Allium cepa* and its in vitro antidiabetic activity. *Materials Today: Proceedings*, 22, 432-438.
81. Juretic, D., Vukicevic, D., Ilic, N., Antcheva, N., & Tossi, A. (2009). Computational design of highly selective antimicrobial peptides. *Journal of chemical information and modeling*, 49(12), 2873-2
82. Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 123-140.

83. Kaur, C., Tripathi, A. K., Nutan, K. K., Sharma, S., Ghosh, A., Tripathi, J. K., ... & Sopory, S. K. (2017). A nuclear-localized rice glyoxalase I enzyme, OsGLYI-8, functions in the detoxification of methylglyoxal in the nucleus. *The Plant Journal*, 89(3), 565-576.
84. Khalil, M. M., Ismail, E. H., El-Baghdady, K. Z., & Mohamed, D. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 7(6), 1131-1139.
85. Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian journal of chemistry*, 12(7), 908-931.
86. Khatami, M., Sharifi, I., Nobre, M. A., Zafarnia, N., & Aflatoonian, M. R. (2018). Waste-grass-mediated green synthesis of silver nanoparticles and evaluation of their anticancer, antifungal and antibacterial activity. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 11(2), 125-134.
87. Kiba, A., Saitoh, H., Nishihara, M., Omiya, K., & Yamamura, S. (2003). C-terminal domain of a hevein-like protein from *Wasabia japonica* has potent antimicrobial activity. *Plant and Cell Physiology*, 44(3), 296-303.
88. Kim, S. W., Jung, J. H., Lamsal, K., Kim, Y. S., Min, J. S., & Lee, Y. S. (2012). Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. *Mycobiology*, 40(1), 53-58.
89. Kobbi, S., Balti, R., Bougatef, A., Le Flem, G., Firdaous, L., Bigan, M., ... & Nedjar, N. (2015). Antibacterial activity of novel peptides isolated from protein hydrolysates of RuBisCO purified from green juice alfalfa. *Journal of Functional Foods*, 18, 703-713.
90. Kumar, A., & Dixit, C. K. (2017). Methods for characterization of nanoparticles. In *Advances in nanomedicine for the delivery of therapeutic nucleic acids* (pp. 43-58). Woodhead Publishing.
91. Lamiable, A., Thévenet, P., Rey, J., Vavrusa, M., Derreumaux, P., & Tufféry, P. (2016). PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic acids research*, 44(W1), W449-W454.
92. Lata, S., Sharma, B. K., & Raghava, G. P. S. (2007). Analysis and prediction of antibacterial peptides. *BMC bioinformatics*, 8(1), 263.
93. Ledezma, A., Romero, J., Hernández, M., Moggio, I., Arias, E., Padrón, G., ... & Torres, S. (2014). Síntesis biomimética de nanopartículas de plata utilizando extracto acuoso de nopal (*Opuntia* sp.) y su electrohilado polimérico. *Superficies y vacío*, 27(4), 133-140.
94. Lee, O. S., Lee, B., Park, N., Koo, J. C., Kim, Y. H., Karigar, C., ... & Yun, D. J. (2003). Pn-AMPs, the hevein-like proteins from *Pharbitis nil* confers disease resistance against phytopathogenic fungi in tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Phytochemistry*, 62(7), 1073-1079.
95. Lee, S. H., & Jun, B. H. (2019). Silver Nanoparticles: Synthesis and application for nanomedicine. *International journal of molecular sciences*, 20(4), 865.
96. Lei, J., Sun, L., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., ... & He, Q. (2019). The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American journal of translational research*, 11(7), 3919.
97. Lekamge, S., Miranda, A. F., Abraham, A., Li, V., Shukla, R., Bansal, V., & Nuggeoda, D. (2018). The toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) to three freshwater invertebrates with different life strategies: *Hydra vulgaris*, *Daphnia carinata*, and *Paratya australiensis*. *Frontiers in Environmental Science*, 6, 152.
98. Li, J., Hu, S., Jian, W., Xie, C., & Yang, X. (2021). Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. *Botanical Studies*, 62(1), 1-15.

99. Li, J., Koh, J. J., Liu, S., Lakshminarayanan, R., Verma, C. S., & Beuerman, R. W. (2017). Membrane active antimicrobial peptides: translating mechanistic insights to design. *Frontiers in neuroscience*, 11, 73.
100. Li, T., Cheng, X., Wang, Y., Yin, X., Li, Z., Liu, R., ... & Xu, Y. (2019). Genome-wide analysis of glyoxalase-like gene families in grape (*Vitis vinifera* L.) and their expression profiling in response to downy mildew infection. *BMC genomics*, 20(1), 1-13.
101. Li, W. R., Xie, X. B., Shi, Q. S., Zeng, H. Y., Ou-Yang, Y. S., & Chen, Y. B. (2010). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(4), 1115-1122.
102. Li, Y. (2011). Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. *Protein expression and purification*, 80(2), 260-267.
103. Liao, S., Zhang, Y., Pan, X., Zhu, F., Jiang, C., Liu, Q., ... & Chen, L. (2019). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of nanomedicine*, 14, 1469.
104. Lira, F., Perez, P. S., Baranauskas, J. A., & Nozawa, S. R. (2013). Prediction of antimicrobial activity of synthetic peptides by a decision tree model. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(10), 3156-3159.
105. Liu, W., Xie, Y., Ma, J., Luo, X., Nie, P., Zuo, Z., ... & Xue, Y. (2015). IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics*, 31(20), 3359-3361.
106. Liu, Y., Shi, D., Wang, J., Chen, X., Zhou, M., Xi, X., ... & Wang, L. (2020). A novel amphibian antimicrobial peptide, phylloseptin-PV1, exhibits effective anti-staphylococcal activity without inducing either hepatic or renal toxicity in mice. *Frontiers in microbiology*, 2713.
107. Loo, Y. Y., Chieng, B. W., Nishibuchi, M., & Radu, S. (2012). Synthesis of silver nanoparticles by using tea leaf extract from *Camellia sinensis*. *International journal of nanomedicine*, 7, 4263.
108. Loo, Y. Y., Rukayadi, Y., Nor-Khaizura, M. A. R., Kuan, C. H., Chieng, B. W., Nishibuchi, M., & Radu, S. (2018). In vitro antimicrobial activity of green synthesized silver nanoparticles against selected gram-negative foodborne pathogens. *Frontiers in microbiology*, 9, 1555.
109. Ludvigsen, S., & Poulsen, F. M. (1992). Three-dimensional structure in solution of barwin, a protein from barley seed. *Biochemistry*, 31(37), 8783-8789.
110. Lund, O., Nielsen, M., Lundegaard, C., & Worning, P. (2002). X3M a computer program to extract 3D models. In *Abstract at the CASP5 conference A* (Vol. 102, p. 2002).
111. Magdeldin, S., Yoshida, Y., Li, H., Maeda, Y., Yokoyama, M., Enany, S., ... & Yamamoto, T. (2012). Murine colon proteome and characterization of the protein pathways. *BioData mining*, 5(1), 1-14.
112. Malam, Y., Loizidou, M., & Seifalian, A. M. (2009). Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in pharmacological sciences*, 30(11), 592-599.
113. Marr, A. K., Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current opinion in pharmacology*, 6(5), 468-472.
114. Mason, A. J., Bertani, P., Moulay, G., Marquette, A., Perrone, B., Drake, A. F., ... & Bechinger, B. (2007). Membrane interaction of chrysopsin-1, a histidine-rich antimicrobial peptide from red sea bream. *Biochemistry*, 46(51), 15175-15187.
115. MEXICAN OFFICIAL STANDARD NOM-003-ECOL-1997. Federation's Official Journal. México City, México. January 14th, 1998.
116. Mohammadi, M., Shahisaraee, S. A., Tavajjohi, A., Pournoori, N., Muhammadnejad, S., Mohammadi, S. R., ... & Delavari H, H. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles using *Zingiber*

- officinale* and *Thymus vulgaris* extracts: characterisation, cell cytotoxicity, and its antifungal activity against *Candida albicans* in comparison to fluconazole. *IET nanobiotechnology*, 13(2), 114-119.
117. Mohanta, D., Patnaik, S., Sood, S., & Das, N. (2019). Carbon nanotubes: Evaluation of toxicity at biointerfaces. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 9(5), 293-300.
118. Mor, A. (2009). Multifunctional host defense peptides: antiparasitic activities. *The FEBS journal*, 276(22), 6474-6482.
119. Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., & Thanh, N. T. (2018). Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*, 10(27), 12871-12934.
120. Mourya, V. K., Inamdar, N., Nawale, R. B., & Kulthe, S. S. (2011). Polymeric micelles: general considerations and their applications. *Indian J Pharm Educ Res*, 45(2), 128-38.
121. Mulfinger, L., Solomon, S. D., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A. V., Rutkowsky, S. A., & Boritz, C. (2007). Synthesis and study of silver nanoparticles. *Journal of chemical education*, 84(2), 322.
122. Murata, M., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., & Abe, F. (2013). Identification of milk proteins enhancing the antimicrobial activity of lactoferrin and lactoferricin. *Journal of dairy science*, 96(8), 4891-4898.
123. Mustafiz A. Kumar A.S., Pareek A. Sopory S.K. (2011). Genome-wide analysis of rice and Arabidopsis identifies two glyoxalase genes that are highly expressed in abiotic stresses. *Functional & Integrative Genomics Vol 11(2)* p.p. 293-305.
124. Ahmad, N. and Sharma, S., "Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Extracts of *Ananas comosus*," *Green and Sustainable Chemistry*, Vol. 2 No. 4, 2012, pp. 141-147.
125. Nair, P. M. G., & Chung, I. M. (2014). Assessment of silver nanoparticle-induced physiological and molecular changes in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(14), 8858-8869.
126. Narayanan, K. B., & Sakthivel, N. (2010). Phytosynthesis of gold nanoparticles using leaf extract of *Coleus amboinicus* Lour. *Materials Characterization*, 61(11), 1232-1238.
127. Nawrot, R., Barylski, J., Nowicki, G., Broniarczyk, J., Buchwald, W., & Goździcka-Józefiak, A. (2014). Plant antimicrobial peptides. *Folia microbiologica*, 59(3), 181-196.
128. Nayak, D., Ashe, S., Rauta, P. R., & Nayak, B. (2015). Biosynthesis, characterisation and antimicrobial activity of silver nanoparticles using *Hibiscus rosa-sinensis* petals extracts. *IET nanobiotechnology*, 9(5), 288-293.
129. Nomoev, A. V., & Bardakhanov, S. P. (2012). Synthesis and structure of Ag-Si nanoparticles obtained by the electron-beam evaporation/condensation method. *Technical Physics Letters*, 38(4), 375-378.
130. Notredame, C., Higgins, D. G., & Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of molecular biology*, 302(1), 205-217.
131. Odintsova, T., Shcherbakova, L., Slezina, M., Pasechnik, T., Kartabaeva, B., Istomina, E., & Dzhavakhiya, V. (2020). Hevein-Like Antimicrobial Peptides Wamps: Structure-Function Relationship in Antifungal Activity and Sensitization of Plant Pathogenic Fungi to Tebuconazole by WAMP-2-Derived Peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 7912.
132. Oecd, T. N. (2013). 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section, 2*, 1-22.
133. Oldenburg, S. J. (2014). Silver nanoparticles: properties and applications. *Sigma-Aldrich Co., nd*.

134. Osorio, D., Rondón-Villarrea, P., & Torres, R. (2015). Peptides: a package for data mining of antimicrobial peptides. *R Journal*, 7(1).
135. Ottoni, C. A., Neto, M. L., Léo, P., Ortolan, B. D., Barbieri, E., & De Souza, A. O. (2020). Environmental impact of biogenic silver nanoparticles in soil and aquatic organisms. *Chemosphere*, 239, 124698.
136. Pal, A., Shah, S., & Devi, S. (2009). Microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using ethanol as a reducing agent. *Materials Chemistry and Physics*, 114(2-3), 530-532.
137. Panahi, Y., Farshbaf, M., Mohammadhosseini, M., Mirahadi, M., Khalilov, R., Saghfi, S., & Akbarzadeh, A. (2017). Recent advances on liposomal nanoparticles: synthesis, characterization and biomedical applications. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 45(4), 788-799.
138. Parijs, J. Van, Broekaert, W. F., Goldstein, I. J., Peumans, W. J., Parijs, J. Van, Broekaert, W. F., ... Peumans, W. J. (2016). Linked references are available on JSTOR for this article : *Planta Hevein : an antifungal protein from rubber-tree (Hevea brasiliensis) latex*. 183(2), 258–264.
139. Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R., & Lan, C. Q. (2008). Novel alternatives to antibiotics : bacteriophages , bacterial cell wall hydrolases , and antimicrobial peptides. 104, 1–13.
140. Park, Y. K., & Hahm, K. S. (2005). Antimicrobial peptides (AMPs): peptide structure and mode of action. *BMB Reports*, 38(5), 507-516.
141. Pazos-Ortiz, E., Roque-Ruiz, J. H., Hinojos-Márquez, E. A., López-Esparza, J., Donohué-Cornejo, A., Cuevas-González, J. C., ... & Reyes-López, S. Y. (2017). Dose-dependent antimicrobial activity of silver nanoparticles on polycaprolactone fibers against gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of Nanomaterials*, 2017
142. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605-1612.
143. Pinzaru, I., Coricovac, D., Dehelean, C., Moacă, E. A., Mioc, M., Baderca, F., ... & Tsatsakis, A. M. (2018). Stable PEG-coated silver nanoparticles—A comprehensive toxicological profile. *Food and Chemical Toxicology*, 111, 546-556.
144. Pirtskhalava, M., Gabrielian, A., Cruz, P., Griggs, H. L., Squires, R. B., Hurt, D. E., ... & Tartakovsky, M. (2016). DBAASP v. 2: an enhanced database of structure and antimicrobial/cytotoxic activity of natural and synthetic peptides. *Nucleic acids research*, 44(D1), D1104-D1112.
145. Pirtskhalava, M., Vishnepolsky, B., Grigolava, M., & Managadze, G. (2021). Physicochemical Features and Peculiarities of Interaction of AMP with the Membrane. *Pharmaceuticals*, 14(5), 471
146. Pittol, M., Tomacheski, D., Naue-Simões, D., Ferreira-Riberiro, V. & Campomanes-Santana, R.M. (2017). Antimicrobial performance of thermoplastic elastomers containing zinc pyrithione and silver nanoparticles. *Materials Research*. 20(5): 1266-1273
147. Prażak, R., Święcilo, A., Krzepiłko, A., Michałek, S., & Arczewska, M. (2020). Impact of Ag nanoparticles on seed germination and seedling growth of green beans in normal and chill temperatures. *Agriculture*, 10(8), 312.
148. Qian, H., Peng, X., Han, X., Ren, J., Sun, L., & Fu, Z. (2013). Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *Journal of environmental sciences*, 25(9), 1947-1956.

149. Qiang, L., Arabeyyat, Z. H., Xin, Q., Paunov, V. N., Dale, I. J., Lloyd Mills, R. I., ... & Cheng, J. (2020). Silver nanoparticles in Zebrafish (*Danio rerio*) embryos: Uptake, growth and molecular responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1876.
150. Quevedo, A. C., Lynch, I., & Valsami-Jones, E. (2021). Silver nanoparticle induced toxicity and cell death mechanisms in embryonic zebrafish cells. *Nanoscale*, 13(12), 6142-6161.
151. Quezada Rivera, J. J. (2018). *Obtención de péptidos antimicrobianos recombinantes derivados de Moringa oleífera Lam. y Enterococcus sp* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Aguascalientes).
152. Rajeshkumar, S., & Bharath, L. V. (2017). Mechanism of plant-mediated synthesis of silver nanoparticles—a review on biomolecules involved, characterisation and antibacterial activity. *Chemico-biological interactions*, 273, 219-227.
153. Rauwel, P., Küünal, S., Ferdov, S., & Rauwel, E. (2015). A review on the green synthesis of silver nanoparticles and their morphologies studied via TEM. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2015.
154. Ren, J., & Tilley, R. D. (2007). Preparation, self-assembly, and mechanistic study of highly monodispersed nanocubes. *Journal of the American Chemical Society*, 129(11), 3287-3291.
155. Ren, J., Wen, L., Gao, X., Jin, C., Xue, Y., & Yao, X. (2009). DOG 1.0: illustrator of protein domain structures. *Cell research*, 19(2), 271.
156. Richards, D. A., Maruani, A., & Chudasama, V. (2017). Antibody fragments as nanoparticle targeting ligands: a step in the right direction. *Chemical science*, 8(1), 63-77.
157. Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic acids research*, 42(W1), W320-W324.
158. Rojas, J. J., García, A. M., & López, A. J. (2005). Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 4(2), 28-32.
159. Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 5, 172.
160. Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., & Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC bioinformatics*, 18(1), 1-26.
161. Russ, W., & Meyer-Pittroff, R. (2004). Utilizing waste products from the food production and processing industries. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(1), 57-62.
162. Sadeghi, B., Rostami, A., & Momeni, S. S. (2015). Facile green synthesis of silver nanoparticles using seed aqueous extract of *Pistacia atlantica* and its antibacterial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134, 326-332.
163. Sagadevan, S., & Koteeswari, P. (2015). Analysis of structure, surface morphology, optical and electrical properties of copper nanoparticles. *Journal of Nanomedicine Research*, 2(5), 00040-00048.
164. Sagar, G., & Ashok, B. (2012). Green synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus niger* and its efficacy against human pathogens. *European Journal of Experimental Biology*, 2(5), 1654-1658.
165. Salachna, P., Byczyńska, A., Zawadzińska, A., Piechocki, R., & Mizielińska, M. (2019). Stimulatory effect of silver nanoparticles on the growth and flowering of potted oriental lilies. *Agronomy*, 9(10), 610.

166. Saleh, T. A. (2020). Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environmental Technology & Innovation*, 20, 101067.
167. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
168. Sarkar, T., Chetia, M., & Chatterjee, S. (2021). Antimicrobial peptides and proteins: from nature's reservoir to the laboratory and beyond. *Frontiers in Chemistry*, 9, 432.
169. Sarsar, V., Selwal, K. K., & Selwal, M. K. (2014). Nanosilver: potent antimicrobial agent and its biosynthesis. *african journal of Biotechnology*, 13(4).
170. Schmidt, M., Arendt, E. K., & Thery, T. L. (2019). Isolation and characterisation of the antifungal activity of the cowpea defensin Cp-thionin II. *Food microbiology*, 82, 504-514.
171. Schneider, T. D., & Stephens, R. M. (1990). Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic acids research*, 18(20), 6097-6100.
172. Sengottaiyan, A., Mythili, R., Selvankumar, T., Aravinthan, A., Kamala-Kannan, S., Manoharan, K., ... & Kim, J. H. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using *Solanum indicum* L. and their antibacterial, splenocyte cytotoxic potentials. *Research on Chemical Intermediates*, 42(4), 3095-3103.
173. Seyfi, R., Kahaki, F. A., Ebrahimi, T., Montazersaheb, S., Eyvazi, S., Babaeipour, V., & Tarhriz, V. (2020). Antimicrobial peptides (AMPs): roles, functions and mechanism of action. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(3), 1451-1463.
174. Shen, C. H. (2019). Gene Expression: Translation of the Genetic Code. *Diagnostic Molecular Biology*, 87-116.
175. Silvia, A. (n.d.). Péptidos antimicrobianos de plantas. 160, 28–46.
176. Simons, A., Alhanout, K., & Duval, R. E. (2020). Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms*, 8(5), 639.
177. Sinervo, P. (2008). Small is Different: A Science Perspective on the Regulatory Challenges of 340 the Nanoscale. *Council of Canadian Academies: Ottawa, ON, Canada*, 341, 342.
178. Some, S., Sen, I. K., Mandal, A., Aslan, T., Ustun, Y., Yilmaz, E. Ş., ... & Ocsay, I. (2018). Biosynthesis of silver nanoparticles and their versatile antimicrobial properties. *Materials Research Express*, 6(1), 012001
179. Su, T., Han, M., Cao, D., & Xu, M. (2020). Molecular and biological properties of snakins: the foremost cysteine-rich plant host defense peptides. *Journal of Fungi*, 6(4), 220
180. Tallon, P., Magajna, B., Lofranco, C., & Leung, K. T. (2005). Microbial indicators of faecal contamination in water: a current perspective. *Water, air, and soil pollution*, 166(1-4), 139-166.
181. Tam, J. P., Wang, S., Wong, K. H., & Tan, W. L. (2015). Antimicrobial Peptides from Plants. 711–757. <https://doi.org/10.3390/ph8040711>
182. Tam, J. P., Wang, S., Wong, K. H., & Tan, W. L. (2015). Antimicrobial Peptides from Plants. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 8(4), 711–757.
183. Téllez, G. A., & Castaño, J. C. (2010). Antimicrobial peptides. *Infection*, 14(1), 55-67.
184. Téllez, G. A., & Castaño, J. C. (2011). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, 14(1).
185. Temgire, M. K., & Joshi, S. S. (2004). Optical and structural studies of silver nanoparticles. *Radiation Physics and Chemistry*, 71(5), 1039-1044.
186. Théolier, J., Hammami, R., Labelle, P., Fliss, I., & Jean, J. (2013). Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 706-714

187. Tippayawat, P., Phromviyo, N., Boueroy, P., & Chompoosor, A. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles in aloe vera plant extract prepared by a hydrothermal method and their synergistic antibacterial activity. *PeerJ*, 4, e2589.
188. Tornesello, A. L., Borrelli, A., Buonaguro, L., Buonaguro, F. M., & Tornesello, M. L. (2020). Antimicrobial peptides as anticancer agents: Functional properties and biological activities. *Molecules*, 25(12), 2850.
189. Torrent, M., Andreu, D., Nogués, V. M., & Boix, E. (2011). Connecting peptide physicochemical and antimicrobial properties by a rational prediction model. *PLoS one*, 6(2).
190. Torrent, M., Nogués, V. M., & Boix, E. (2009). A theoretical approach to spot active regions in antimicrobial proteins. *BMC bioinformatics*, 10(1), 373.
191. Tran, Q. H., Nguyen, V. Q., & Le, A. T. (2013). Adv. Nat. Sci. Nanosci. *Nanotechnology*, 4, 033001.
192. Ugwuja, D. I., Okoro, U. C., Soman, S. S., Soni, R., Okafor, S. N., & Ugwu, D. I. (2019). New peptide derived antimalaria and antimicrobial agents bearing sulphonamide moiety. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 34(1), 1388-1399.
193. Umoren, S. A., Obot, I. B., & Gasem, Z. M. (2014). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using red apple (*Malus domestica*) fruit extract at room temperature. *J Mater Environ Sci*, 5(3), 907-914.
194. Urrejola, M. C., Soto, L. V., Zumarán, C. C., Peñaloza, J. P., Álvarez, B., Fuentesvilla, I., & Haidar, Z. S. (2018). Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly). *International Journal of Morphology*, 36(4), 1463-1471.
195. Valerio-García, R. C., Carbajal-Hernández, A. L., Martínez-Ruíz, E. B., Jarquín-Díaz, V. H., Haro-Pérez, C., & Martínez-Jerónimo, F. (2017). Exposure to silver nanoparticles produces oxidative stress and affects macromolecular and metabolic biomarkers in the goodeid fish *Chapalichthys pardalis*. *Science of the Total Environment*, 583, 308-318.
196. Van Aerle, R., Lange, A., Moorhouse, A., Paszkiewicz, K., Ball, K., Johnston, B. D., ... & Santos, E. M. (2013). Molecular mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Environmental science & technology*, 47(14), 8005-8014.
197. Van Damme, E. J., Charels, D., Roy, S., Tierens, K., Barre, A., Martins, J. C., ... & Peumans, W. J. (1999). A gene encoding a hevein-like protein from elderberry fruits is homologous to PR-4 and class V chitinase genes. *Plant physiology*, 119(4), 1547-1556.
198. Van Parijs, J., Broekaert, W. F., Goldstein, I. J., & Peumans, W. J. (1991). Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*, 183(2), 258-264.
199. Vanaja, M., & Annadurai, G. (2013). *Coleus aromaticus* leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles and its bactericidal activity. *Applied nanoscience*, 3(3), 217-223
200. Vasanth, K., Ilango, K., MohanKumar, R., Agrawal, A., & Dubey, G. P. (2014). Anticancer activity of Moringa oleifera mediated silver nanoparticles on human cervical carcinoma cells by apoptosis induction. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 117, 354-359.
201. Veléz, A., Mera, C. A., Orduz, S., & Branch, J. W. (2021). Generación de péptidos antimicrobianos mediante redes neuronales recurrentes. *Dyna*, 88(216), 210-219.
202. Veltri, D., Kamath, U., & Shehu, A. (2018). Deep learning improves antimicrobial peptide recognition. *Bioinformatics*, 34(16), 2740-2747.

203. Waghu, F. H., Barai, R. S., Gurung, P., & Idicula-Thomas, S. (2016). CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *Nucleic acids research*, 44(D1), D1094-D1097.
204. Wang, G. (2015). Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. In *Computational Peptidology* (pp. 43-66). Humana Press, New York, NY.
205. Wang, G. (2020). Bioinformatic analysis of 1000 amphibian antimicrobial peptides uncovers multiple length-dependent correlations for peptide design and prediction. *Antibiotics*, 9(8), 491.
206. Wang, G. Li, X. and Wang, Z. (2016) APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research* 44, D1087-D1093
207. Wang, H., Qiao, X., Chen, J., & Ding, S. (2005). Preparation of silver nanoparticles by chemical reduction method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 256(2-3), 111-115.
208. Wani, I. A., Ganguly, A., Ahmed, J., & Ahmad, T. (2011). Silver nanoparticles: ultrasonic wave assisted synthesis, optical characterization and surface area studies. *Materials Letters*, 65(3), 520-522.
209. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., ... & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, 46(W1), W296-W303.
210. Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z. S., & Chen, G. (2015). Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug discovery today*, 20(5), 595-601.
211. Wimley, W. C. (2010). Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS chemical biology*, (10), 905-917.
212. Wing, C. E. G. (2006). Las nanopartículas: pequeñas estructuras con gran potencial. *El Inin Hoy, Contacto Nuclear*, 24-29.
213. Wu, Q., Patočka, J., & Kuča, K. (2018). *Toxins*10(11), 461. Xu, L. Q., Zeng, J. W., Jiang, C. H., Wang, H., Li, Y. Z., Wen, W. H., ... & Huang, C. Y. (2017). Isolation and determination of four potential antimicrobial components from *Pseudomonas aeruginosa* extracts. *International journal of medical sciences*, 14(13), 1368.
214. Xu, L., Wang, Y. Y., Huang, J., Chen, C. Y., Wang, Z. X., & Xie, H. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety, *Theranostics*, 10 (20), 8996-9031.
215. Yadav, H. K., Almokdad, A. A., Sumia, I. M., & Debe, M. S. (2019). Polymer-based nanomaterials for drug-delivery carriers. In *Nanocarriers for Drug Delivery* (pp. 531-556). Elsevier
216. Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological reviews*, 55(1), 27-55.
217. Zargar, M., Hamid, A. A., Bakar, F. A., Shamsudin, M. N., Shameli, K., Jahanshiri, F., & Farahani, F. (2011). Green synthesis and antibacterial effect of silver nanoparticles using *Vitex negundo* L. *Molecules*, 16(8), 6667-6676
218. Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *nature*, 415(6870), 389-395.
219. Zhang, L. W., & Monteiro-Riviere, N. A. (2009). Mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake. *Toxicological Sciences*, 1108-1155.
220. Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International journal of molecular sciences*, 17(9), 1534.

221. Zielińska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D. N., ... & Souto, E. B. (2020). Polymeric nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology. (16), 3731.
222. Zoo, J.C., S.Y. Lee, H.J. Chun, Y.H. Cheong, J.S. Choi, S. Kawabata, et al. (1998) Two hevein homologs isolated from the seed of *Parbittis nil* exhibit potent antifungal activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1382: 80-90



Anexo 1

Secuencias de Glioxalasa en *Sorghum bicolor* en donde se identificaron los PAMs

>SbGLY1-3.1

MARLLLPLPFAAAAAASASSLHLAASRLRLPAVSVARRECLYGGRVVGGVVRAPARLGKRG
 LCAGAEAGGSAGTVVVGQEEALEWVKKDRRRLHVVYRVGDLDKTIKFYTECLGMKLLRKR
 IPEERYTNAFLGYGPEDSHFVVELTYNYGVESYDIGTAFGHFGIAVDDVAKTVELIKAKGG
 TVTREP GPVKGGKSVIAFIEDPDGYKFEI ERGPTPEPLCQVMLRVGDLDRAINFYEKAFG
 MELLRKRDNPEYKYTIAMMGYPEDKNAVLELTYNYGVKEYDKGNAYAQIAISTDDVYKTA
 EAIRVNGGRITREPGLPGINTKITACTDPDGWKT VFDNIDFLKELEE

>SbGLY2-1.1

MKIIPVPCLEDNYAYLIVDESTKKA AVDPVEPEKVIKAAGEV GAYVDCVLTTHHHWDHAG
 GNEKMRLQVPGIKIFGGSLDNVKGCTDQVENGT KLSLGKDIEILCLHTPCHTKGHISYYVT
 SKEGEDPAVFTGDTLFIAGCGKFFEGTAEQMYQSLIVTLGSLPKSTRVYCGHEYTVKNLKF
 ILTVEPENEEKTKQKLEWAEKQRQANQPTVPSTIGDEFEINTFMRVDLPEIQAKFGANSPVE
 ALREVRKTKDNWKG

>Sbdj1-B.1

MAAKKVLMLCGDYMEDYEMVVPFQALQAYGVS VDAVCP SKKAGNICRTAVHQGIGHQTYSE
 TKGHNF TLNASFDEITASEYDGLVIPGGRAP EYLAMDRQVLNLVRNFS DAKKPIASVCHGQ
 LILAAARVVENRNCTAYPAVKPVLVAAGAKW EEPDTMAKCTVDGNLITAATYDSHPEFISL
 FVKALGGSVAGSDKKILFLCGDYMEDYEMV VPFQSLQALGCHVDAVCPDKGAGEKCP TAIH
 DFEGDQTYSEKPGHDFTLTASFESVDASSY DALVIPGGRAP EYLALNDKVISLVKAFADNG
 KPIASICHGQQILSAAGVLKGGKCTAYPAVK LNVVLGGGTWLEPDP IHRCF TDGNLVTGAA
 WPGHPEFVSQLMALLGIKVSF

>Sbdj1-C.1

MLSPWHTIAPAAMELRSPLNSKNCSLYSTIR SPPPRSLARAPSKLSAAAAAVSSLSDTAAA
 AISSPSCP KKKVLVPVAMGTEEMEAVIIAGV LRRAGADVTLASVEDGLEVEASCGRIVAD
 THIASCADQVFDLVALPGGMPGSVRLRDSI LQRITVRQAEKRLYGAI CAAPAVVLM PWG
 LHRRKKITCHPSFIGDLPAFRAVESNVQVSG ELTTSRGPGTAFEFALSFVEQMF GPHTAED
 MGRILMAQTHDDLERSAEVNELEWSFDRN PEVLPIANGSEEMEIIILVDILRRAKIN VVL
 ASVEKSLTILGSQRMKIVADKSITSASDSI YDLIVLPGGPAGAERLHRSRILKLLNLQM Q
 AGRMYGGVCSALKVLQQQLLEDKTVTAH HAVASELTCQVIDQPKVVIDGNLITGKGLGT V
 VDFALAIIRKFFGHGRAKAVANGIVFEY PKS

Anexo 2

Árbol de decisión creado a partir del algoritmo j48 que se basa en las propiedades fisicoquímicas (Lira et al., 2013).

