



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**BACTERIOCINAS Y OTROS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN
MATRICES POLIMÉRICAS CON POTENCIAL USO EN LA INDUSTRIA
ALIMENTARIA Y FARMACÉUTICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

AUTOR: OMAR CASTILLO CASTILLO

PROFESORA GUÍA: BLGA. MG. CS. BIOMÉDICAS OLGA LOBOS GILABERT

TALCA-CHILE

2020

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2021

Dedicado a mi familia que me apoyó incondicionalmente en esta etapa de mi vida, en especial a mis padres, Mónica y Omar que me acompañaron en cada paso y decisión, y me inspiraron a seguir adelante pese a los obstáculos y dificultades presentadas a lo largo de este camino.

I. ÍNDICE DE CONTENIDOS

IV. INTRODUCCIÓN.....	1
V. OBJETIVOS.....	3
VI. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA.....	4
VII. MARCO TEÓRICO	5
CAPÍTULO 1: BACTERIOCINAS.....	5
1.1 Definición y características de las bacteriocinas	5
1.2 Mecanismo de acción de las bacteriocinas.....	7
1.3 Clasificación de bacteriocinas.....	8
1.4 Bacteriocinas Gram negativo productora de bacteriocinas.....	11
1.5 Bacteriocinas Gram positivo productora de bacteriocinas.....	14
1.6 Aplicaciones de las bacteriocinas en la industria de alimentos y farmacología.....	19
1.7 Purificación y efectos fisicoquímicos de bacteriocinas.....	35
CAPÍTULO 2: USO DE LOS COMPUESTOS POLIMÉRICOS COMO MATRICES DE BACTERIOCINAS Y OTROS ANTIMICROBIANOS.....	39
2.1 Polímeros.....	36
2.2 Clasificación.....	36
2.3 Aplicación de las bacteriocinas encapsuladas en sustancias poliméricas en industria alimenticia y farmacéutica	41
2.4 Aplicación de antimicrobianos encapsulados en sustancias poliméricas	54

VIII. CONCLUSIÓN.....	61
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	63

II. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Modo de acción de los lantibióticos (Clase I), no-lantibióticos (Clase II) y bacteriolisinas (Clase III).....	8
Tabla 1. Características bioquímicas de los aislados.....	14
Tabla 2. Géneros con mayor relevancia a los que pertenecen las BAL.....	15
Figura 2. Vía homofermentativa de la glucosa por Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....	17
Figura 3. Vía heterofermentativa de la glucosa por Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....	18
Figura 4. Efecto anti-biofilm sobre la formación de biopelículas de <i>S. typhimurium</i> KCTC 1925 en la carne de pollo por la bacteriocina K10 y la bacteriocina HW01 de <i>P. acidilactici</i>	20
Figura 5. Efecto inhibitorio de la bacteriocina K10 y la bacteriocina HW01 sobre la formación de biopelículas de <i>S. typhimurium</i> KCTC 1925.....	21
Tabla 3. Actividad de inhibición de bacteriocinas de amplio espectro de 3 cepas de BAL contra 6 bacterias nocivas transmitidas por alimentos.....	23
Tabla 4. Determinación de MIC de GakA, GakB, GakC y sus combinaciones.....	27
Tabla 5. Concentraciones de cloranfenicol y haloduracina seleccionadas para el estudio de efecto sinérgico.....	30
Tabla 6. Los efectos antimicrobianos de las combinaciones de haloduracina, cloranfenicol y haloduracina+cloranfenicol contra bacterias clínicamente importantes.....	31
Tabla 7. Resumen subcapítulos Bacterias Gram negativo y Gram positivo.....	32
Tabla 8. Resumen subcapítulo generalidades de bacteriocinas.....	33
Figura 6. Modelo de película del concentrado de suero lácteo con bacterias ácido-lácticas.....	43

Figura 7. Viabilidad de las cepas BAL en la película de proteína a pH 8,0, almacenadas a 7°C por 15 días.....	44
Figura 8. Efecto antagonista de nisina, STB de BAL-A+ B + nisina cepas BAL-A+B desde la película de proteína frente a <i>L. monocytogenes</i> a pH 8,0.....	45
Figura 9. Crecimiento bacteriano en medios selectivos sin película y con película antibacteriana a los 2 o 3 días y a los 30 días.....	47
Figura 10. Cinética de crecimiento de los indicadores (UFC/g) a 35 ° C en medio de cultivo Barbacoa. i) <i>Listeria monocytogenes</i> ; ii) <i>Escherichia coli</i> , y iii) <i>Staphylococcus aureus</i>	49
Tabla 9. Perfil de resistencia a los antimicrobianos y concentraciones mínimas bactericidas (CMB) para nisina (NS), fragmentos de bicapa (BF) de bromuro de dioctadecildimetilamonio (DDA) y complejos NS / DDA contra <i>Staphylococcus spp.</i> aislado de cepas de referencia de mastitis bovina y <i>Staphylococcus aureus</i>	53
Figura 11. Efectividad del recubrimiento de bio-nanocompuestos en las frutas.....	56
Figura 12. Película de bio-nanocompuesto.....	57
Tabla 10. Concentración inhibitoria mínima del compuesto de AgNP sintetizado.....	58
Figura 13. Inhibición del crecimiento causada por el compuesto AgNPs.....	59

III. RESUMEN

Con el correr del tiempo, microorganismos como las bacterias han ganado territorio a nivel clínico dada su capacidad de resistencia frente a sustancias antimicrobianas ante las cuales, originalmente, mostraban sensibilidad. Lo anterior, se presenta en ocasiones como un problema y desafío para los equipos médicos, ya que éstos se quedan sin opciones terapéuticas para determinados microorganismos infecciosos. Sumado a esto, la contaminación bacteriana de alimentos y con ello la producción de intoxicaciones alimentarias leves o graves también ha ido en aumento, lo que ha llevado a cientos de científicas y científicos, alrededor del mundo, a estudiar nuevas estrategias de control para estos microorganismos contaminantes.

Teniendo en consideración lo anterior, el objetivo de esta revisión es dar a conocer los nuevos avances científicos en relación con la actividad antibacteriana de bacteriocinas encapsuladas en sustancias poliméricas y su utilización en industria alimentaria y farmacológica. Muchos artículos científicos e investigaciones realizadas alrededor del mundo abordan esta problemática creciente, y han desarrollado compuestos y métodos que permiten una mejor conservación de los alimentos, a la vez que logran inhibir la capacidad productora de biofilm de bacterias causantes de intoxicaciones alimentarias. Dentro del campo clínico, la implementación de terapias combinadas de antibióticos disponibles en el mercado y bacteriocinas activas contra bacterias resistentes ha surgido como una alternativa frente a los tratamientos convencionales.

Finalmente, muchas de las nuevas estrategias de control e inhibición bacteriana están dando resultados positivos. Se ha demostrado que la incorporación de bacteriocinas dentro de sustancias poliméricas presenta ventajas en su utilización ya que se puede observar una mayor estabilidad de estos productos antimicrobianos frente a factores fisicoquímicos como temperatura y pH. Lo anterior, hace vislumbrar desarrollos futuros prometedores en el ámbito del control de microorganismos.

Palabras claves: Sustancias poliméricas, péptidos antimicrobianos, bacteriocinas, resistencia bacteriana, antibiótico

IV. INTRODUCCIÓN

La presente revisión bibliográfica se encuentra centrada en la actividad antimicrobiana de bacteriocinas y otros compuestos antimicrobianos encapsulados en sustancias poliméricas. Las bacteriocinas son sustancias antibacterianas producidas por bacterias.

Las bacteriocinas se pueden clasificar en diferentes grupos y se definen como péptidos antimicrobianos sintetizados por ribosomas producidos por bacterias. Pueden matar o inhibir cepas bacterianas estrechamente relacionadas o no relacionadas con las bacterias productoras. Este tipo de bacterias presenta un gen de autoinmunidad para protegerse de la acción de su propia bacteriocina.

Las sustancias poliméricas, en general, se definen como compuestos orgánicos, que pueden ser de origen natural o sintético, con alto peso molecular, formados por unidades estructurales repetitivas a las que se les denomina monómeros. Es importante destacar que en esta revisión los polímeros de mayor interés son los naturales, como las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) definidas como polímeros biosintetizados por varias cepas de microorganismos. Dichos polímeros están compuestos, principalmente, de sustancias de alto peso molecular, carbohidratos, proteínas y ácido desoxirribonucleico (ADN), la producción de estos se desencadena mayoritariamente por señales ambientales.(1)

Para analizar el tema en cuestión, es necesario mencionar las causas por las cuales se aborda. En los últimos años, la aplicación de bacteriocinas como parte de la tecnología de obstáculos, la que se entiende como tecnología que se utiliza para controlar los procesos de deterioro, intoxicación y fermentación no deseados en alimentos, ha ganado gran atención, ya que ésta, de grosso modo, hace que los alimentos se conserven por más tiempo de manera más natural. Por otro lado, las bacterias cada día se están haciendo más resistentes y en algunos casos se dificulta la elección correcta del antibiótico para su control. Dado lo

anterior, en el área de la farmacología, las bacteriocinas pueden ser un potencial objetivo para el tratamiento de bacterias multirresistentes, de esa forma, se les puede considerar como tratamiento terapéutico para enfermedades infecciosas.

Esta revisión bibliográfica se realizó por el interés de conocer los diferentes usos o aplicaciones potenciales en la industria de conservación de alimentos, así como también en la industria farmacológica enfocada en tratamientos. En el caso del uso de bacteriocinas en la industria alimentaria, puede ayudar a reducir la adición de conservantes sintéticos (químicos) a los alimentos procesados. Esto puede ser una opción para satisfacer las grandes demandas por parte de los consumidores de alimentos que los prefieren de sabor fresco, listos para comer, mínimamente procesados y también para desarrollar productos alimenticios innovadores (por ejemplo, menos contenido de sal o menos ácidos).

Las bacteriocinas pueden presentar un amplio o reducido espectro de actividad. Aquellas de amplio espectro presentan usos potenciales más extensos, mientras que de espectro reducido pueden usarse más específicamente para inhibir selectivamente ciertas bacterias de alto riesgo en alimentos. Las bacteriocinas pueden agregarse a los alimentos en forma de preparaciones concentradas como conservantes de alimentos, extendedores de vida útil, aditivos o ingredientes o pueden producirse in situ por iniciadores bacteriogénicos (2).

Las bacteriocinas inmovilizadas también pueden encontrar aplicación para el desarrollo de envases de alimentos bioactivos. Muchas bacteriocinas muestran efectos aditivos o sinérgicos cuando se usan en combinación con otros agentes antimicrobianos, incluidos los conservantes químicos, compuestos fenólicos naturales y otras proteínas antimicrobianas. Esto, así como el uso combinado de diferentes bacteriocinas, también puede ser un enfoque más llamativo para evitar el desarrollo de cepas resistentes, lo que sería un gran avance farmacológico, por lo mismo en esta industria, las bacteriocinas pueden tomar un rol fundamental en cuanto al tratamiento antimicrobiano de bacterias, ya sean resistentes o no, haciendo de esa forma que las bacteriocinas sean una nueva estrategia terapéutica.

V. OBJETIVO GENERAL

Dar a conocer los nuevos avances científicos en relación con la actividad antibacteriana de bacteriocinas y otros compuestos antimicrobianos encapsulados en sustancias poliméricas y su utilización en industria alimentaria y farmacológica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir las bacteriocinas y microorganismos productores.
2. Describir las sustancias poliméricas y su uso en la industria de alimentos y farmacológica.
3. Analizar el uso de sustancias poliméricas para encapsular productos antimicrobianos o bacteriocinas.

VI. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA

Esta revisión bibliográfica se realizó con la búsqueda de información disponible acerca de compuestos poliméricos y su utilización como matriz de bacteriocinas y otros productos antimicrobianos con enfoque principal en la industria farmacéutica y alimentaria.

Donde para esta recopilación de información se consultaron revistas indexadas a modo de asegurar la calidad de la información disponible, lo que también permitió ingresar a bases de datos internacionales y/o nacionales.

Las bases de datos consultadas fueron PubMed, Medline, Scopus, Scielo, Latindex, Web of Science, entre otras, con el propósito de revisar trabajos publicados relacionados con al tema investigado, principalmente durante los últimos 6 años.

VII. MARCO TEÓRICO

CAPÍTULO I: BACTERIOCINAS

1.1 Definición y características de las bacteriocinas

Las primeras referencias que se tienen acerca del estudio de las bacteriocinas datan de 1928, cuando se publicaron dos trabajos que describían la actividad antimicrobiana de una cepa de *Streptococcus lactis* frente a *Lactobacillus delbrueckii* debido a un compuesto proteico, dializable y termoestable. En 1947, Matick y Hirsch describieron un compuesto antimicrobiano producido por varias cepas de estreptococos del grupo N de Lancefield y lo denominaron nisina. (3)

El término “bacteriocinas” fue propuesto por primera vez por Jacob y colaboradores en 1953 para referirse a las sustancias proteicas con actividad antimicrobiana de origen bacteriano. Las bacteriocinas se definieron a modo general como un grupo de sustancias antimicrobianas de origen bacteriano, caracterizadas por (i) la adsorción a receptores de membrana específicos; (ii) la actividad intraespecífica y, (iii) la biosíntesis letal. Estudios posteriores acerca de las colicinas evidenciaron que estas sustancias se caracterizaban, además, por (iv) poseer un componente proteico biológicamente activo; (v) ejercer un modo de acción bactericida y, (vi) por la localización plasmídica de los determinantes genéticos que codifican su producción e inmunidad. (4)

En la revisión sobre bacteriocinas de las bacterias Gram positivas de Tagg y colaboradores en 1976 se considera que los seis criterios mencionados anteriormente son válidos para las bacteriocinas prototipos o colicinas, pero las bacteriocinas de las Gram positivas muestran discordancias con algunos de los criterios establecidos, directamente en lo referente al espectro de acción, la presencia de receptores específicos, la localización de

los determinantes genéticos y la biosíntesis letal. Por tanto, Tagg y colaboradores sugieren que se deben considerar bacteriocinas a todas aquellas sustancias antimicrobianas bacterianas que, por lo menos, cumplan los criterios (iv) y (v). (5)

Continuando sólo por el lado de bacteriocinas de bacterias ácido-lácticas, estas son un grupo heterogéneo de sustancias antimicrobianas de origen peptídico, varias de ellas no han sido completamente caracterizadas aún. Por tanto, otros autores sugieren que no se puede establecer propiedades en común de todas, sin embargo, las propiedades que principalmente se tienen en cuenta son las siguientes: naturaleza, tamaño molecular, composición aminoacídica y estructura química, termorresistencia y estabilidad frente a pH. Aunque por definición las bacteriocinas son sustancias de naturaleza proteica, se han descrito algunas que presentan en su molécula componentes glucosídicos y/o lipídicos, además de una fracción proteica (6).

Las bacteriocinas producidas por las bacterias ácido-lácticas se caracterizan por ser, generalmente, estables a valores de pH ácidos o próximos a la neutralidad, lo que indica la adaptación de estas sustancias a condiciones ambientales de los sustratos en los que se desarrollan las bacterias productoras. La termorresistencia es una característica muy extendida entre las bacteriocinas de las bacterias lácticas, dependiendo de una serie de factores como el grado de purificación de las bacteriocinas, la presencia de moléculas termoprotectoras y el pH. La termoestabilidad disminuye cuando los tratamientos térmicos se realizan con las bacteriocinas purificadas parcialmente o a homogeneidad, como se ha comprobado con la lactacina B, la carnocina U – 149, y la sakacina P, entre otras. Debido a su naturaleza peptídica, las bacteriocinas pueden ser degradadas por enzimas digestivas, resultando inocuas para el hombre y su microbiota intestinal. Además, sus propiedades fisicoquímicas les dan resistencia a tratamientos térmicos y debido a su pequeño tamaño pueden difundir con relativa facilidad en los alimentos. (7)

1.2 Mecanismo de acción de las bacteriocinas

A forma general el modo de acción de las bacteriocinas de bacterias lácticas es la formación de poros en la membrana citoplasmática de las células sensibles. Este proceso induce la disipación de la fuerza motriz protónica. La formación de poros y la eliminación de la fuerza motriz protónica (fuente de energía celular) promueven la salida rápida de metabolitos de pequeño tamaño, como aminoácidos y nucleótidos, interrumpiendo los procesos de biosíntesis de la célula. Además de la formación de poros, para ciertas bacteriocinas se ha descrito la lisis celular como modo de acción secundario. (8)

Ahora según Cinta y colaboradores en 2001 y centrándose en el mecanismo de acción de las bacteriocinas, han demostrado una gran capacidad bactericida y se relaciona con el contenido de cistina y según se puede hablar de 3 espectros de acción:

- a. Bacteriocinas con espectro inhibitorio estrecho, donde sus productos inhiben microorganismos de la misma especie.
- b. Bacteriocinas con espectro inhibitorio intermedio, donde sus productos inhiben otros géneros de BAL, bacterias Gram positivo y patógenos presentes en alimentos.
- c. Bacteriocinas con amplio espectro de inhibición que actúan contra un gran número de bacterias Gram-positivas (9).

Se sabe que las bacteriocinas se dirigen principalmente contra bacterias Gram positivo, pero también se han descrito especies con acción sobre Gram-negativas, hongos patógenos e incluso virus. (10)

Según Cotter y colaboradores en 2005, determinaron que las bacteriocinas de bacterias Gram positivo presentan diferentes modos de acción de acuerdo a su clasificación (Figura 1).

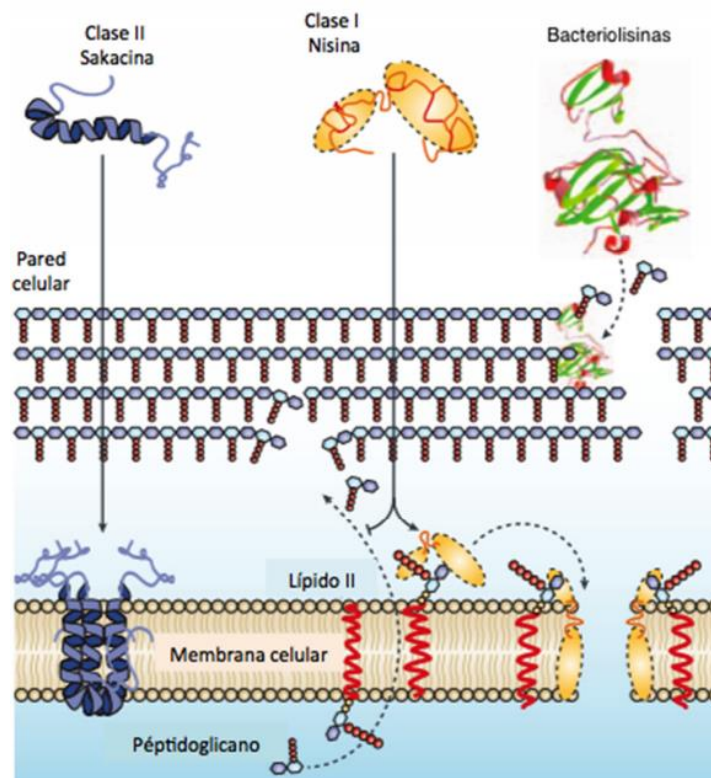


Figura 1. Modo de acción de los lantibióticos (Clase I), no-lantibióticos (Clase II) y bacteriolisinas (Clase III). Tomado y adaptado de (Beristain-Bauza, S. 2012) (11)

1.3 Clasificación de las bacteriocinas

Klaenhammer en 1993 propuso la clasificación de las bacteriocinas de las bacterias ácido lácticas en cuatro grupos, basados en la estructura y naturaleza química, tamaño molecular, presencia de aminoácidos modificados, estabilidad térmica y modo de acción (12).

- Clase I: lantibióticos, bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (< 5 KDa) que contienen aminoácidos poco usuales y modificados postraduccionalmente.

- Clase II: bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (< 10 KDa), termoestables, que no contienen aminoácidos modificados y que actúan a nivel de la membrana citoplasmática. Éstas se dividen en los siguientes subgrupos:
 - ✓ IIa: péptidos que presentan en su extremo N – terminal la secuencia YGNGV (Y, tirosina, G, glicina, N, asparagina y V, valina), denominada secuencia consenso, y que muestran una potente actividad inhibidora frente a *Listeria* spp.
 - ✓ IIb: bacteriocinas que requieren para ser activas la presencia simultánea de dos péptidos diferentes y que actúan mediante un mecanismo de formación de poros en la membrana citoplasmática.
 - ✓ IIc: bacteriocinas tiol – activadas o péptidos que para ejercer su actividad antimicrobiana requieren la presencia de residuos de cisteína reducidos, representadas únicamente por la lactococcina B.

- Clase III: bacteriocinas de elevado tamaño molecular (> 30 KDa) y termolábiles (se inactivan con tratamientos térmicos de 60 – 100°C durante 10 – 15 minutos). La mayoría de estas bacteriocinas son producidas por *Lactobacillus*.

- Clase IV: bacteriocinas complejas, constituidas por una parte proteica y una o más fracciones lipídicas y/o glucosídicas necesarias para su actividad biológica.

Actualmente se han caracterizado bioquímicamente y genéticamente las bacteriocinas, por tanto, su clasificación ha sido objeto de modificaciones. Nes y colaboradores en 1996 han propuesto una nueva clasificación de las bacteriocinas en la cual se mantienen las clases I, II y III establecidas por Klaenhammer en 1993 y se sugiere que se debe completar la caracterización bioquímica de las bacteriocinas constituidas aparentemente por una parte proteica y una o más fracciones lipídicas y/o glucídicas (clase IV) antes de reconocerlas como una clase de bacteriocinas (13).

En lo que respecta a las bacteriocinas de la clase II, por una parte, se excluye el grupo de las bacteriocinas tiol – activadas (grupo IIc de la clasificación de Klaenhammer en 1993), ya que los trabajos realizados por Venema y colaboradores en 1996 han puesto de manifiesto

que ni la presencia ni el estado reducido de los residuos de cisteína de la lactococcina B son esenciales para su actividad biológica (14). Por otra parte, estos autores proponen agrupar las bacteriocinas de la clase II en los siguientes grupos:

- ✓ IIa: Bacteriocinas del tipo pediocina o péptidos que contienen la secuencia consenso YGNGV (Y, tirosina, G, glicina, N, asparagina y V, valina) en su extremo N – terminal y que muestran una potente actividad anti *Listeria spp.*
- ✓ IIb: Bacteriocinas que requieren para ser activas la presencia simultánea de dos péptidos diferentes.
- ✓ IIc: Bacteriocinas secretadas a través de la ruta general de secreción (GSP, del inglés General Secretary Pathway) dependiente de un péptido señal (sistema sec dependiente) (13)

A continuación, se presenta una clasificación más actual respecto a características bioquímicas y genéticas de estos compuestos propuesta por Kemperman et al, (2003).

➤ Clase I: Lantibióticos. Son péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina, b-metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de traducción. Con poca estabilidad al calor, péptidos policíclicos (<5 KDa) con aminoácidos modificados. La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de los átomos de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. Un ejemplo bien conocido de estas bacteriocinas es la nisina. A su vez, en función de su estructura y modo de acción, los lantibióticos se subdividen en 2 grupos:

- ✓ Clase I A: Péptidos elongados y catiónicos que actúan a nivel de membrana y que engloban a los lantibióticos de un sólo péptido y a aquellos que requieren la presencia de dos péptidos para ejercer su actividad antimicrobiana total.
- ✓ Clase I B: Péptidos globulares e hidrófobos que actúan como inhibidores enzimáticos.

- Clase II: No lantibióticos. bacteriocinas lineales y no modificadas postraduccionalmente. Son péptidos pequeños (<10 kDa) y termoestables, que actúan a nivel de la membrana plasmática. El representante más característico de este grupo es la pediocina PA-1, la bacteriocina más estudiada después de la nisina. En este grupo se pueden identificar tres subclases:
 - ✓ Clase II a: Péptidos activos contra *Listeria*, tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC y sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P.
 - ✓ Clase II b: Formadores de complejos para la formación de poros que consisten en dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana. En este grupo se encuentran la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK.
 - ✓ Clase II c: péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A y acidocina B.

- Clase III: bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles. Las bacteriocinas más conocidas de esta clase son helveticina J, V, acidofilicina A y lactacinas A y B.
- Clase IV: bacteriocinas complejas. Son péptidos con una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucídicas necesarias para su actividad biológica. Por tanto, esta clase incluye bacteriocinas que se consideran como glicoproteínas (lactocina S) o como lipoproteínas (mesenterocina 52).
- Clase V: bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente. A esta clase pertenecen la enterocina AS-48 y la gasericina A. (15) (16).

1.4 Bacterias Gram negativo productoras de bacteriocinas

En cuanto a su definición y clasificación dentro de las bacterias Gram negativo productoras de bacteriocinas se destacan, principalmente, las enterobacterias. Estas pertenecen a la

familia *Enterobacteriaceae*, son el grupo más grande y heterogéneo de Bacilos Gram Negativos (BGN) con importancia clínica; producen una gran variedad de enfermedades en el ser humano. Desde el punto de vista clínico, se pueden clasificar en dos grupos, enterobacterias patógenas primarias (*Salmonella enterica*, *Shigella spp.*, *Yersinia spp.* y algunas cepas de *Escherichia coli*) que producen principalmente cuadros gastrointestinales y enterobacterias oportunistas (*Serratia spp*, *Proteus spp*, *Providencia spp* y algunas cepas de *Klebsiella pneumoniae*).⁽¹⁷⁾

Cabe mencionar que en los últimos años se ha detectado la aparición y diseminación de enterobacterias multirresistentes. Continuando con lo anterior, la enterobacteria que se ha estudiado más en relación a la producción de las bacteriocinas es la *Escherichia coli*, por su producción de colicinas, pero, sin embargo, también se describen otras bacterias productoras de bacteriocinas como *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei*, *Shigella boydii*, *Klebsiella pneumoniae*, entre las más importantes.

En cuanto a los aspectos generales, de estas bacterias Gram negativo existe una gran variedad de especies descritas, sin embargo, para esta revisión las de mayor importancia son las enterobacterias, estas en base a sus pruebas primarias se caracterizan al Gram por ser bacilos Gram negativo y son positivas a la prueba de la catalasa. Para su crecimiento en medios de cultivo, generalmente, se incuban a 37° C por 24 horas, no son formadoras de esporas y son bacterias anaerobias facultativas, lo que quiere decir que pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno (18).

Dentro de esto también es importante destacar que no poseen la enzima citocromo c oxidasa, por lo cual significa que no pueden utilizar el oxígeno para la producción de energía en la cadena transportadora de electrones, lo que dentro del laboratorio esto se puede comprobar con una prueba que se le considera primaria como lo es la oxidasa y esta está disponible en todos ellos, dando como resultado oxidasa negativa, lo que es de gran utilidad porque permite

diferenciar estas bacterias de los bacilos Gram negativo no fermentadores, ya que ambos pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* (18).

También es importante hablar sobre el requerimiento de nutrientes que las enterobacterias presentan para su crecimiento. Estas se suelen encontrar en leche y productos lácteos, carne, aves, productos asociados, pescados, mariscos, frutas y vegetales. Estos microorganismos tienen la capacidad de reducir los nitratos a nitritos.

En cuanto a propiedades y características de las bacterias Gram negativo, se destacan principalmente las enterobacterias que son ubicuas en la naturaleza. Muchas especies pueden existir como vida libre en diversos nichos ecológicos, tanto en ambientes terrestres como acuáticos, y algunas están asociadas solo con animales, plantas o insectos. Muchos son importantes patógenos humanos, animales y/o vegetales que causan una variedad de infecciones. Existen numerosas aplicaciones que utilizan miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, incluido el biocontrol en la agricultura, la producción de numerosas proteínas recombinantes y productos no proteicos, control de enfermedades infecciosas, agentes anticancerígenos, reciclaje de residuos biológicos y biorremediación (19).

Las características de esta familia incluyen ser móvil, catalasa positiva y oxidasa negativa como ya se mencionó; reducción de nitrato a nitrito; y producción de ácido a partir de la fermentación de glucosa. Sin embargo, también hay muchas excepciones. En la tabla 1 se pueden ver algunos ejemplos de las bacterias más comunes de esta familia y algunas de sus características bioquímicas.

Tabla 1: Características bioquímicas de los aislados. Tomado y Adaptado de (Mladenović, K 2018) (19)

Especies	Test oxidasa	Test catalasa	Test indol	Test citrato	Test MR	Fermentación glucosa	Fermentación lactosa	Triple azúcar
<i>E. coli</i>	-	+	+	-	+	A+ G+	A+ G+	A+ G+ H2S-
<i>S. marcescens</i>	-	+	+	+	+	A+	A+	A+
<i>S. sonnei</i>	-	+	-	-	-	A+	A-	A+
<i>K. pneumoniae</i>	-	+	-	+	+/-	A+ G+	A+ G+	A+ G+ H2S-

MR= rojo de metilo; **A**=producción de ácido; **G**=producción de gas; **H₂S**=sulfuro de hidrógeno; “+” reacción positiva; “-” reacción negativa; “+/-” reacción variable.

1.5 Bacterias Gram positivo productoras de bacteriocinas

En cuanto a su definición y clasificación destacan principalmente las Bacterias Ácido-Lácticas (BAL), las constituyen un grupo heterogéneo de géneros que comparten muchas características fisiológicas. Estas BAL deben su designación y caracterización a su capacidad para fermentar azúcares principalmente en ácido láctico a través del metabolismo homo o heterofermentativo, lo que las hace útiles como cultivos iniciadores para la fermentación de alimentos, también se definen como una clase funcional que designa un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas, no patógenas, no toxigénicas. (20)

Estas BAL incluyen un amplio grupo de bacterias de fermentación Gram positivo que, generalmente, no son esporuladas ni móviles. Están muy extendidas en la naturaleza, en el suelo, las verduras, la carne, la leche y el cuerpo humano. En cuanto a su clasificación, las BAL pertenecen al phylum *Firmicutes* que comprende alrededor de 20 géneros, pero sólo son 12 los que tienen mayor relevancia para esta revisión, los que se pueden ver en la Tabla 2, siendo *Lactobacillus* el más importante de ellos.

Tabla 2: Géneros con mayor relevancia a los que pertenecen las BAL. Tomado y Adaptado de (Parras, R. 2010) (20)

Phylum	Género	
Firmicutes	<i>Lactococcus</i>	<i>Carnobacterium</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterococcus</i>
	<i>Streptococcus</i>	<i>Oenococcus</i>
	<i>Leuconostoc</i>	<i>Tetragenococcus</i>
	<i>Pediococcus</i>	<i>Vagococcus</i>
	<i>Aerococcus</i>	<i>Weisella</i>

En cuanto a los aspectos generales de Bacterias Gram positivo productoras de bacteriocinas, destacan principalmente las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, catalasa negativo, anaerobios facultativos sin producción de pigmentos. En cuanto a la formación de esporas como se sabe, éstas dependen del ambiente que esté a su alrededor. Desde el punto de vista del oxígeno, pueden ser aerotolerantes, lo que quiere decir que puede vivir en ambientes de microaerofilia hasta en anaerobiosis estricta. (21)

Importante destacar que al igual que en las enterobacterias, estas BAL no poseen citocromo c oxidasa, pero a diferencia de ellas, estas no tienen la capacidad de reducir los nitratos a nitritos, y tienen la capacidad de producir ácido láctico como producto final mayoritario de la fermentación de carbohidratos, entre otros. Ahora, para entender mejor estas BAL, es necesario hablar de los nutrientes que requieren para su desarrollo y crecimiento, lo que se relaciona con una de sus funciones metabólicas más importantes, como lo es la fermentación,

la que la realiza en alimentos como la leche, carne y vegetales para obtener productos como el yogurt, quesos, embutidos, mantequilla, crema de leche, entre otros. (20)

Ahora, para hablar de propiedades y características de las BAL, existe un concepto importante, la bioconservación, que hace referencia a extender la vida útil y mejorar la seguridad de los alimentos que utilizan microorganismos y / o sus metabolitos, de esa manera las BAL se utilizan principalmente para este propósito, ya que juegan un papel importante mediante la fermentación en la mejora de la vida útil y la seguridad microbiana, mejoran la textura, el sabor y contribuyen al perfil sensorial agradable del producto final (22).

En cuanto a la capacidad de fermentación de las BAL, estas se subdividen en bacterias homo y heterofermentativas en función de los productos de su metabolismo. Las homofermentativas se caracterizan porque el único producto de la fermentación de los carbohidratos es el ácido láctico, mientras que las segundas pueden originar, además, dióxido de carbono, etanol o ácido acético. Dentro de las BAL, los géneros más utilizados para la obtención de alimentos y bebidas fermentadas son *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y dentro del género *Streptococcus* la especie *S. thermophilus* (21)

Continuando con el tipo de fermentación es necesario hablar primero de las homofermentativas, que usan la glicólisis via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), dando como resultado el ácido láctico como su producto final (Figura 2). En segundo lugar, está la fermentación heterofermentativa, las que usan la vía 6-fosfogluconato/fosfocetolasa (6-PG/PK) o de las pentosas fosfato produciendo cantidades equimolares de ácido láctico, dióxido de carbono (CO₂) y etanol (o ácido acético) como productos principales (Figura 3).

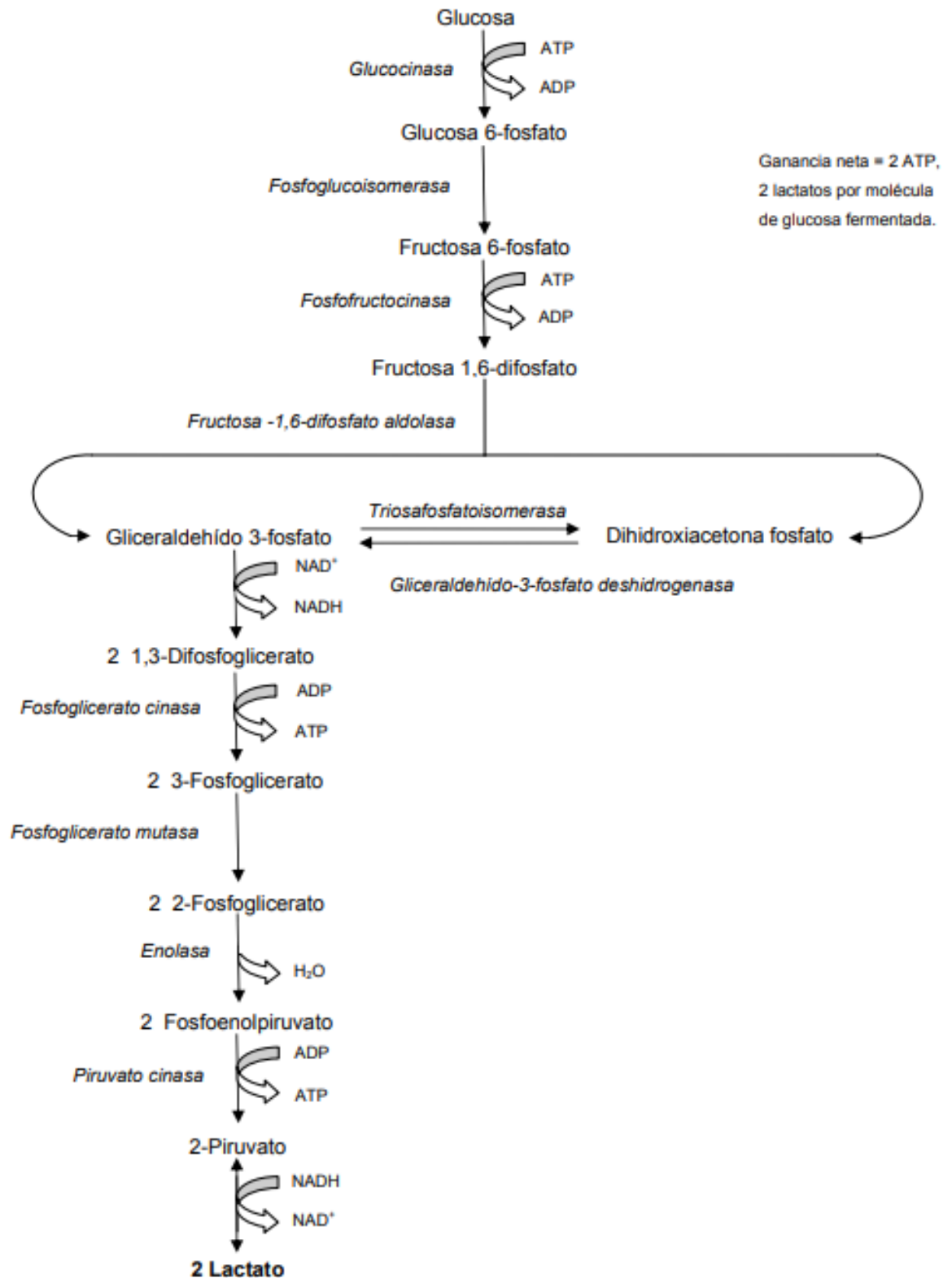


Figura 2. Vía homofermentativa de la glucosa por Bacterias Ácido Lácticas (BAL). Tomado y adaptado de (Axelsson, L. 2004). (23)

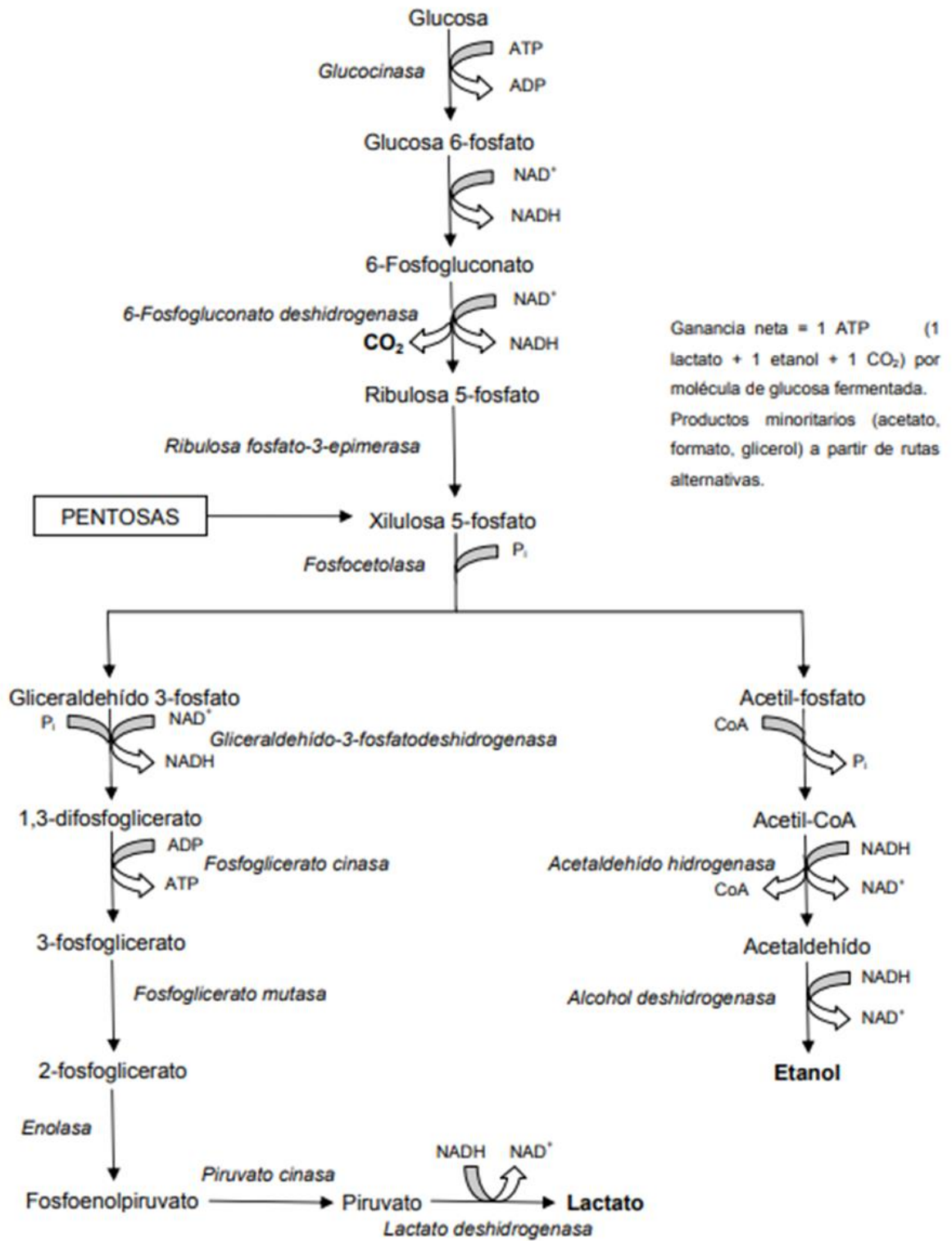


Figura 3. Vía heterofermentativa de la glucosa por Bacterias Ácido Lácticas (BAL). Tomado y adaptado de (Axelsson, L. 2004). (23)

1.6 Aplicación de bacteriocinas en alimentos y farmacología

Como se sabe el desarrollo de conservantes de alimentos naturales es un área de interés creciente para la industria alimentaria. Por esto la aplicación de péptidos antimicrobianos derivados de bacterias puede ser un método simple y natural para preservar los alimentos. Algunas bacterias como las del género *Salmonella spp* que son bacterias Gramnegativa, no formadora de esporas y en forma de bastón, se consideran un agente causante de la gastroenteritis aguda en el tracto gastrointestinal (24), como la *Salmonella typhimurium*, según la OMS es una bacteria omnipresente y resistente que puede sobrevivir varias semanas en un entorno seco y varios meses en agua.

En vista de lo anterior la persistencia de *Salmonella* en entornos de procesamiento de alimentos y matrices de alimentos está asociada con la capacidad de *Salmonella spp.* para formar y residir dentro de biopelículas de una o varias especies. La biopelícula se compone de agregaciones de microorganismos que se adhieren y crecen en superficies abióticas y bióticas y es resistente a las tensiones químicas, físicas y mecánicas, por esto la *S. typhimurium* puede formar una biopelícula en productos vegetales y cárnicos, así como en varias superficies de instalaciones de procesamiento de alimentos, como vidrios, plásticos y metales. (25)

Esta bacteria como se mencionó es capaz de causar infecciones intestinales, de esta forma se encuentra en las heces de personas infectadas, por lo cual una precaria higiene de manos luego de ir al baño y manipular alimentos o si el alimento entra en contacto con otros que están contaminados, este generalmente se contamina y es a lo que se le denomina contaminación cruzada, esta es la causa más común entre las personas infectadas por este tipo de bacterias.

En un estudio Hye-Jin Seo y Seok-Seong Kang investigaron la acción de bacteriocinas purificadas de las cepas de *Pediococcus acidilactici* K10 (bacteriocina K10) y

HW01 (bacteriocina HW01) por su potencial para inhibir la formación de la biopelícula por *Salmonella typhimurium*, donde demostraron que ambas bacteriocinas inhibieron significativamente la formación de biopelículas de *S. typhimurium* en superficies de acero inoxidable y carne de pollo como se muestra en la figura 4, por ende ambas bacteriocinas de *P. acidilactici* podrían ser eficaces agentes anti-biopelículas para controlar contaminación por *S. typhimurium* en matrices de alimentos e instalaciones de procesamiento de alimentos.(26)

Estos resultados los pudieron visualizar por el método de tinción con cristal violeta y su posterior confirmación con análisis de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido (ver figura 5) donde observaron que la biopelícula de *S. typhimurium* se redujo en presencia de bacteriocinas.

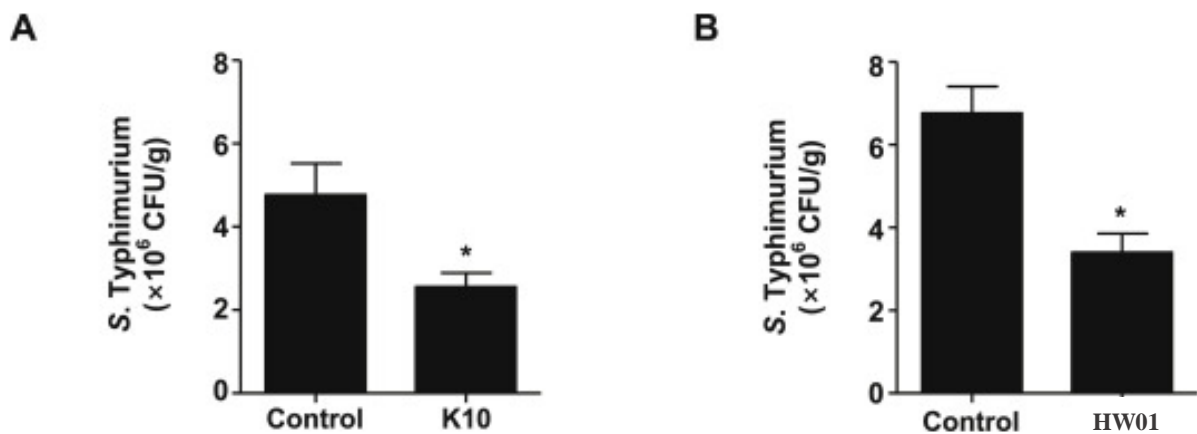


Figura 4. Efecto anti-biofilm sobre la formación de biopelículas de *S. typhimurium* KCTC 1925 en la carne de pollo por la bacteriocina K10 y la bacteriocina HW01 de *P. acidilactici*. **(A)** *S. typhimurium* KCTC 1925 se incubó en primera instancia de forma normal sin agregar bacteriocinas y luego con la bacteriocina K10, donde se observó que la cantidad de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) por gramo se inhibió considerablemente. **(B)** Se realizó el mismo procedimiento, pero en este caso con la bacteriocina HW01, donde de igual forma inhibió considerablemente la formación de biopelícula. Tomado y adaptado de (Seo, H-J. 2020) (26).

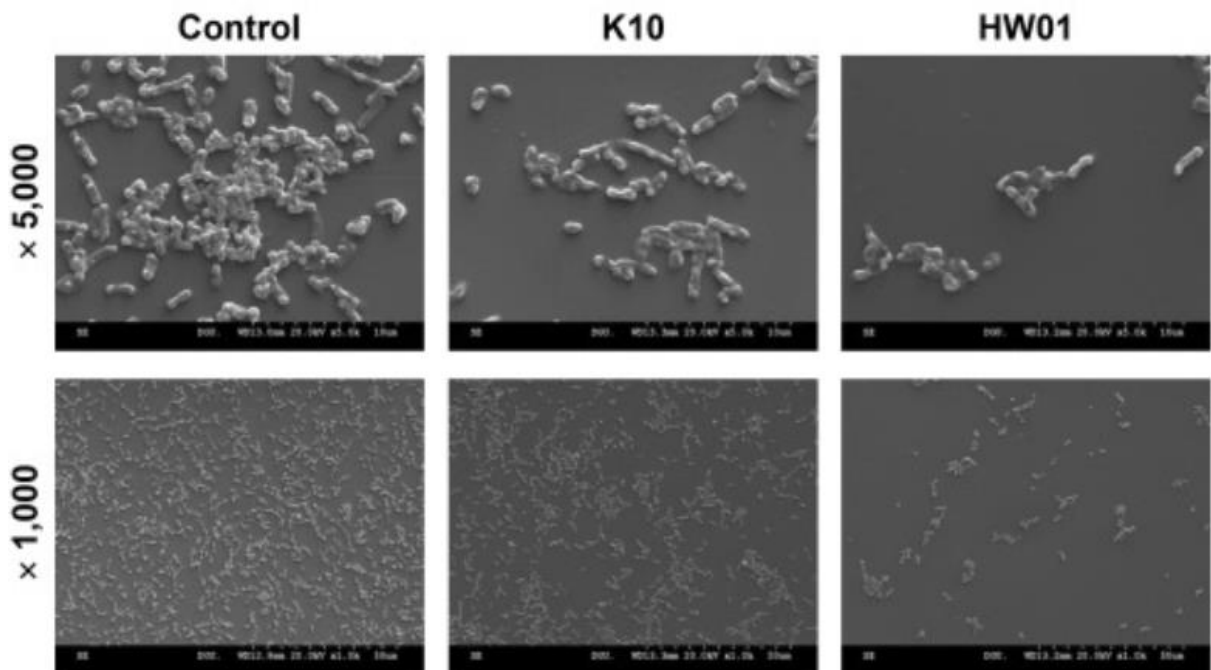


Figura 5. Efecto inhibitorio de la bacteriocina K10 y la bacteriocina HW01 sobre la formación de biopelículas de *S. typhimurium* KCTC 1925. Microscopía electrónica de barrido con aumentos de $\times 1000$ y $\times 5000$. Tomado y adaptado de (Seo, H-J. 2020). (26)

Con el aumento de $\times 5000$, se puede observar el control, donde hay gran cantidad de biofilm formada, luego con K10 este biofilm se encuentra disminuido y finalmente con la bacteriocina HW01 se inhibió más aún que con la bacteriocina K10. En la parte inferior se observa lo mismo que lo anterior pero en aumento de $\times 1000$.

A modo de síntesis de este trabajo de investigación, estos autores obtuvieron resultados positivos para su problemática expuesta y esto se ve reflejado en el extracto de los resultados demostrados, de esta forma, entonces las bacteriocinas K10 y HW01 de *Pediococcus acidilactici*, aparte de inhibir la formación de biofilm in vitro, también pueden reducir su formación en matrices procesadoras de alimentos, asimismo esto los hace objetivo de posteriores investigaciones como productos antimicrobianos con fines de utilización en la conservación de alimentos o evitando infecciones producidas por bacterias como la *Salmonella typhimurium*.

Por consiguiente, Lanhua Yi junto con investigadores presentaron un estudio y la problemática expuesta fue que se necesita con urgencia el control de patógenos transmitidos por alimentos en alimentos crudos / procesados. Por lo anterior ellos detectaron y aislaron bacterias ácido lácticas (BAL) productoras de bacteriocina en encurtidos caseros chinos y carne curada en seco, e identificaron las bacteriocinas implicadas.

Ellos pudieron aislar 81 cepas de BAL de encurtidos y carnes curadas en seco, donde las bacteriocinas de 38 cepas de BAL tuvieron una amplia actividad antibacteriana, algunas inhibieron *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, estas BAL en su mayoría consistieron en *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Staphylococcus* y *Weissella* mediante una identificación con secuencias de ADNr 16s realizada. Estas bacteriocinas aisladas se analizaron y la de mayor efectividad fue la DZ35 producida por *Lactobacillus pentosus* debido a que tenía buena termoestabilidad y amplia adaptación del pH, pero con resistencia parcial a las proteinasas, ya que su actividad antibacteriana se vió afectada parcialmente después del tratamiento con estas. Como conclusión se obtuvo que el encurtido tiene abundantes BAL que producen bacteriocinas donde la DZ35 de *L. pentosus* tiene prometedores potenciales para controlar los patógenos en los alimentos. (27)

Esto investigadores dentro de las BAL encontraron bacteriocinas que actuaban contra bacterias Gram negativo o bacterias Gram positivo, quince bacteriocinas muestran actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivo y Gram negativo, tres bacteriocinas tuvieron buena actividad contra todos los indicadores probados, como se muestra en la Tabla 3. Sin embargo tres bacteriocinas tuvieron mejores actividades contra las bacterias Gram negativo que contra las bacterias Gram positivo, lo cual es opuesto a la mayoría de las bacteriocinas reportadas. (28)

De esta forma las bacteriocinas de bacterias ácido láctico (BAL) son conservadores naturales prometedores de los alimentos y de esta forma también sirven para evitar intoxicaciones alimenticias producidas por estos microorganismos, gracias a su gran espectro

de acción y su eficacia contra estas, incluso en bacterias que hoy en día se están haciendo cada vez más resistentes como lo es por ejemplo la *Pseudomonas aeruginosa* o bacterias que causan la mayoría de intoxicaciones alimenticias como lo es *Staphylococcus aureus*.

Tabla 3: Actividad de inhibición de bacteriocinas de amplio espectro de 3 cepas de BAL contra 6 bacterias nocivas transmitidas por alimentos. Tomado y adaptado de (Lanhua Yi. 2020) (27)

Microorganismo	Diámetro de la zona de inhibición (mm)		
	<i>L. pentosus</i> DZ35	<i>L. paracasei</i> WX322	<i>L. plantarum</i> KZ039
<i>L. monocytogenes</i> CMCC54004	17,6 ± 0,6	16,4 ± 1,5	16,1 ± 0,3
<i>S. aureus</i> ATCC25923	17,2 ± 0,3	14,1 ± 0,9	16,8 ± 0,9
<i>S. typhi</i> CMCC50071	17,6 ± 1,8	19,9 ± 1,1	18,4 ± 1,2
<i>E. coli</i> ATCC25922	20,9 ± 1,0	17,0 ± 2,0	19,2 ± 0,7
<i>C. sakazakii</i> ATCC29544	25,3 ± 1,3	20,4 ± 0,2	24,4 ± 1,2
<i>P. aeruginosa</i> CMCC10104	21,9 ± 1,0	20,3 ± 0,5	19,7 ± 1,2

Como se sabe, la resistencia bacteriana a los antimicrobianos es un tema que ha tomado cada vez más relevancia, en los años recientes la producción de nuevos antibióticos ha disminuido de forma considerable, solo se han desarrollado dos antibióticos nuevos (linezolid y daptomicina) en las últimas tres décadas sin antibióticos nuevos en fases avanzadas de ensayos clínicos plantea una necesidad urgente de desarrollar alternativas adecuadas en el tratamiento de infecciones. (29)

Esto debido a que las bacterias son capaces de desarrollar mecanismos de resistencia, donde los adquiridos y transmisibles son los más importantes y consisten fundamentalmente en la producción de enzimas bacterianas que inactivan los antibióticos o en la aparición de

modificaciones que impiden la llegada del fármaco al punto diana o en la alteración del propio punto diana. (30) Por otro lado existe una resistencia natural o intrínseca en las bacterias, donde en este caso la bacteria no tiene la parte o estructura diana sobre la cual el antibiótico actúa. Por ejemplo todas las bacterias Gram-positivas presentan resistencia a antibióticos de reducido espectro que actúan sólo sobre bacterias Gram-positivas como la vancomicina.

Una cepa bacteriana tiene la capacidad de desarrollar distintos mecanismos de resistencia a la vez, frente a uno o muchos antibióticos y de igual manera un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos y por diversas especies bacterianas. En el ámbito extrahospitalario las enfermedades infecciosas en su mayoría se tratan de forma empírica debido a la dificultad de acceso a cultivos microbiológicos o por la lentitud de los mismos, de esta forma muchas veces el tratamiento debe apoyarse en la causa más probable del cuadro clínico que esté cursando el paciente, sin tener certeza de qué microorganismo esté causando la infección, y de la misma forma, se tratan en base a la sensibilidad que se espera para el patógeno que se cree está causando la infección. (31)

De esta manera muchas veces el patógeno causante de la infección puede que esté generando resistencia a los antibióticos que se utilizan de forma empírica y en vez de eliminar el microorganismo, este se estará haciendo más resistente (por distintos mecanismos), lo mismo pasa cuando para un microorganismo no se da el tratamiento adecuado en base a su antibiograma correspondiente y se administran antibióticos de amplio espectro, llevando a matar a otras bacterias aparte de la causante del cuadro y aumentando la resistencia.

Como se ha mencionado en el subcapítulo anterior, las bacterias Gram negativo son intrínsecamente resistentes a las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivo debido a la presencia de la membrana externa (membrana plasmática que impide que los péptidos alcancen su objetivo). Sin embargo, una combinación de bacteriocinas como por ejemplo

Nisina con EDTA o ácidos orgánicos o algún compuesto que interrumpa la membrana externa puede mejorar la susceptibilidad peptídica de las bacterias Gram-negativas (32).

Las bacteriocinas de BAL son activas en un amplio rango de pH y son inherentemente tolerantes al alto estrés térmico. Además, estos péptidos se degradan fácilmente por las enzimas proteolíticas y no viven mucho tiempo en el cuerpo humano o el medio ambiente, lo que minimiza la oportunidad de que las cepas diana interactúen con fragmentos degradados y, en consecuencia, tienen una baja propensión al desarrollo de resistencia.(33)

Es por esto que se han realizado investigaciones en la industria farmacéutica con propósito de utilizar bacteriocinas a modo de nuevos antimicrobianos, así como un estudio realizado por Raj Kumar Thapa junto a otros investigadores donde estudian el uso de péptidos de garvicina KS para aplicaciones tópicas sobre heridas crónicas infectadas. Como se sabe los péptidos antimicrobianos presentan una naturaleza catiónica, hidrófoba o anfipática y exhiben diversas actividades biológicas contra bacterias, virus, hongos y protozoos, donde las bacteriocinas son el subconjunto de estos péptidos antimicrobianos. (34)

En la búsqueda del desarrollo de una alternativa antibiótica, se identificó un nuevo grupo de bacteriocina multipéptido (Garvicin KS; GarKS) a partir de *Lactococcus garvieae* KS1546, GarKS se compone de tres péptidos GakA, GakB y GakC, de tamaño a 34, 34 y 32 aminoácidos, respectivamente. El espectro inhibitorio de GarKS incluye patógenos de los géneros *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria* y *Enterococcus*. (35)

El desarrollo de la formulación tópica de bacteriocina requiere evaluaciones previas a la formulación para determinar la seguridad y eficacia potenciales de los péptidos. Hasta ahora, no ha habido informes sobre la estabilidad y la viabilidad de las células de fibroblastos y análisis de proliferación de péptidos GarKS individuales y sus combinaciones.

Por lo anterior, el objetivo de estos investigadores para este estudio fue determinar la estabilidad fisiológica dependiente de los fluidos y la temperatura de los péptidos GarKS individuales y combinados. Además, evaluaron las actividades antimicrobianas de péptidos individuales y combinados en *S. aureus* (cepas sensibles y resistentes a meticilina); y se evaluaron los efectos de los péptidos sobre la viabilidad y proliferación de células de fibroblastos para determinar su idoneidad para el desarrollo de una formulación tópica optimizada.

En cuanto a sus resultados, el análisis de estabilidad química de péptidos. Se realizó análisis de estabilidad de GakA, GakB y GakC disuelto en agua Milli-Q, PBS y fluido de herida simulado e incubado a diferentes temperaturas (25 y 37 ° C) hasta 5 días, donde los tres péptidos fueron químicamente estables en agua Mili-Q y PBS, sin embargo hubo un aumento en la degradación de los tres péptidos por separado al quinto día en PBS en comparación al agua Mili-Q, pero no significativa. En cambio, en el fluido simulado de herida sí hubo degradación de estos péptidos, donde el orden general de las reducciones del contenido de péptidos en el fluido de la herida simulado fue GakB > GakC > GakA. (35)

Luego se realizó el análisis de estabilidad de GakA, GakB y GakC en diferentes combinaciones (GakA + GakB, GakB + GakC, GakA + GakC y GakA + GakB + GakC) disueltos en PBS y fluido de herida simulado e incubados a diferentes temperaturas (25 y 37 ° C) hasta 5 días. Donde entre la combinaciones, el contenido de GakA fue menor que GakB o GakC. En GakA + GakB se evidenció un mayor contenido de GakB, en GakA + GakC se observó un mayor contenido de GakC, y en GakA + GakB + GakC se observaron mayores contenidos de GakB y GakC.

Es importante destacar que, en el fluido de la herida simulado, la suma de los contenidos de péptidos individuales fue mayor para GakA + GakB seguido de GakA + GakC. De esta manera esto indica que se requiere una evaluación cuidadosa de las combinaciones de péptidos y los perfiles de estabilidad para determinar la composición óptima para el

desarrollo de la formulación, ya que como se vió, estos péptidos por separado y en combinaciones tienen diferentes formas de estabilidad y funcionalidad. (36)

Ahora el resultado más importante para esta revisión es como se comportaron estos péptidos de bacteriocina frente a microorganismos, en este caso los investigadores hicieron determinación de la actividad antimicrobiana en cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) y *Staphylococcus aureus* meticilina sensible (MSSA) como se muestra en la tabla 4, donde se midió la capacidad mínima inhibitoria de estos péptidos y sus combinaciones.

Tabla 4. Determinación de MIC de GakA, GakB, GakC y sus combinaciones.

Tomado y adaptado de (Thapa, R-K. 2020) (36)

Péptido	MIC	
	MSSA	MRSA
Gak A	6.25 μ M	12.50 ~ 25.00 μ M
Gak B	25.00 ~ 50.00 μ M	> 100.00 μ M
Gak C	12.50 μ M	25.00 μ M
Gak A + Gak B	1.562 μ M	1.562 μ M
Gak B + Gak C	6.25 μ M	6.25 μ M
Gak A + Gak C	6.25 ~ 12.50 μ M	12.50 μ M
Gak A + Gak B + Gak C	0.781 ~ 1.562 μ M	1.562 μ M

En esta tabla se demuestra que de los tres péptidos por separados el GakA necesita una concentración menor para inhibir tanto a MSSA como MRSA, seguido por GakC y posteriormente GakB. Los valores de MIC fueron más altos para MRSA en comparación con MSSA atribuible a posibles mecanismos (ya sea por la producción de enzimas capaces de hidrólisis o por adquisición de genes modificados) responsables del desarrollo de resistencia en microorganismos y en general. Ahora en cuanto a las combinaciones, estas pueden presentar efectos sinérgicos en cepas bacterianas no resistentes y resistentes al atacar

múltiples mecanismos de destrucción bacteriana o al mejorar la estabilidad y las interacciones de los componentes con los microorganismos objetivo.

Los valores de MIC para las combinaciones de péptidos fueron más bajos en comparación con los péptidos individuales a la misma concentración. En las MIC de combinaciones para MSSA, las combinaciones GakA + GakB + GakC y GakA + GakB, presentaron una menor MIC, seguida de GakB + GakC y finalmente GakA + GakC. Los valores de MIC para las combinaciones en MRSA estaban en el mismo orden que en MSSA. El mecanismo de la actividad antimicrobiana aún no está claro, sin embargo, la formación de una unidad funcional como se informó anteriormente podría haber llevado a la actividad sinérgica.

Por lo tanto, a modo de conclusión de este estudio, ellos delucidaron que este tipo de bacteriocinas y los efectos antimicrobianos de los péptidos fueron dependientes de la concentración y los valores de MIC variaron entre los péptidos y sus combinaciones, de esta forma se demostró que son útiles para tratar bacterias como el MRSA y MSSA, sin embargo de todos los péptidos y sus combinaciones, sólo GakA + GakB demostró ser una combinación potente para el desarrollo de formulaciones tópicas. De igual forma se deben hacer más estudios basados en la efectividad de estos péptidos antimicrobianos y su viabilidad o comportamiento sobre tejido celular vivo.

Como se ha estado hablando a lo largo de esta revisión, las bacterias cada vez son más resistentes a los diferentes antibióticos que existen, es por eso que se buscan antibióticos nuevos u otras formas terapéuticas que puedan actuar contra bacterias, así como por ejemplo la terapia combinada, donde esta última es más viable y llamativa para investigadores debido a que buscar un nuevo antibiótico es un proceso largo y que las bacterias pueden comenzar a desarrollar resistencia en un corto periodo, por lo cual el uso de antibióticos ya existentes es fundamental para una terapia combinada y esta ser una forma más viable.

Como se sabe, pueden haber productos químicos, peptídicos o antibióticos como tal donde su uso está limitado a la fisiología del cuerpo humano, donde quizás este producto antibacteriano tenga buenos resultados in vitro, pero las concentraciones para poder ser administrados a una persona y que obtenga los mismos resultados se consideran muy altas, ya que los efectos secundarios o contraindicaciones son graves (como el cloranfenicol) y al final pueden causar más daños que el microorganismo que se quiere matar o inhibir. (37)

En vista de lo anterior, antibióticos como el cloranfenicol en muchos lugares se está prohibiendo, en base a que la concentración que se utiliza para matar o inhibir el crecimiento bacteriano muchas veces tiene contraindicaciones o efectos adversos graves para el ser humano, sin embargo, este antibiótico en combinación con otro producto sintético o natural como por ejemplo bacteriocinas, pueden ser un objetivo de investigación, así es como lo vieron Danesh, Ljungh, Mattiasson y Mamo, investigadores que realizaron un estudio en base a la posibilidad de sinergismo entre un agente antibacteriano no antibiótico (bacteriocina) y un antibiótico como lo son la haloduracina y el cloranfenicol respectivamente, contra bacterias Gram positivo de importancia clínica.

La haloduracina es una nueva bacteriocina lantibiótica de dos componentes producida por un *Bacillus* alcalofílica, este lantibiótico es efectivo ante diferentes bacterias Gram positivo aún con concentraciones muy bajas. (38) Además, a diferencia de muchas otras bacteriocinas como la nisina y las lactostrepcinas, es operacionalmente estable en condiciones fisiológicas, esta característica hace que sea ideal para la terapia de combinación con otros agentes antimicrobianos. El cloranfenicol tiene ciertas propiedades deseables, como es un antibiótico de amplio espectro, se difunde eficientemente en el cuerpo y no se ioniza en condiciones fisiológicas, sin embargo, su toxicidad relacionada con la dosis que causa patologías como neuropatía óptica, anemia aplásica, leucemia, supresión de la médula ósea, entre otras han restringido su uso. (39)

Referente al estudio realizado por Danesh, et al, como se dijo aborda la evaluación del posible efecto sinérgico de la haloduracina y el cloranfenicol contra los patógenos Gram positivo con el objetivo de reducir la dosis efectiva de cloranfenicol. En cuanto a sus resultados en primer lugar ellos definieron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para cada microorganismo, lo que se puede ver en la tabla 5, por consiguiente estos investigadores analizaron el crecimiento bacteriano sometiendo las bacterias a sus concentraciones mínimas inhibitorias, esto lo fueron midiendo en tres tiempos, a las hora 9 de iniciar la incubación con cloranfenicol, haloduracina y cloranfenicol + haloduracina, a la hora 12 y finalmente a la hora 24, lo que se observa en la tabla 6.

Tabla 5. Concentraciones de cloranfenicol y haloduracina seleccionadas para el estudio de efecto sinérgico. Tomado y adaptado de (Danesh, A. 2017) (40)

Microorganismo	Cloranfenicol (µg / ml)	Haloduracina (µg / ml)
<i>Streptococcus</i> grupo A (CCUG 4207)	1,5	2,2
<i>Streptococcus</i> grupo B (CCUG 4208)	3	2,2
<i>Streptococcus</i> grupo C (ATCC 12388)	1,5	2,5
<i>Enterococcus faecium</i> (CCUG 36804)	10	4,3
<i>Enterococcus faecalis</i> (CCUG 9997)	4	6,5
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCUG 15915)	4	5,4

En la tabla anterior como se dijo, se utilizaron cepas ATCC y CCUG para distintas bacterias Gram positivo de importancia clínica, donde investigaron en primer lugar la CMI de cada bacteria, las que se sometieron a un rango de concentraciones de Cloranfenicol y de Haloduracina. Para esto las bacterias fueron cultivadas en caldo soja tripticasa y la determinación de concentraciones se hizo mediante la lectura de la absorbancia generada por la turbidez del crecimiento bacteriano, la que es directamente proporcional a la cantidad de bacterias en el medio de cultivo, por lo mismo al colocar el cultivo bacteriano en presencia de la haloduracina o cloranfenicol a diferentes concentraciones, si estos inhiben el crecimiento bacteriano la turbidez será menor e indicará menor cantidad de bacterias en el cultivo.

Tabla 6. Los efectos antimicrobianos de las combinaciones de haloduracina, cloranfenicol y haloduracina+cloranfenicol contra bacterias clínicamente importantes.

Tomado y daptado de (Danesh, A. 2017) (40)

Microorganismo	Haloduracina			Cloranfenicol			Haloduracina más cloranfenicol		
	9	12	24	9	12	24	9	12	24
<i>Streptococcus</i> (grupo A)	83±13	95 ± 20	126±7	79±4	74 ±3	76±7	29±12	32±18	36±22
<i>Streptococcus</i> (grupo B)	97±4	117 ± 1	107± 1	76±3	90±5	87±3	32± 1	27± 2	30±0.5
<i>Streptococcus</i> (grupo C)	111± 5	116,5±3	121±2	63±3	63±2	64±4	19± 1	31±5	46±1
<i>Enterococcus faecium</i>	73±10	82±7	80± 6	89±1	80±2	79±2	12±2	6±0.5	5± 1
<i>Enterococcus faecalis</i>	97±7	102±4	135±3	76±6	81±4	101±5	20 ±3	27± 4	71±11
<i>Staphylococcus aureus</i>	68±1	84±2	85±2	68±2	80±0,1	79±4	44±2	49 ±1	52±4

En la tabla anterior se observó la actividad bacteriana en presencia de la bacteriocina, el antibiótico y ambos juntos, donde en primer lugar la haloduracina en pocas cepas logró inhibición del crecimiento. Siguiendo por el lado del Cloranfenicol, ocurrió lo mismo que con la haludoracina, presentó inhibición de crecimiento bacteriano en algunas cepas pero no son significativos. Ahora, se puede ver que la haloduracina en conjunto con el cloranfenicol logran un gran porcentaje de inhibición, como se ve en la tabla 6 por ejemplo para el *Enterococcus faecium*, con la haloduracina y cloranfenicol por separado el crecimiento es casi el mismo a la hora 9, pero si se observa el efecto de ambos antimicrobianos juntos a la hora 9 presentan un sinergismo notable y el crecimiento es mucho menor.

A modo de resumen de este estudio, la haloduracina y el cloranfenicol al usarse combinados muestran un efecto sinérgico contra los patógenos de importancia clínica estudiado, por lo anterior la sinergia resultante abre la posibilidad de reducir la dosis efectiva de cloranfenicol de manera tal que se puedan minimizar sus efectos secundarios negativos en

las personas, eliminando riesgos como la anemia aplásica, leucemias, etc. Esto muestra una nueva ventana de uso de antibióticos y bacteriocinas en terapia combinada.

Tabla 7. Resumen subcapítulos Bacterias Gram negativo y Gram positivo. (Castillo, Omar. 2020)

	Bacterias Gram negativo productoras de bacteriocinas	Bacterias Gram positivo productoras de bacteriocinas
Generalidades	Bacilos Gram negativo, móvil, no esporulados, catalasa positiva, anaerobias facultativas, sin citocromo c oxidasa, reducen nitratos a nitritos, la mayoría produce ácido de la fermentación de la glucosa.	BAL son cocos o bacilos Gram positivo, inmóviles, no esporulados, catalasa negativa, anaerobios facultativos, sin citocromo c oxidasa, no reducen nitratos a nitritos, capacidad de producir ácido láctico como producto final mayoritario de la fermentación de carbohidratos.
Clasificación	Desde el punto de vista clínico, se pueden clasificar en dos grupos, enterobacterias patógenas primarias (<i>Salmonella enterica</i> , <i>Shigella spp.</i> , <i>Yersinia spp.</i> y algunas cepas de <i>Escherichia coli</i>) que producen principalmente cuadros gastrointestinales y enterobacterias oportunistas (<i>Serratia spp.</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Providencia spp.</i> y algunas cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>)	Principalmente las Bacterias Ácido-Lácticas (BAL), las constituyen un grupo heterogéneo de géneros que comparten muchas características fisiológicas. Las BAL pertenecen al phylum <i>Firmicutes</i> que comprende alrededor de 20 géneros, pero sólo son 12 los que tienen mayor relevancia (Ver Tabla 2)
Propiedades y características	Numerosas aplicaciones como biocontrol en la agricultura, el control de enfermedades	Se utilizan en bioconservación de alimentos, mejorando sus características y extendiendo su

	<p>infecciosas, anticancerígenos, residuos biológicos y biorremediación que utilizan miembros de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>.</p>	<p>agentes de reciclaje de la industria farmacológica.</p> <p>duración. Un potencial uso es en la industria farmacológica.</p>
Bacteriocina más estudiada	<p>Colicina (<i>Escherichia coli</i>), en la actualidad son estudiadas con mayor relevancia otras enterobacterias.</p>	<p>Nisina (<i>Lactococcus lactis subesp. lactis</i>), sin embargo en la actualidad las más estudiadas son del Phylum <i>Firmicutes</i> del género <i>Lactobacillus</i>.</p>

Tabla 8. Resumen subcapítulo generalidades de bacteriocinas. (Castillo, Omar. 2020)

	Estudio	Resultados
Bacteriocinas en alimentos	<p>Efecto inhibitorio de una bacteriocina producida por <i>Pediococcus acidilactici</i> en la formación de biofilm de <i>Salmonella Typhimurium</i> (Hye-Jin Seo y Seok-Seong Kang)</p>	<p>Bacteriocinas K10 y HW01 de <i>Pediococcus acidilactici</i>, inhiben la formación de biofilm de <i>Salmonella Typhimurium</i></p>
	<p>Detección de bacterias de ácido láctico productoras de bacteriocina en encurtidos caseros chinos y carne curada en seco, e identificación de bacteriocina por secuenciación del genoma. (Yi Lanhua, Qi T, Hong Y, Deng LL, Zeng KF).</p>	<p>De las bacteriocinas de las BAL aisladas, 15 mostraron actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivo y Gram negativo, 3 tuvieron buena actividad contra todos los indicadores probados. Sin embargo, otras 3 tuvieron mejor actividad en bacterias Gram</p>

negativo que Gram positivo, opuesto a la mayoría de las bacteriocinas reportadas.

	Estudio	Resultados
	Estudios de preformulación sobre nuevos péptidos de garvicina KS para aplicaciones tópicas (Raj Kumar Thapa, Hanne Cecilie Winther-Larsen, Dzung B. Diep, Hanne Hjorth Tønnesen)	Bacteriocinas GarKS y sus tres péptidos demostró que son útiles para tratar bacterias como el MRSA y MSSA. GakA + GakB demostró ser una combinación potente para el desarrollo de formulaciones tópicas.
Bacteriocinas en farmacología	Efecto sinérgico de la haloduracina y el cloranfenicol contra bacterias Gram positivo clínicamente importantes (Danesh A, Ljungh Å, Mattiasson B, Mamo G.)	La haloduracina en combinación con el cloranfenicol muestran un efecto sinérgico contra los patógenos estudiados. La sinergia resultante abre la posibilidad de reducir la dosis efectiva de cloranfenicol y minimizar sus efectos secundarios negativos en las personas. Esto muestra una nueva ventana de uso de antibióticos y bacteriocinas en terapia combinada

1.7 Purificación y efectos fisicoquímicos de bacteriocinas

Como se sabe, las bacteriocinas son producidas por distintos tipos de bacterias, ya sea Gram negativo como Gram positivo, sin embargo, estas bacteriocinas son liberadas hacia el ambiente donde se encuentren estas bacterias, de modo que para hacer uso de estas en investigaciones, es necesario extraerlas de ese medio para posteriormente utilizarlas, en los subcapítulos anteriores ya se ha mencionado los usos y formas en que pueden actuar las bacteriocinas, sin embargo, ¿qué pasaría si estas sustancias poliméricas se utilizan en conjunto con péptidos antibacterianos?, ¿Presentarán un efecto sinérgico o serán más resistentes a factores físico-químicos?, son algunas de las interrogantes que se abordarán a continuación.

Las bacteriocinas según estudios realizados, entre ellos uno de Piard y Desmazeaud describen que estas son producidas por las bacterias en su fase logarítmica o exponencial, y que la cantidad de estas dependen de la cantidad de bacterias que se desarrollen, y a su vez dependiendo del medio de cultivo donde estén creciendo, debido a que, algunos de los nutrientes del medio de cultivo pueden afectar la producción de bacteriocinas, ya sea aumentando o disminuyéndolas, como lo es el extracto de levadura, manitol, manganeso, etc. (41)

Si bien a lo largo de esta revisión se ha hablado de varios aspectos de bacteriocinas, como su clasificación, mecanismo de acción, etc. Sin embargo, aún no se ha hablado de su purificación y este es un punto importante ya que la forma de purificación de estos péptidos también puede afectar su actividad antibacteriana y estabilidad, es por esto que a continuación se mostrará una forma de purificación donde será la bacteriocina AS-48 de una cepa de *Enterococcus faecium* la purificada.

En primer lugar, la cepa de *E. faecium* 7C5 que es la productora de bacteriocina, se cultivó en un caldo M17 durante 11 horas a 37°C, luego estas células se separaron por centrifugación a una velocidad de 9.000 g durante 30 minutos a 4°C y se añadió lentamente sulfato de amonio al sobrenadante hasta una concentración final de 3,5 M, luego se volvió a centrifugar el sedimento resultante a 10.000 g a 4°C por 1 hora y el sedimento resultante se solubilizó con un tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7,0) en un volumen mínimo y con EDTA 2,5 mM. Por consiguiente, la solución de proteína (bacteriocina) resultante se aplicó a una columna Sephadex G-100, que es un medio de filtración de gel utilizado en las cromatografías de proteínas, y se equilibró la solución con el mismo tampón que contenía sulfato de amonio 0,3 M. (42)

Cabe destacar que al ir realizando el proceso de filtración se fue controlando la actividad inhibitoria de esta bacteriocina sobre fracciones de *Listeria innocua* en las cromatografías de filtración. A continuación, se realizó una elución con el tampón de equilibrado y las fracciones que presentaban actividad anti-listerial se agruparon y concentraron por ultrafiltración en una celda Amicon (esta celda de amicon permite realizar ultrafiltración de proteínas y permite intercambiar tampones de muestras de proteínas). La solución concentrada (volumen final ~ 8 ml) se aplicó a una columna de fenil-Sepharos, equilibrada con tampón fosfato de potasio 50 mM (pH 7,0), EDTA 2,5 mM, sulfato amónico 0,3 M. La columna se desarrolló con un gradiente lineal de sulfato de amonio 0.3-0 M en el mismo tampón de fosfato de potasio. (42)

Las fracciones con actividad anti-listerial se encontraron cerca del final del gradiente (~ 0,03 M de sulfato de amonio) y se agruparon, concentraron y desalaron mediante ultrafiltración en una celda Amicon, intercambiando el tampón inicial con 10 mM. tampón de acetato de sodio (pH 5,35) (volumen final ~ 5 ml). A continuación, la solución se cargó en una columna de intercambio iónico SP-Sepharose de flujo rápido, equilibrada con el último tampón. La bacteriocina se eluyó de la columna al final de un gradiente lineal de NaCl 0-1 M. Después de este paso cromatográfico, la bacteriocina era casi pura según el análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).(42) Entonces, a modo de

síntesis, la purificación de la bacteriocina producida por *E. faecium* 7C5 se logró mediante tres etapas cromatográficas que consistieron en filtración en gel, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio catiónico.

Por otro lado, las bacteriocinas al igual que otros péptidos antibacterianos al ser proteínas son susceptibles a cambios de pH, a la exposición a diferentes temperaturas, a enzimas proteolíticas, etc. pero, esto aún no está bien definido ya que las bacteriocinas son una línea de investigación más reciente y todas estas no han sido bien caracterizadas aún, sin embargo, muchas de estas han sido utilizadas en investigaciones por sus propiedades antibacterianas y como nueva forma de tratar bacterias resistentes a antibióticos en el área de la salud, así como también se han realizado investigaciones en la industria de alimentos para evitar contaminación de los alimentos y una posterior intoxicación en las personas, de modo que para esto se han realizado múltiples formas de agregar bacteriocinas a alimentos, principalmente usando sustancias poliméricas como matriz, pero existen pocos estudios acerca del comportamiento de estas sustancias antibacterianas encapsuladas en sustancias poliméricas.

Dado a lo anterior, Magdalena Jiménez-Hernández, et al, realizaron una investigación para analizar el efecto del pH y la Temperatura en la liberación de la bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* ITV 26 encapsulada en una matriz de alginato-almidón. Para este proceso de encapsulación de la bacteriocina lo realizaron por medio de gelificación iónica y extrusión. En un matraz colocaron 50 mL de bacteriocina en extracto crudo con un pH 6.8, y 50 mL de la solución de alginato de calcio-almidón a una concentración 1% (p/v), luego con una jeringa extruyeron la matriz en una solución de CaCl_2 al 0.3 M. Las capsulas que obtuvieron las filtraron a través de papel Whatman, para su posterior uso. La matriz de alginato de calcio la prepararon a una concentración del 2% y le agregaron almidón al 8% y completaron un volumen de 50 mL con agua destilada, donde finalmente se esterilizó a 115°C por 5 min, y quedó listo para el uso. (43)

En sus primeros ensayos, obtuvieron que la bacteriocina en la matriz de alginato-almidón, pudo inhibir el crecimiento bacteriano, sin embargo, al pasar unas horas esta fue disminuyendo su actividad, pero de todas formas aún tenían acción antibacteriana, no se eliminó por completo, lo cual indica que este péptido puede ser estable en función del tiempo. Ahora estos investigadores estudiaron el efecto del pH en estas bacteriocinas encapsuladas, estudiando un pH 7.0 y un pH 6.0 donde no se demuestran diferencias significativas y ellos establecen que puede ser estable a un rango de pH de 1.0 a 9.0. Por otro lado, en cuanto a la actividad antibacteriana del péptido encapsulado estudiado a 15°C y 37°C, donde utilizaron *Listeria innocua* AST-062 para ver la actividad antibacteriana del compuesto en estudio y si bien esta bacteria a Temperatura de 15°C presenta menor crecimiento que a 37°C, igual demostró inhibición de su crecimiento al estar en contacto con el péptido encapsulado, por lo cual se demuestra que la bacteriocina aún presenta acción en temperaturas bajas como lo es a 15°C y puede ser ocupada en un rango de 15 °C a 37 °C. (43)

CAPÍTULO 2: USO DE LOS COMPUESTOS POLIMÉRICOS COMO MATRICES DE BACTERIOCINAS Y OTROS ANTIMICROBIANOS

2.1 Polímeros

Los polímeros son macromoléculas que pueden ser de origen natural, semisintéticos o bien sintéticos, donde a estos últimos comúnmente se les denominan “plásticos”, a grosso modo todos los objetos materiales están constituidos o llevan algún tipo de polímero en su estructura. Es por lo anterior que en esta revisión se abordarán los polímeros con potencial de uso en la industria farmacológica y alimentaria (conservación de alimentos) como matrices para encapsular bacteriocinas y otros compuestos antibacterianos.

2.2 Clasificación de sustancias poliméricas

➤ **Los polímeros se pueden clasificar en base a:**

✓ **Origen:**

- Naturales: son aquellos de origen completamente natural, provenientes de la naturaleza, como los aminoácidos, carbohidratos o las proteínas.
- Semisintéticos: estos se pueden obtener a partir de los polímeros naturales, realizándoles procedimientos para cambiar su estructura y obtenerlos.
- Sintéticos: obtenidos de forma completa en industrias mediante el manejo de monómeros orgánicos generando polímeros sintéticos. (44)

✓ **Estructura:**

- Lineal: los monómeros se enlazan entre sí formando una cadena carbonada continua.

- Ramificados: los monómeros se enlazan entre sí, pero desde la cadena lineal principal se generan ramificaciones. (45)

✓ **Unión de sus monómeros:**

- Homopolímeros: son polímeros compuestos de un mismo monómero que se va repitiendo a lo largo de toda la cadena.
- Copolímeros: estos compuestos por lo general son más útiles que los homopolímeros ya que se pueden ir mezclando diferentes monómeros con propiedades diferentes, lo que puede hacer, por ejemplo, que un polímero tenga la característica de poder moldearse con el calor y elasticidad, no así los homopolímeros que sólo puede poseer sólo la que posea el monómero que lo conforme.
 - Copolímeros alternado: compuestos por dos o más moléculas que se reiteran sucesivamente en la cadena uno tras el otro y van siguiendo un orden.
 - Copolímeros en bloque: en este caso los monómeros de un mismo tipo se agrupan a un lado de la molécula y los monómeros de otro tipo se agrupan en otra zona de la molécula.
 - Copolímeros al azar: no existe ningún orden en la ubicación de los monómeros dentro de la molécula y pueden ser lineales o ramificados. (46)

✓ **Estructura química:**

- Orgánicos: son aquellos polímeros donde la cadena de moléculas está compuesta primordialmente por carbono (C).
- Orgánicos vinílicos: estos presentan en su mayoría átomos de carbono, pero también son combinados con otras formaciones de halógenos, estirenos u olefinas.

- Orgánicos no vinílicos: en su estructura presentan moléculas como el oxígeno (O) y nitrógeno (N), sin embargo, igual tienen átomos de carbono.
- Inorgánicos: estos pueden estar conformados por moléculas de azufre (S) o silicio (Si). (47)

✓ **Comportamiento térmico:**

- Termoplásticos: estos polímeros tienen la característica de poder ser moldeados fácilmente al calentarse.
- Termoestables: son aquellos que, al calentarse, se descomponen químicamente y no pueden ser moldeados como los termoplásticos. (48)

2.3 Aplicación de las bacteriocinas encapsuladas en sustancias poliméricas en industria alimenticia y farmacéutica

L. monocytogenes afecta principalmente a mujeres embarazadas, recién nacidos y hospederos inmunodeprimidos. Esta bacteria es de gran importancia clínica porque presenta una amplia distribución, pudiendo aislarse de suelo, agua, vegetales y contenido fecal de una amplia gama de animales; es un contaminante común de alimentos frescos y procesados, de origen animal y vegetal (hortalizas), leche y lácteos no pasteurizados, carne de vaca, cerdo y aves, embutidos ahumados o fermentados y pescados ahumados. Es capaz de producir biofilm en alimentos, crece a temperaturas de refrigeración, resiste condiciones adversas de pH y altas concentraciones de NaCl. Dadas estas características y el hecho de ser ubicua, *L. monocytogenes* tiene muchas oportunidades de entrar a las líneas de producción de alimentos y colonizar (en 1 a 10% causa portación transitoria) o enfermar a quienes la ingieren. (49)

Dado a lo anterior y resaltando que, si bien muchas de las bacteriocinas estudiadas han mostrado efectividad contra algunas cepas de bacterias en diferentes industrias, al igual que variados tipos y compuestos de sustancias poliméricas, sin embargo, poco se sabe e

investigado acerca del uso combinado de estas. Deyci Rodríguez y Renate Schöbitz realizaron una investigación donde utilizaron una película antimicrobiana hecha a base de proteína de suero lácteo y bacterias lácticas productoras de bacteriocinas, de modo que estas proteínas de suero lácteo sirven de matriz para las bacterias productoras de bacteriocinas resultando en un compuesto capaz de ser aplicado sobre los alimentos, en este caso se utilizó salmón ahumado con el fin de controlar a *Listeria monocytogenes*. (50)

La biopelícula que estos investigadores sintetizaron contenía como compuestos principales una solución acuosa de concentrado de proteínas de suero lácteo y glicerol, a los que se les controló y ajustó el pH a 7,0 y 8,0 y posteriormente fue sometida a un baño termostatado y luego de eso en un baño de agua con hielo para que tuviera con condiciones óptimas para agregar el concentrado de células, que en este caso fueron dos cepas de *Carnobacterium spp* productoras de bacteriocinas aisladas de diferentes alimentos y denominadas BAL-A y BAL-B, luego estos investigadores depositaron una cantidad de 15 ml por cada placa Petri con el fin de poner a secar este compuesto para finalmente obtener la película y poder ser aplicada en el alimento (ver figura 6), en este caso el salmón ahumado inoculado con *Listeria monocytogenes*.

Cabe destacar que se sintetizaron diferentes películas, donde lo que iba cambiando es el compuesto antimicrobiano, por lo cual se sintetizó una película con la cepa BAL-A, otra con la cepa BAL-B, otra con ambas cepas (BAL-A + BAL-C), otra con nisina y finalmente una con nisina + cepas BAL-A y BAL-B, esto para luego de aplicadas las películas con diferentes antimicrobianos, poder evaluar la viabilidad de estos y la de *L.monocytogenes*, de modo que se pueda ver qué película presenta mejor acción contra esta bacteria causante de infecciones.



Figura 6. Modelo de película del concentrado de suero lácteo con bacterias ácido-lácticas.

Se muestra la película formada a la que se le agregó un concentrado de bacterias productoras de bacteriocinas, la que será utilizada para recubrir salmón ahumado inoculado con *L. monocytogenes*, y finalmente realizar un estudio de viabilidad tanto de las cepas productoras de bacteriocinas como de la *L. monocytogenes*. Tomado de (Rodríguez, Deyci. 2009) (50)

Estos investigadores si bien evaluaron la viabilidad de las dos cepas de BAL al pH y temperaturas de estudio antes de sintetizar las películas, también las evaluaron luego de sintetizadas a pH 8,0 y las almacenaron por 15 días a 7°C, para cerciorarse de que estas no se vieran inhibidas o afectadas al estar en forma de películas generando un sesgo en el estudio donde se puede pensar que estas no tienen acción sobre *Listeria monocytogenes* inoculada en el salmón ahumado, pero más bien son inhibidas en estas condiciones, lo que se puede ver en la figura 7.

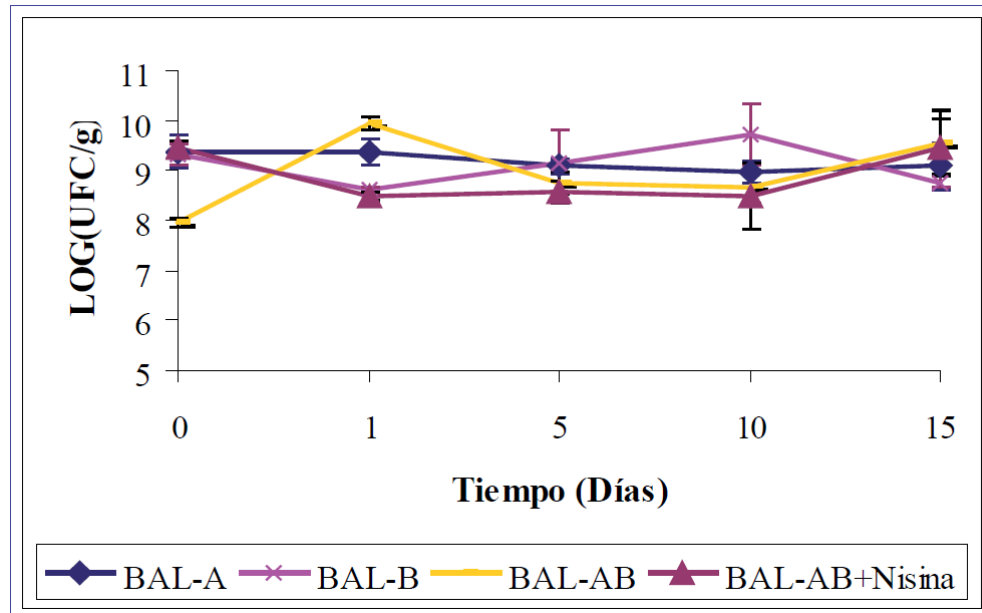


Figura 7. Viabilidad de las cepas BAL en la película de proteína a pH 8,0, almacenadas a 7°C por 15 días.

Se puede observar que ni las cepas de bacterias productoras de bacteriocinas ni la nisina se vieron afectadas luego de la formación de esta película, sino que mantuvieron su concentración estable y sin variaciones significativas luego de 15 días a 7°C y a un pH de 8,0. Tomado y adaptado de (Rodríguez, Deyci. 2009) (50)

En cuanto a la acción inhibitoria de la película de BAL-A y BAL-B por separadas presentaron un efecto antagonista contra la bacteria, disminuyendo su crecimiento, donde la cepa BAL-A disminuyó su crecimiento en 1,7 Log de UFC/cm² y la cepa BAL-B no presentó por sí sola un efecto inhibitorio. Por otro lado, la película con las cepas BAL-A + BAL-B inhibió el crecimiento de la bacteria en un 2,11 Log de UFC/cm², las cepas BAL-A + BAL-B+ nisina sólo en un 0,52 Log de UFC/cm² y la nisina por sí sola no presentó mayor significancia ya que la *L. monocytogenes* se vio inhibida sólo el 1er día, y luego comenzó a desarrollarse como se puede ver en la figura 8.

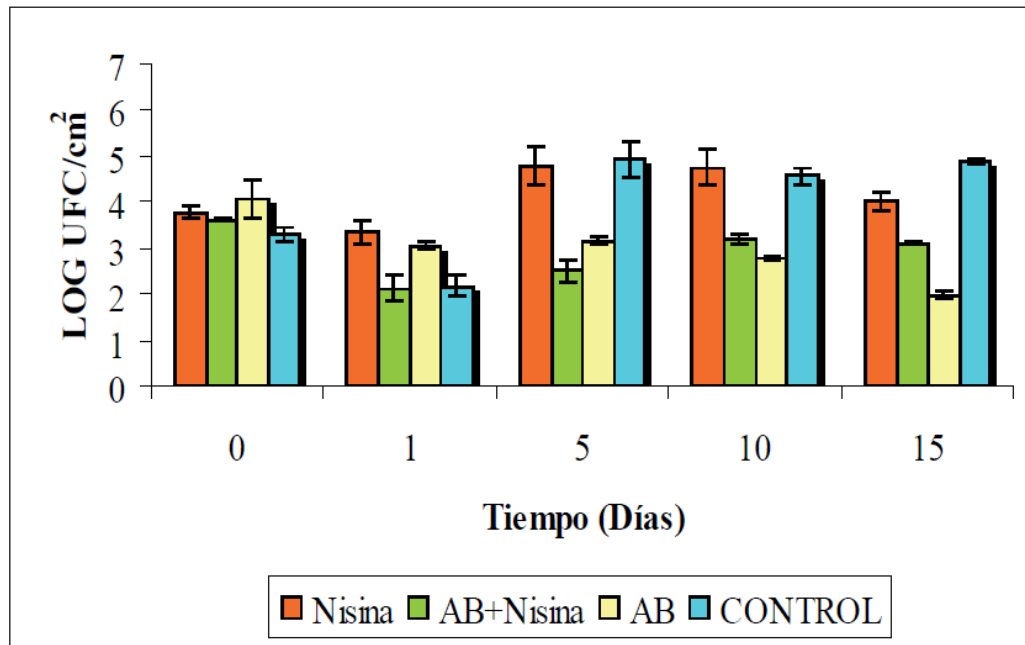


Figura 8. Efecto antagonista de nisina, STB de BAL-A+ B +nisina cepas BAL-A+B desde la película de proteína frente a *L. monocytogenes* a pH 8,0.

En la figura se observa el tiempo en días, la producción de *L. monocytogenes* expresado como Log de UFC/cm², y el efecto que presentó cada película desarrollada. Donde se puede ver que, si bien la nisina en combinación con las dos cepas de BAL sí presenta una actividad inhibitoria, esta al pasar los días se comienza a volver constante y detiene la inhibición de crecimiento de la bacteria, sin embargo, ambas cepas BAL presentan un mayor efecto inhibitorio y es más prolongado, donde en el día 15 aún no se detiene su capacidad de inhibir el crecimiento de esta bacteria en el salmón ahumado. Tomado y adaptado de (Rodríguez, Deyci. 2009)(50)

Como se dijo, *Listeria monocytogenes* es relevante en cuanto a la contaminación de alimentos por su capacidad de generar infecciones e intoxicaciones en las personas, sin embargo, hay otras bacterias como la *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, que son altamente transportados en alimentos, es por eso que Lorena Trejo-González junto a otros investigadores, tomaron consideración de esta problemática y decidieron buscar una forma para disminuir este transporte de bacterias en los alimentos, por lo cual crearon una película antimicrobiana de pectina de gellan enriquecidas con EDTA y sobrenadante concentrado de

caldos de cultivo de fermentación de bacterias ácido láctica la *Streptococcus infantarius* por su producción de bacteriocinas, donde esta película resultante se aplicó en Barbacoa, que es un producto cárnico.

Estos investigadores realizaron tres películas antibacterianas que denominaron como F1, F2 y F3, donde lo que cambia entre ellas es la concentración de EDTA y del concentrado de suero antibacteriano (CSA) que se utilizó, y finalmente se agregó un control denominado FC. Las soluciones formadoras de película contenían 1% (p/v) de pectina cítrica, 0,2% (p/v) de goma gellan con bajo contenido de acilo, 0,5% (p/v) de glicerol y CaCl_2 5 mM. Estas tres soluciones tenían las concentraciones en las siguientes relaciones EDTA (M) /CSA (AU / mL): 0.05 / 75, 0.05 / 90, 0.05 / 120, respectivamente, y finalmente la película control que no tenía ninguno de estos compuestos. Por otro lado, los biopolímeros que dan la consistencia más sólida a estos compuesto es el glicerol y CaCl_2 , donde toda esta mezcla se vertió en moldes de teflón y se secaron en estufa a 35 ° C durante 17 h, y estas películas obtenidas se acondicionaron luego en un desecador durante 48 horas a una humedad relativa (HR) de 50-55% y 23 ° C. (51)

Ahora en cuanto a los tres microorganismos, primero se utilizó la película en medios selectivos para evaluar la actividad de esta donde después de ser cultivados en un caldo BHI en condiciones reguladas, se tomó una cantidad de 200 μL de cada cultivo para luego sembrarlas en placas Petri, que tenían medios selectivos para los microorganismos en estudios, en este caso se sembró *L. monocytogenes* en medio de cultivo Oxford, *E. coli* en agar MacConkey y *S. aureus* en agar Baird Parker. Donde luego de obtener crecimiento bacteriano controlado para estos microorganismos, se les agregó la película sintetizada recubriendo todo el agar y se dejaron incubar por 30 días a 25°C.

Luego se evaluó la acción de esta película en un medio que contenían productos cárnicos, este medio se desarrolló en placas de petri como medio de cultivo para simular el producto cárnico real donde este medio contenía 4,5% (p/v) de barbacoa y 1,5% (p/v) de Bacto-agar,

donde luego de su preparación se esterilizó en el autoclave y se distribuyó en las placas Petri para ser usadas, en este caso, esto se realizó para simular el producto cárnico real, no se aplicó directamente en el producto cárnico, pero es la misma base más el agar que le da la consistencia para formarse como una película. Entonces luego de tener este medio de cultivo se inoculó las bacterias en cuestión, cada bacteria en un medio de cultivo aparte.

Ahora en cuanto a resultados estos investigadores primero analizaron las placas con medio de cultivo selectivo sin la película antibacteriana como forma de control para ver el crecimiento normal de estas bacterias, y luego los medios selectivos con las tres bacterias y las películas. El medio selectivo sin película usado como control, mostró un crecimiento bacteriano de 105 UFC/placa para *L. monocytogenes* y 78 UFC/placa para *E. coli* a los dos días de incubación, en el caso de *S. aureus*, este mostró un crecimiento de 77 UFC/placa al tercer día de incubación. Ahora en las placas con el medio selectivo y la película antibacteriana, no se mostró ningún crecimiento bacteriano por 30 días lo que se puede ver en la figura 9, cabe destacar que al hablar de las placas con la película, aparte de hacer mención a la F1, F2 y F3, también se hace referencia a la FC, y si bien se sabe que esta no contenía los componentes antibacterianos en estudio (EDTA y CSA), sí contenía la goma de gellan y pectina, por lo cual el no crecimiento bacteriano en esta película control (FC) se puede deber a ello. (51)

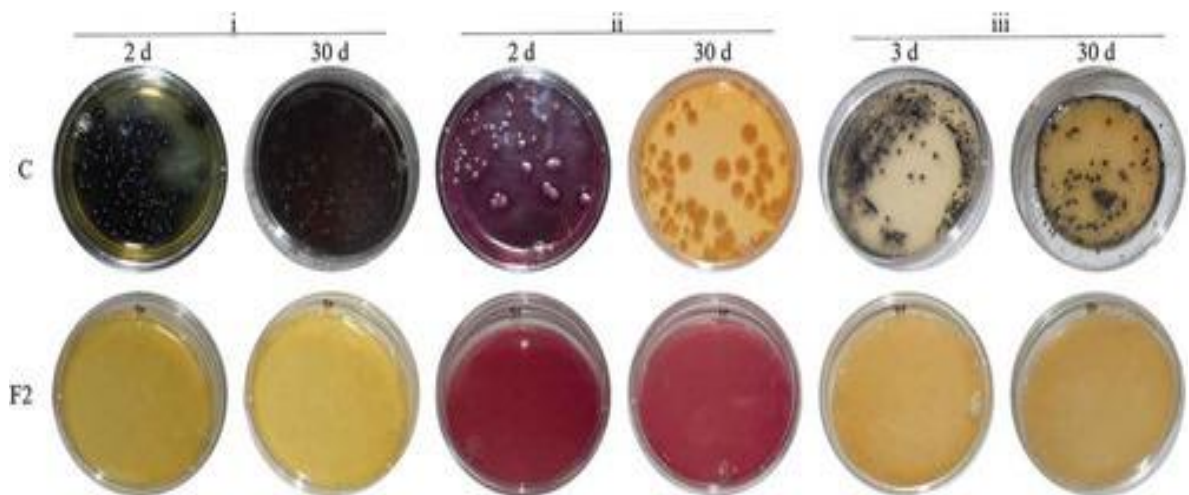


Figura 9. Crecimiento bacteriano en medios selectivos sin película y con película antibacteriana a los 2 o 3 días y a los 30 días.

En las columnas se muestra; i) *Listeria monocytogenes* en medio Oxford; ii) *Escherichia coli* en agar MacConkey, y iii) *Staphylococcus aureus* en medio Baird Parker. En las filas se puede ver C, que corresponde al control sin la película y F2, película biopolimérica con gellan y pectina, CSA, 90 AU/mL y EDTA, 0.05 M. Tomado y adaptado de (Trejo-González, Lorena, 2018)(51)

Continuando con los resultados del estudio, en la figura 10 se muestran los efectos de las películas antimicrobianas sobre el medio de cultivo en base a barbacoa a 35°C sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. aureus* a 35 ° C. En este caso los resultados se expresan de forma cuantitativa mediante una gráfica. Donde se muestra en primera instancia el crecimiento de las bacterias en el medio cárnico sin la película (triángulo), el de las bacterias recubiertas en el medio cárnico con la película que contiene la pectina y gelana pero sin los componentes de interés, CSA y EDTA (rombo) y finalmente el crecimiento bacteriano en el medio de cultivo cárnico con la película F2 (CSA 90 AU/mL y EDTA 0,05 M) (círculo). donde se ve que al pasar los días en los medios de cultivos con el producto cárnico y la biopelícula sin los compuesto de interés el crecimiento bacteriano se muestra disminuido en referencia al control y finalmente en F2, el crecimiento bacteriano se ve inhibido casi por completo.

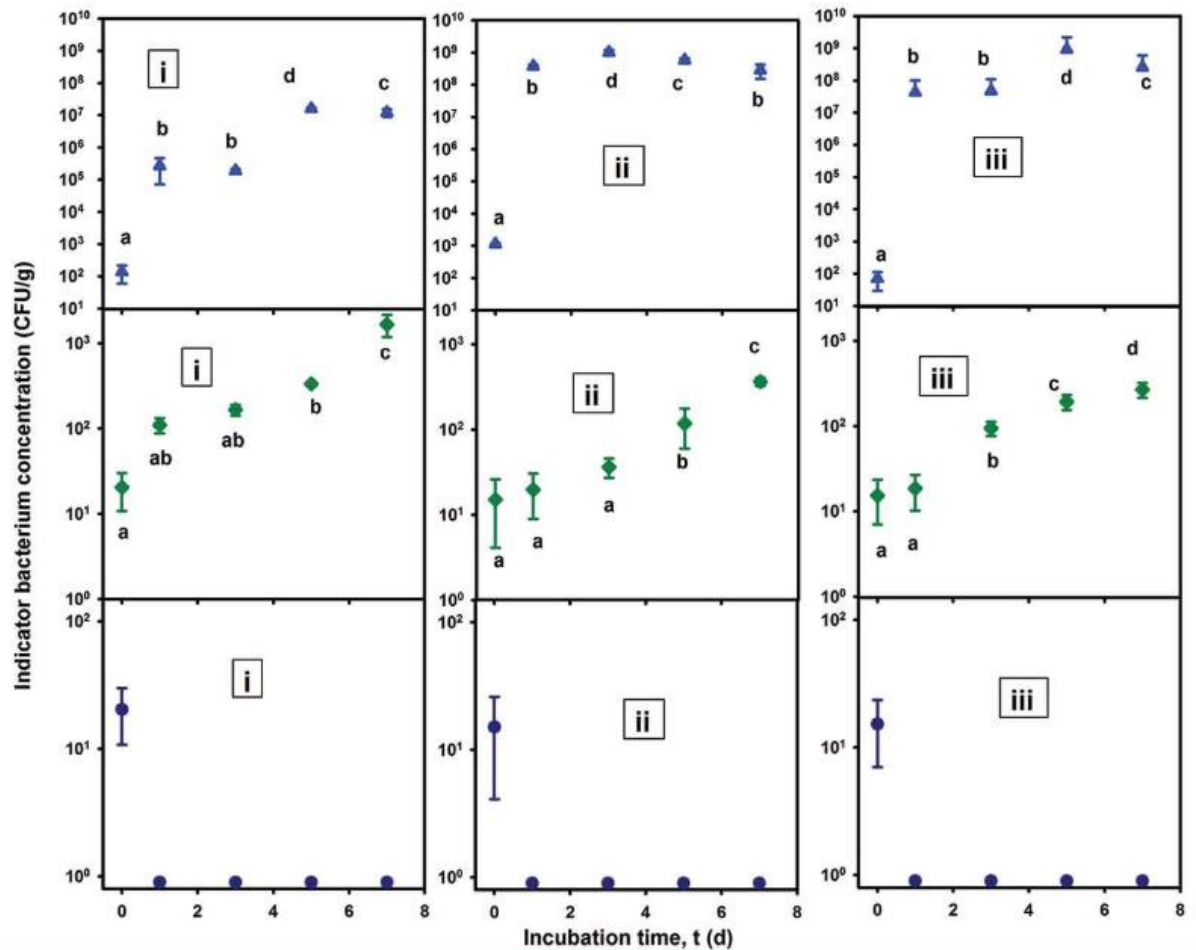


Figura 10. Cinética de crecimiento de los indicadores (UFC/g) a 35 ° C en medio de cultivo Barbacoa. i) *Listeria monocytogenes*; ii) *Escherichia coli*, y iii) *Staphylococcus aureus*.

Como se explicó anteriormente, se muestran 3 situaciones, los medios de cultivos inoculados con la bacteria y sin la película (▲), los medios inoculados con la bacteria y la película sólo con pectina y gelatina (◆) y medio recubiertos con película F2 (CSA 90 AU/mL y EDTA, 0.05 M) (●). Cabe destacar que estos estudios fueron realizados por triplicado. Las barras de error son desviaciones estándar; diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas. Finalmente, las películas F2 exhibieron una destacada actividad antimicrobiana contra las tres bacterias ensayadas que no crecieron durante los cultivos; aún más, desde el día 1 de los experimentos, los recuentos de células viables fueron menores de 1 UFC/g (símbolos circulares). Tomado y adaptado de (Trejo-González, Lorena, 2018)(51)

A modo resumen del estudio las películas bioactivas antimicrobianas formadas por la goma de gellan, el glicerol, pectina de cítrica, CaCl_2 y los compuestos de interés EDTA y CSA a partir de la fermentación de *S. infartarius*, mostraron efectos inhibitorios contra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, sembrados en medios de cultivos selectivos y medios de cultivos cárnicos, esta inhibición bacteriana implica una sinergia de las contribuciones de la actividad antimicrobiana individual de CSA, EDTA y pectinas, presentes en las películas F2 bioactivas.

Ya se ha hablado de matrices de sustancias poliméricas para péptidos antibacterianos y su rol en los alimentos como protectores de estos frente a microorganismos, sin embargo, otro punto importante a destacar es el uso de sustancias poliméricas como base de bacteriocinas a modo de controladores o antibacterianos frente a bacterias multirresistentes. En este caso, se sabe que la resistencia bacteriana es un tema controversial, habiendo bacterias que presentan resistencias naturales o adquiridas, donde las naturales son propia de cada familia, especie o grupo de bacterias, por otro lado la resistencia adquirida es variable y puede ser adquirida por una sola cepa bacteriana, por lo tanto, las resistencias naturales o intrínsecas no son un problema mayor, sino que esto se complica cuando se van adquiriendo varios tipos de resistencias que puede estar dadas por genes diferentes frente a algunas familias de antibióticos u otro mecanismo y es acá donde el tema toma mayor relevancia ya que las bacterias pueden adquirir muchos mecanismos y pasar a ser multirresistentes o pan-resistentes, donde casi ninguna familia de antibióticos presenta efectividad contra ellas.

Dado a lo anterior, se presenta un estudio donde se evaluó la actividad de la nisina, fragmentos de bicapa lipídica y nanopartículas catiónicas de nisina-lípido frente a *Staphylococcus spp* multirresistentes, este estudio fue desarrollado por investigadores de la Universidad de São Paulo, Brasil. La Nisina es una de las bacteriocinas producida por *Lactococcus lactis*, es una de las más estudiadas e importante dentro de las bacteriocinas ya que esta tiene una alta actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivo y patógenos transmitidos por alimentos, por otro lado, también se ha mostrado gran actividad terapéutica en medicina veterinaria para el tratamiento de enfermedades infecciosas, incluso las causadas

por *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA), siendo la nisina una alternativa frente a los antibióticos tradicionales. (52)

Por otro lado, como han descrito otros autores los lípidos catiónicos sintéticos, como el bromuro de dioctadecil dimetilamonio (DDA), son compuestos versátiles que exhiben actividad microbiana contra hongos y bacterias (53), También este compuesto presenta un resto de amonio cuaternario como cabeza polar catiónica, esto le da buenas características antimicrobiana. Ahora por otro lado, este DDA se autoensambla en solución acuosa produciendo bicapas cerradas (vesículas) o vesículas rotas, según el procedimiento utilizado para dispersar el lípido. También se destaca de otros estudios anteriormente realizados que fármacos antimicrobianos se autoensamblan y solubilizan en sitios hidrofóbicos de fragmentos de bicapa de DDA (DDA BF), en solución acuosa, exhibiendo actividad in vitro e in vivo. Y este compuesto (DDA BF) ha mostrado una actividad de amplio espectro contra bacterias clínicamente significativas. (54)

Bueno como se ha mencionado, en este estudio se evaluó la acción bactericida de la bacteriocina nisina (NS) y el lípido DDA, por separados y en combinación frente a cepas de *Staphylococcus spp* resistentes a antibióticos que fueron aislados de mastitis bovina y otras cepas de colección de referencia. Para el estudio se ocupó en total 30 cepas de *Staphylococcus spp* resistentes, donde 14 correspondían a *Staphylococcus aureus*, 2 a *Staphylococcus capitis*, 9 a *Staphylococcus chromogenes*, 1 a *Staphylococcus epidermidis*, 2 a *Staphylococcus haemolyticus*, 1 a *Staphylococcus sciuri* y 1 cepa de *Staphylococcus warneri*. Cabe destacar que se eligieron estas especies considerando resistencia al menos a una clase de antimicrobianos y, por otro lado, se utilizó 6 cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, ATCC BAA-976, ATCC BAA-977, ATCC BAA-1026, MRSA N315 y hetero-VISA Mu-50). (55)

Para conocer las resistencias a antimicrobianos que presentaban estas bacterias se evaluó la susceptibilidad con el método de difusión en disco en Agar Mueller-Hinton. Por otro lado, al conocer las resistencias procedieron a determinar la concentración mínima bactericida (CMB) de NS y DD por método de dilución en microcaldo y finalmente la actividad bactericida de NS en combinación con DDA se realizó mediante el método de tablero de ajedrez el que consiste en determinar in vitro las interacciones entre mezclas binarias de antimicrobianos (diluidos) agregando el cultivo de microorganismo sensible. (56)

En cuanto a sus resultados, a modo general la cantidad mínima bactericida de la NS y el DDA disminuyeron cuando estos se aplicaron en combinación, sobre todo las concentraciones de la nisina que en algunos casos disminuyó de 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ a 4 $\mu\text{g} / \text{mL}$, haciendo una diferencia muy significativa en concentraciones, por otro lado, estos investigadores determinaron si se presentaba efecto sinérgico (S), parcialmente sinérgico (PS), indiferente (I) y antagonista (A), lo que se puede ver en la tabla 9, cabe destacar que la interpretación la calcularon mediante la concentración bactericida fraccionado (ΣCBF), la que involucra la CBF de cada compuesto por separado (NS y DDA), de modo que se establecieron límites cuantitativos, lo cual para modalidad de esta revisión estos resultados no se muestran pero sí su interpretación cualitativa, la que se detalló anteriormente. (55)

En los resultados expuestos a continuación sólo se muestra una cepa de cada especie bacteriana para los *Staphylococcus spp* aislados de mastitis de vacas, se eligieron de forma representativa donde en las que había más de una especie se seleccionó la que presentaba más resistencias, con excepción de *Staphylococcus aureus* que se muestran dos cepas a diferencia del estudio original donde se muestran todos los resultados, en cuanto a las cepas ATCC se presentan 3, una que no presentaba resistencias, otra que presentaba 11 tipos de resistencias y otra que presentaba 3 tipos de resistencia.

Tabla 9. Perfil de resistencia a los antimicrobianos y concentraciones mínimas bactericidas (CMB) para nisina (NS), fragmentos de bicapa (BF) de bromuro de dioctadecildimetilamonio (DDA) y complejos NS / DDA contra *Staphylococcus spp* aislado de mastitis bovina y cepas de referencia de *Staphylococcus aureus*. Tomado y adaptado de (Castelani, L. et al, 2019) (55)

Cepa	Especie	Perfil de resistencia ¹	CMB (µg/mL)			Interpretación ²
			NS	DDA-BF	NS/DDA	
558T	<i>S. aureus</i>	Ffc, Lzd	50	8	3/2	S
1849T	<i>S. aureus</i>	Amp, Cip, Cli, Ery, Eno, Pen	50	2	3/2	I
565T	<i>S. capitis</i>	Amp, Pen, Tet	50	4	3/2	PS
120T	<i>S. chromogenes</i>	Cli, Ffc, Lzd, Str, Tet	50	2	3/2	I
1043TE	<i>S. epidermidis</i>	Amp, Kan, Pen, Tet	50	4	3/2	PS
133N	<i>S. haemolyticus</i>	Amp, Ffc, Pen	50	8	3/4	PS
7N	<i>S. sciuri</i>	Oxa	50	32	6/16	PS
107N	<i>S. warneri</i>	Amp, Pen	50	4	3/2	PS
ATCC 25923	<i>S. aureus</i>	-	100	4	3/2	PS
ATCC BAA-976	<i>S. aureus</i>	Amp, Ery, Pen	100	4	3/2	I
MU-50 (VISA)	<i>S. aureus</i>	Amp, Cf, Cli, Eno, Ery, Fur, Gen, Oxa, Pen, Tet, Van	50	4	3/4	I

¹ determinado por el método de difusión en disco. Amp = ampicilina (10 µg); Cf = cefalotina (30 µg); Cip = ciprofloxacina (5 µg); Cli = clindamicina (2 µg); Eno = enrofloxacin (5 µg); Ery = eritromicina (15 µg); Ffc = florfenicol (30 µg); Gen = gentamicina (10 µg); Kan = kanamicina (30 µg); Lzd = linezolid (30 µg); Oxa = oxacilina (1 µg); Pen = penicilina (10 UI); Str = estreptomicina (10 µg); Sxt = trimetoprim-sulfametoxazol (1,25 / 23,75 µg); Tet = tetraciclina (30 µg).

² la combinación se clasifica como sinérgica (S), parcialmente sinérgica (PS), indiferente (I) y antagonista (A).

En cuanto a los resultados de este estudio, se puede ver que los compuesto NS y DDA por separado presentan acción bactericida pero las concentraciones son muy altas, sin embargo, cuando se utilizan en combinación, por lo general las concentraciones mínimas bactericidas disminuyen considerablemente en la mayoría de los casos, pero hay que tener en consideración que la concentración de NS, por ejemplo, en la cepa 558T *S. aureus* disminuyó desde 50 µg/mL, a concentraciones de 3 µg/mL, no así con DDA, ya que si bien también disminuyó su concentración al usarlos en conjunto, no fue tanta la diferencia, pasando de 8 µg/mL a 2 µg/mL.

De todas formas al igual que en los estudios anteriores se demuestra que las sustancias poliméricas al ocuparse como base para péptidos antibacterianos, en especial las bacteriocinas, expresan buenas características y propiedades, siendo capaz de resistir variaciones en pH y temperatura, también hay que destacar que los polímeros hacen que las bacteriocinas puedan ser aplicadas en forma de bio nanocompuestos, en forma de películas antimicrobianas lo que hace que se puedan adherir y adaptar de forma más fácil a diferentes productos siendo un beneficio para la industria de la farmacología y por otro lado, la capacidad de las bacteriocinas para usarse en combinación con otros productos antibióticos dan paso a buscar mejoras en la recuperación de pacientes cuando cursan con infecciones causadas por bacterias multirresistentes.

2.4 Aplicación de antimicrobianos encapsulados en sustancias poliméricas

Los polímeros están ampliamente distribuidos en el entorno con diferentes usos o funcionalidades, como por ejemplo los naturales a la incorporación de los alimentos con el fin de la conservación de estos.

Por lo anterior, Seohui Jung en conjunto con otros investigadores decidieron buscar una estrategia o método donde los alimentos se puedan conservar por más tiempo y que conserven

sus características como las que posee un producto al inicio de las cosechas, por ende, ellos diseñaron el recubrimiento nanocompuesto que puede recubrir una variedad de frutas por inmersión y así preservar su frescura y abordar la problemática de la descomposición, donde este bio-nanocompuesto multifuncional lo conformaron en gran parte de polímeros derivados de huevo (albúmina principalmente) y nanomateriales de celulosa (biopolímero), de esta forma se puede aplicar sobre productos frescos ralentizando la descomposición al retrasar la maduración, la deshidratación y la invasión microbiana. Importante destacar que el revestimiento del nanocompuesto lo hicieron comestible y lavable a diferencia de otros revestimientos que han realizado otros investigadores.

Como se dijo, la albúmina y nanomateriales de celulosa son la base para este bio-nanocompuesto, donde la clara de huevo plastificada con glicerol da la capacidad de poder recubrir objetos como frutas y sin agrietarse. Sin embargo, el glicerol es hidrofílico y se hincha en ambientes húmedos. Para evitar la hinchazón no deseada, ellos incorporaron una pequeña fracción de yema de huevo, que es hidrófoba y rica en ácidos grasos, así se puede aliviar la susceptibilidad a la humedad. Ahora eso es en cuanto a la estructura, pero sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antibióticas vienen de la curcumina y es un extracto comestible de la cúrcuma. Estas propiedades les permitieron reducir el crecimiento microbiano en la superficie del fruto al tiempo que disminuyen el O_2 y aumentan el CO_2 en el microambiente que ayuda a mantener la frescura de la fruta. Por último, incorporaron nanocristales de celulosa (CNC) para disminuir la penetración de agua y gas del recubrimiento y agregar refuerzo mecánico. (57)

Luego que ellos realizaron su bio-nanocompuesto evaluaron la efectividad de este para preservación de la frescura en cuatro frutas (papaya, plátano, aguacate y fresa), donde tres eran climatéricas (plátano, aguacate y papaya) y una no climatérica (fresa). Ellos recubrieron estas frutas luego de la compra y las dejaron de 8 a 11 días para observar que pasaba, también dejaron frutas sin el recubierto para la posterior comparación y luego de los días, estas presentaban claramente una mayor descomposición como se puede ver en la figura 11. La película de nanocompuesto para recubrir los alimentos fue de albúmina y celulosa reforzada

con nanocrisales de 70 μm de espesor quedando sólido y similar a un papel con extrema flexibilidad y capacidad de plegado como se puede ver en la figura 12.

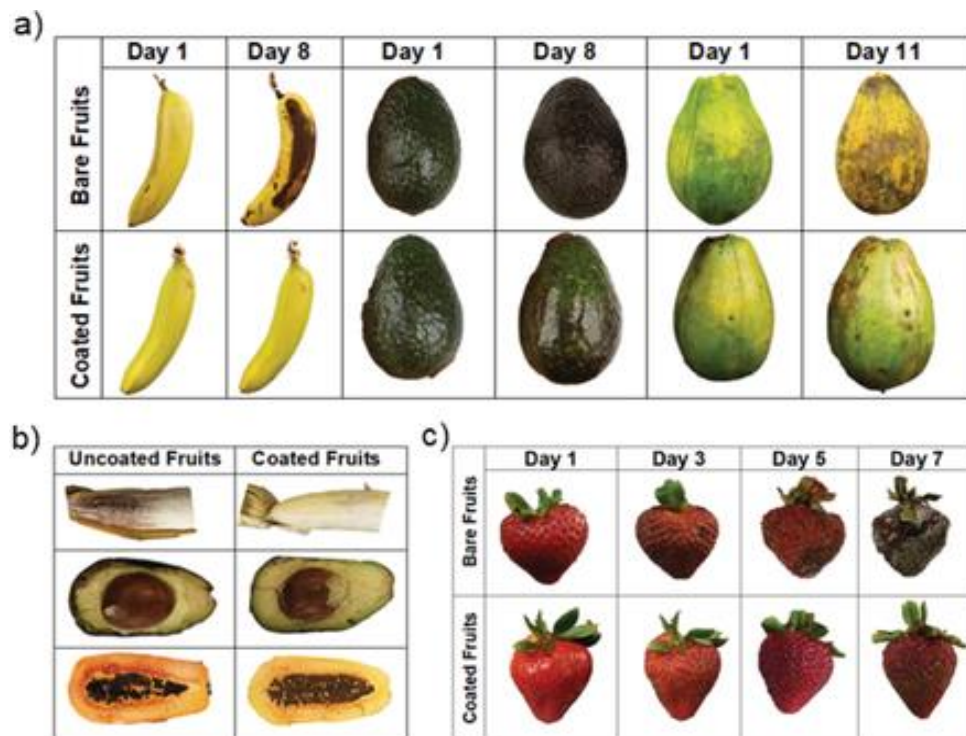


Figura 11. Efectividad del recubrimiento de bio-nanocompuestos en las frutas.

a) Se observa en la primera fila el exterior de las frutas climatéricas sin el recubrimiento en el día 1 y luego en el día 8, en la segunda fila se ve lo mismo que en la anterior, pero las frutas sí tienen el recubrimiento. Claramente se aprecia que las frutas con el recubrimiento se conservan externamente mucho mejor que las que no lo tienen. **b)** Se observa el interior de las frutas sin y con recubrimiento, respectivamente. Al igual que el exterior de las frutas, muestran un proceso de maduración lento. **c)** Lapso de días de fresa (no climatérica) sin recubierta en la primera fila y con recubierta en la segunda fila. Se puede ver el proceso de descomposición más lento a medida que avanzan los días en la fresa recubierta. Tomada y adaptada de (Jung, Seohui. 2020)(57)

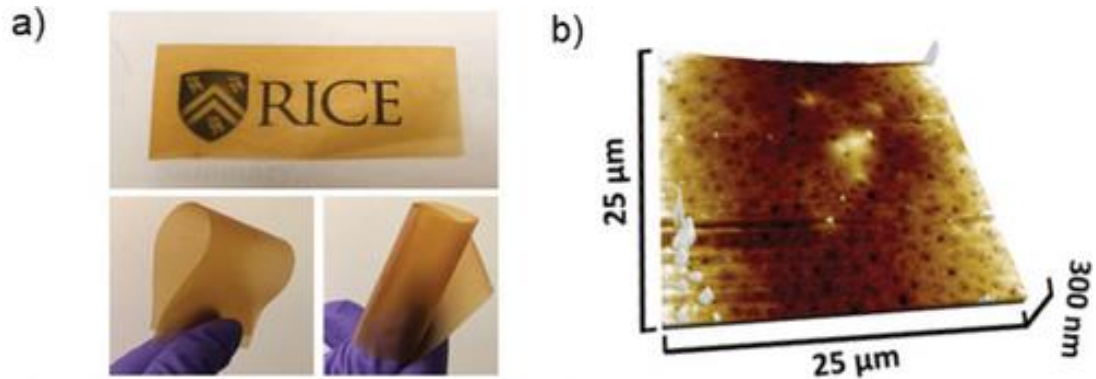


Figura 12. Película de bio-nanocompuesto.

a) Imagen de la película del bio-nanocompuesto de albúmina y celulosa reforzada con nanocristales de 70 μm de espesor. **b)** Imagen 3D del modelo del nanocompuesto. Tomada y adaptada de (Jung, Seohui. 2020) (57).

En resumen, los polímeros son útiles en industrias alimenticias y con diferentes funcionalidades, una de ellas como se vio en el artículo anterior es la conservación de alimentos ayudando a resolver problemáticas que nos afectan a todos y así como se les da el uso a los polímeros naturales de albumina y celulosa, existen muchos otros polímeros que pueden ser empleados en esta industria.

Continuando hablaremos de algunos usos que se les puede dar a estos polímeros en la industria de la farmacología enfocada a la terapia antimicrobiana, ya que como se sabe, la resistencia bacteriana es un tema que va tomando cada vez más relevancia debido a que los microorganismos se inhiben con concentraciones mucho mayores de antibióticos, lo que también es un gran desafío para todo el equipo médico y salud pública en general.

Un estudio realizado por investigadores de México y Alemania aborda esta problemática y ellos optan por el uso de un polímero como lo es el biocompuesto de celulosa microfibrilada con plata contra bacterias sensibles y resistentes. Como ocurre generalmente los metales de

transición presentan una alta toxicidad para el ser humano al ocuparse como tan, por lo que para eliminar esa toxicidad se deben reducir en combinación de polímeros que sean orgánicos, de ahí viene la implicancia de la celulosa, ya que, al ser de origen natural y derivada de algunos suministros de alimentos, la hace ideal para el procesamiento y síntesis de nanopartículas de plata. Además, hay que destacar que para la síntesis y reducción de este metal de transición se utilizó una técnica ecológica en base a ácido ascórbico y celulosa microfibrilada como agente protector para la creación del nanocompuesto. (58)

Para este estudio utilizaron cepas bacterianas de *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Pseudomonas aeruginosa* con *Staphylococcus aureus* resistente a múltiples fármacos provenientes de un hospital. Las MIC obtenidas de nanopartículas de plata (AgNP) contra los microorganismos fue realizada en agar Müller-Hinton y los valores se pueden ver en la tabla 10.

Tabla 10. Concentración inhibitoria mínima del compuesto de AgNP sintetizado.
(Tomado y adaptado de (Garza-Cervantes, J-A. 2020)(58)

Microorganismo	MIC (ppm)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente	125
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1500
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente	1500

Luego de determinar las MIC de cada microorganismo con el AgNP, se realizó otro estudio para analizar la inhibición del crecimiento bacteriano donde el agar utilizado se va colocando de un color más gris a medida que la concentración de AgNP va aumentando, en las placas primero van las que no poseen AgNP, luego las placas que poseen una cantidad sub inhibitoria de AgNP para los microorganismos y finalmente la MIC, lo que se realizó acá es analizar la cantidad de crecimiento o la inhibición de este y se puede apreciar en la figura 8.

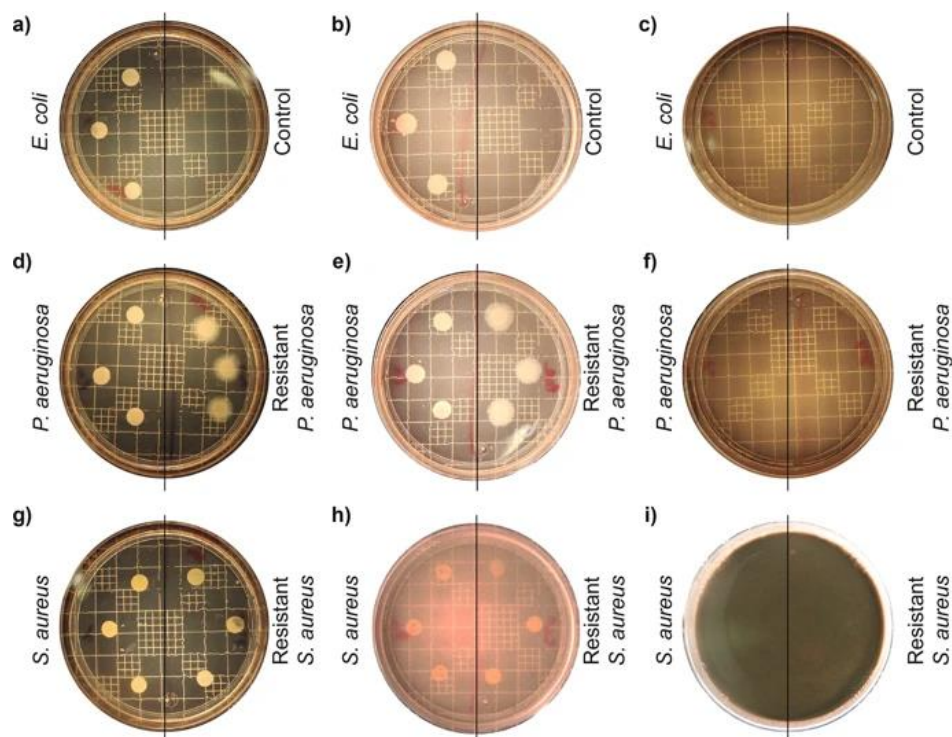


Figura 13. Inhibición del crecimiento causada por el compuesto AgNPs.

a). Placa sin AgNP con *E. coli* y control. **b).** Placa con 62 ppm de AgNP con *E. coli* y control. **c).** Placa con 125ppm de AgNP con *E. coli* y control. **d).** Placa sin AgNP con *P. aeruginosa* ATCC y resistente. **e).** Placa con 62 ppm de AgNP con *P. aeruginosa* ATCC y resistente. **f).** Placa con 125ppm de AgNP con *P. aeruginosa* ATCC y resistente. **g).** Placa sin AgNP con *S. aureus* ATCC y resistente. **h).** Placa con 1000 ppm de AgNP con *S. aureus* ATCC y resistente **i).** Placa con 1500 ppm de AgNP con *S. aureus* ATCC y resistente. Tomado y adaptado de (Garza-Cervantes, J-A. 2020)(58)

Como síntesis de este estudio, el biocompuesto que sintetizaron se dispersó homogéneamente en la placa de agar, de esta forma se superó la baja difusión que puede tener el biocompuesto si se colocara en discos convencionales. También se pudo demostrar que el biocompuesto si tuvo actividad antimicrobiana contra cepas ATCC y resistentes de bacterias Gram positivo y Gram negativo, aunque no de la forma que se esperaba y, por lo cual sería una línea de investigación prometedora para futuros estudios y así seguir perfeccionando los métodos y

formas de sintetizar un nuevo biocompuesto ayudando a la problemática creciente que es la resistencia bacteriana.

Finalmente a modo de síntesis de este capítulo, las sustancias poliméricas pueden ser usadas en diferentes formatos, y en combinación con diferentes compuesto, de esta forma garantiza mayor variabilidad para la realización de estudios, como en el caso de la investigación de Jung, Seohui y colaboradores donde pudieron sintetizar una película de bio-nanocompuesto de tal forma que los alimentos sin importan su forma se puedan recubrir, por otro lado como en el estudio de Garza-Cervantes, J-A, la utilización de estas sustancias poliméricas fue más bien en estado líquido, dando más facilidades de estudios in vitro para medir inhibición bacteriana, por lo tanto estos polímeros con las diferentes presentaciones estudiadas, podrían hacer que las bacteriocinas se puedan incorporar a alimentos de forma más sencilla y tal vez más eficiente, generando de esta forma una acción antimicrobiana más persistente.

VIII. CONCLUSIÓN

Se ha demostrado, a través de varios trabajos de investigación, que la mayor cantidad de bacteriocinas descritas son elaboradas por Bacterias Ácido-Lácticas (Gram positivo). Estas ejercen su acción antimicrobiana principalmente sobre las Bacterias Gram negativo. A medida que estas investigaciones progresan, se están describiendo nuevas bacteriocinas que tienen un espectro de acción antimicrobiano mayor actuando sobre Bacterias Gram positivo y Gram negativo. Lo mismo ocurre con las bacteriocinas producidas por Bacterias Gram negativo, si bien no son muchas las descritas hasta el momento, las que están siendo estudiadas presentan un amplio espectro y efecto antimicrobiano, resultando ser eficaces contra bacterias resistentes e incluso multirresistentes. La producción de nuevos antimicrobianos con estas bacteriocinas y/o en conjunto con antibióticos ya existentes en el mercado, abre una nueva posibilidad de tratamiento en el área de la salud contra infecciones bacterianas e incluso puede ayudar a mitigar uno de los problemas más grandes que se está viviendo en los sistemas de salud a nivel mundial: la resistencia bacteriana a los antibióticos ya conocidos.

Si bien estas bacteriocinas muestran un futuro prometedor para tratamientos en el área clínica, no se puede dejar de lado el ámbito de los alimentario, donde a nivel mundial las infecciones o intoxicaciones por alimentos no dejan de ser preocupantes, por ende y según ha sido demostrado en trabajos de investigación, estas bacteriocinas pueden ser aplicadas a directamente a los alimentos o en los ambientes de producción. Lo anterior, con la finalidad de evitar la contaminación durante el proceso de elaboración y posterior salida al mercado, además de inhibir los procesos de descomposición de modo que se prolongue su vida útil.

Bacteriocinas y compuestos poliméricos en uso combinado han demostrado su actividad antibacteriana de forma eficaz. El uso de sustancias poliméricas como matriz de péptidos antimicrobianos, ha permitido la creación de compuestos orgánicos, como las biopelículas o films que hacen que la adición de estos péptidos antibacterianos a alimentos sea menos compleja, pudiendo utilizarse además para recubrir alimentos. En el ámbito físico químico,

se demostró que las bacteriocinas encapsuladas en sustancias poliméricas pueden conservar su actividad antimicrobiana y ampliar su rango térmico y de pH.

Las sustancias poliméricas ofrecen una buena alternativa para encapsular antimicrobianos que pueden ser aplicados en la industria de alimentos o farmacológica. Permiten que estos productos conserven sus propiedades o las potencien para ejercer su rol en el control de microorganismos.

IX. REFERENCIAS

1. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(9):623-33.
2. Galvez A, Abriouel H, Lopez RL, Ben Omar N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology.* 2007;120(1-2):51-70.
3. Mattick ATR, Hirsch A, Berridge NJ. FURTHER OBSERVATIONS ON AN INHIBITORY SUBSTANCE (NISIN) FROM LACTIC STREPTOCOCCI. *The Lancet.* 1947;250(6462):5-8.
4. Jacob F, Lwoff A, Siminovitch A, Wollman E. Definition of some terms relative to lysogeny. *Annales de l'Institut Pasteur.* 1953;84(1):222-4.
5. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev.* 1976;40(3):722-56.
6. Cristóbal R. Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2008.
7. Ruth C. Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2008.
8. JACK RW, TAGG JR, RAY3 B. Bacteriocinas de bacterias grampositivas Sociedad Americana de Microbiología [Internet]. 1995; 59:[171- 200 pp.].
9. Cintas LM, Casaus MP, Herranz C, Nes IF, Hernández PE. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International.* 2001;7(4):281-305.
10. Gautam N, Sharma N. Bacteriocin: Safest approach to preserve food products. *Indian Journal of Microbiology.* 2009;49(3):204-11.
11. S.C B-B, E. P, A L-M. Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas selectos de ingeniería en alimentos [Internet].* 2012; 6 [64 -78 pp.].
12. Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1993;12(1-3):39-85.
13. Nes IF, Diep DB, Havarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V, Holo H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology.* 1996;70(2-4):113-28.

14. Venema K, Dost MHR, Beun PAH, Haandrikman AJ, Venema G, Kok J. The genes for secretion and maturation of lactococcins are located on the chromosome of *Lactococcus lactis* IL1403. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62(5):1689-92.
15. Kemperman R, Kuipers A, Karsens H, Nauta A, Kuipers O, Kok J. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003;69(3):1589-97.
16. Del M, Monroy Dosta C, Barrera T, José F, Fernández F, Lino Y, et al. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS*. 2009;73:72.
17. Pérez Guerrero P, Galán Sánchez F, Gutiérrez Saborido D, Guerrero Lozano I. Infecciones por enterobacterias. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2014;11(55):3276-82.
18. Octavia S, Lan R. La familia enterobacteriaceae. In: Rosenberg E, DeLong E, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, editors. *Los procariotas: gammaproteobacterias*. 1. Springer, Berlín, Heidelberg2014. p. 225-86.
19. Mladenović KG, Muruzović MŽ, Žugić Petrović T, Stefanović OD, Čomić LR. Isolation and identification of Enterobacteriaceae from traditional Serbian cheese and their physiological characteristics. *Journal of Food Safety*. 2018;38(1).
20. Parra Huertas RA. REVIEW. BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS: PAPEL FUNCIONAL EN LOS ALIMENTOS. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2010;8(1):93-105.
21. Malveira DS, Guimarães F, De Araujo Veloso V, Duarte ER, Brandi IV, Pinto MS. Lactic acid bacteria with probiotic potential from Nellore calves raised in semiarid. *Acta Veterinaria Brasilica*. 2016;10(4):290-7.
22. Reda FM, Hussein BM, Enan G. Selection and characterization of two probiotic lactic acid bacteria strains to be used as starter and protective cultures for food fermentations. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2018;12(3):1499-513.
23. Lars A. *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology*. Third Edition ed2004. 635 p.
24. Soni KA, Oladunjoye A, Nannapaneni R, Schilling MW, Silva JL, Mikel B, et al. Inhibition and Inactivation of *Salmonella Typhimurium* Biofilms from Polystyrene and Stainless Steel Surfaces by Essential Oils and Phenolic Constituent Carvacrol. *Journal of Food Protection*. 2013;76(2):205-12.

25. Wang HH, Ding SJ, Dong Y, Ye KP, Xu XL, Zhou GH. Biofilm Formation of Salmonella Serotypes in Simulated Meat Processing Environments and Its Relationship to Cell Characteristics. *Journal of Food Protection*. 2013;76(10):1784-9.
26. Seo H-J, Kang S-S. Inhibitory effect of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* on the biofilm formation of *Salmonella Typhimurium*. *Food Control*. 2020:107361.
27. Yi LH, Qi T, Hong Y, Deng LL, Zeng KF. Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in Chinese homemade pickle and dry-cured meat, and bacteriocin identification by genome sequencing. *Lwt-Food Science and Technology*. 2020;125:8.
28. Colombo NSR, Chalon MC, Navarro SA, Bellomio A. Pediocin-like bacteriocins: new perspectives on mechanism of action and immunity. *Current Genetics*. 2018;64(2):345-51.
29. Baertschi SW, Clapham D, Foti C, Kleinman MH, Kristensen S, Reed RA, et al. Implications of In-Use Photostability: Proposed Guidance for Photostability Testing and Labeling to Support the Administration of Photosensitive Pharmaceutical Products, Part 2: Topical Drug Product. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;104(9):2688-701.
30. Echevarria Zárate J. Resistencia bacteriana *Revista Medica Herediana* [Internet]. 1998; 5:[53-5 pp.]. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X1998000200002&nrm=iso.
31. Oliver A, Alarcón T, Caballero E, Cantón R. Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2009;27(2):89-104.
32. Klein EY, Tseng KK, Pant S, Laxminarayan R. Tracking global trends in the effectiveness of antibiotic therapy using the Drug Resistance Index. *Bmj Global Health*. 2019;4(2):7.
33. Perez RH, Zendo T, Sonomoto K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*. 2014;13:13.
34. Hancock RE, Chapple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(6):1317-23.

35. Thapa RK, Winther-Larsen HC, Diep DB, Tønnesen HH. Preformulation studies on novel garvicin KS peptides for topical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;151:105333.
36. Thapa RK, Winther-Larsen HC, Diep DB, Tønnesen HH. Preformulation studies on novel garvicin KS peptides for topical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020:105333.
37. Feder HM, Jr., Osier C, Maderazo EG. Chloramphenicol: A Review of Its Use in Clinical Practice. *Reviews of Infectious Diseases*. 1981;3(3):479-91.
38. Danesh A, Mamo G, Mattiasson B. Production of haloduracin by *Bacillus halodurans* using solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*. 2011;33(7):1339-44.
39. Li G, Xia X, Zhao S, Shi M, Liu F, Zhu Y. The physiological and toxicological effects of antibiotics on an interspecies insect model. *Chemosphere*. 2020;248:126019.
40. Danesh A, Ljungh Å, Mattiasson B, Mamo G. Synergistic effect of haloduracin and chloramphenicol against clinically important Gram-positive bacteria. *Biotechnology Reports*. 2017;13:37-41.
41. Piard JC, Desmazeaud M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*. 1992;72(2):113-42.
42. Folli C, Ramazzina I, Arcidiaco P, Stoppini M, Berni R. Purification of bacteriocin AS-48 from an *Enterococcus faecium* strain and analysis of the gene cluster involved in its production. *FEMS Microbiology Letters*. 2003;221(1):143-9.
43. JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ M, DEL ÁNGEL-CORONEL OA, ESPEJOBAYONA DL, LUGO-DAMIÁN HN. Efecto del pH y la temperatura sobre la liberación de la bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* ITV 26 encapsulada en una matriz de alginato-almidón2017; 1 [22-30 pp.]. Available from: https://www.ecorfan.org/taiwan/research_journals/Invencion_Tecnica/vol1num4/Revista_d_e_Invencion_Tecnica_V1_N4_3.pdf.
44. López-Carrasquero F. FUNDAMENTOS DE POLÍMEROS2014.
45. Meneses J, Corrales CM, Valencia M. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UN POLÍMERO BIODEGRADABLE A PARTIR DEL ALMIDÓN DE YUCA. *Revista EIA*. 2007:57-67.
46. Coreño-Alonso J. Relación estructura-propiedades de polímeros. *Educación Química*. 2010;21(4):291-9.

47. Duarte Jr S, Botta AC, Phark J-H, Sadan A. Propiedades mecánicas y físicas y aplicación clínica de un nuevo composite de baja contracción. *Quintessence*. 2010;23(7):297-304.
48. Coreño-Alonso J, Méndez-Bautista MT. Relación estructura-propiedades de polímeros. *Educación química*. 2010;21:291-9.
49. Benadof D. *Listeria monocytogenes*. *Revista chilena de infectología*. 2008;25:350-.
50. Rodríguez D, SchÖBitz R R. PELÍCULA ANTIMICROBIANA A BASE DE PROTEÍNA DE SUERO LÁCTEO, INCORPORADA CON BACTERIAS LÁCTICAS COMO CONTROLADOR DE *Listeria monocytogenes*, APLICADA SOBRE SALMÓN AHUMADO. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2009;7:49-54.
51. Trejo-González L, Rodríguez-Hernández A-I, del Rocío López-Cuellar M, Juárez-Martínez V-M, Chavarría-Hernández N. Antimicrobial pectin-gellan films: effects on three foodborne pathogens in a meat medium, and selected physical-mechanical properties. *CyTA - Journal of Food*. 2018;16(1):469-76.
52. Field D, Begley M, O'Connor PM, Daly KM, Hugenholtz F, Cotter PD, et al. Bioengineered Nisin A Derivatives with Enhanced Activity against Both Gram Positive and Gram Negative Pathogens. *PLOS ONE*. 2012;7(10):e46884.
53. Ana MC-R, Debora BVaNL. Cationic Surfactants and Lipids as Anti-Infective Agents. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*. 2006;5(1):33-51.
54. Carrasco LDD, Sampaio JLM, Carmona-Ribeiro AM. Supramolecular Cationic Assemblies against Multidrug-Resistant Microorganisms: Activity and Mechanism of Action. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(3):6337-52.
55. Castelani L, Arcaro JRP, Braga JEP, Bosso AS, Moura Q, Esposito F, et al. Short communication: Activity of nisin, lipid bilayer fragments and cationic nisin-lipid nanoparticles against multidrug-resistant *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*. 2019;102(1):678-83.
56. Lincopan N, Carmona-Ribeiro AM. Lipid-covered drug particles: combined action of dioctadecyldimethylammonium bromide and amphotericin B or miconazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006;58(1):66-75.
57. Jung S, Cui Y, Barnes M, Satam C, Zhang S, Chowdhury RA, et al. Multifunctional Bio-Nanocomposite Coatings for Perishable Fruits. *Advanced Materials*. 2020;32(26):1908291.

58. Garza-Cervantes JA, Mendiola-Garza G, de Melo EM, Dugmore TIJ, Matharu AS, Morones-Ramirez JR. Antimicrobial activity of a silver-microfibrillated cellulose biocomposite against susceptible and resistant bacteria. *Scientific Reports*. 2020;10(1).