



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE POLIFENOLES BASADOS EN
EL ÁCIDO GÁLICO SINTETIZADOS ENZIMÁTICAMENTE**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A:

ANGÉLICA JOCELYN VILLALPANDO BAUTISTA

DIRECTOR DE TESIS

DR. MIQUEL GIMENO SECO



MÉXICO, D.F., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Profesor Agustín López-Munguía Canales
Vocal	Profesora Norma Angélica Castellanos Chávez
Secretario	Profesor Miquel Gimeno Seco
Primer suplente	Profesor Carolina Peña Montes
Segundo suplente	Profesor Octavio Fuentes Ramírez

Lugar donde se realizó la investigación

Laboratorios 314, departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E,
Facultad de Química, UNAM.

Asesor del tema:

Dr. Miquel Gimeno Seco

Sustentante:

Villalpando Bautista Angélica Jocelyn

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
ABTS	Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico
AE	Actividad enzimática
AG	Ácido gálico
CHCl ₃	Cloroformo
DE	Desviación estándar
E	Coeficiente de extinción molar
EtOH	Etanol
FT-IR	Espectroscopia infrarrojo
G (+)	Gram positivo
G (-)	Gram negativo
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HPLC/SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
HRP	Peroxidasa de rábano
IC ₅₀	Inhibición del 50% de microorganismos presentes
ITU	Infección tracto urinario
LiCl	Cloruro de litio
L	Litros
LTV	Lacasa de <i>Trametes versicolor</i>
Mb	Milibares
Mg	Miligramos
MIC	Concentración mínima inhibitoria
Min	Minutos
µL	Microlitros
mL	Mililitros
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
PGAL	Poli(ácido gálico)
PM	Peso molecular promedio en número
Ppm	Partes por millón
Prom	Promedio
RMN	Resonancia magnética nuclear
SSI	Solución salina isotónica
UFC	Unidades formadoras de colonias

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. ANTECEDENTES	3
1.1 ¿Qué son los polifenoles?	3
1.2 Ácido gálico	7
1.3 Galatos	8
1.3.1 Galato de octilo	8
1.4 Síntesis enzimática de compuestos orgánicos	9
1.4.1 Lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	10
1.4.2 Peroxidasa de rábano	12
1.5 Bacterias patógenas empleadas para el efecto de inhibición	13
1.5.1 <i>Escherichia coli</i>	15
1.5.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
1.5.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	17
1.5.4 <i>Enterococcus faecalis</i>	18
1.6 Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	19
1.7 Antecedentes de grupo	20
1.8 Justificación	21
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO	22
2.1 Hipótesis	22
2.2 Objetivo general	22
2.3 Objetivos específicos	22
3. METODOLOGÍA	23
3.1 Materiales	23
3.2 Determinación de la actividad enzimática de la enzima LTV	24
3.3 Determinación de la actividad enzimática de la enzima HRP	24
3.4 Síntesis enzimática de PGAL con LTV	25
3.5 Síntesis enzimática de PGAL con HRP	25
3.6 Síntesis enzimática de PGO con HRP	26
3.7 Síntesis enzimática de los co-polímeros Pgal-co-GO solubles en agua	26
3.8 Síntesis enzimática de los co-polímeros Pgal-co-GO solubles en etanol	27
3.9 Determinación de la inhibición microbiana mediante cuenta en placa	27
3.9.1 Medios de cultivo y microorganismos	27
3.9.2 Preparación de inóculo	28
3.9.3 Determinación de MIC	28
3.9.4 Determinación de IC ₅₀	28
3.10 Espectroscopia FT-IR	29
3.11 Resonancia Magnética Nuclear	29
3.12 Cromatografía de exclusión por tamaño (HPLC/SEC)	30

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	Pág. 31
4.1 Determinación de la actividad enzimática específica U/mg de la LTV y HRP	31
4.2 Síntesis enzimática y caracterización de los productos obtenidos	31
4.2.1 Espectroscopia FT-IR	35
4.2.2 Resonancia Magnética Nuclear	39
4.3 Determinación de la inhibición microbiana mediante cuenta en placa	44
4.3.1 Determinación de MIC	44
4.3.1.1 Determinación de MIC en bacterias G (+)	45
4.3.1.2 Determinación de MIC en bacterias G (-)	50
4.3.2 Determinación de IC ₅₀	56
5. CONCLUSIONES	59
6. TRABAJO A FUTURO	59
7. BIBLIOGRAFÍA	60
8. APÉNDICES	67

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Núcleo estructural de los principales grupos de polifenoles	3
Figura 2. Estructura básica de los flavonoides y su sistema de numeración	4
Figura 3. Derivados de ácido benzoico y ácido cinámico	6
Figura 4. Estructura química del ácido gálico	7
Figura 5. Estructura química del galato de octilo	8
Figura 6. Estructura tridimensional de la lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	10
Figura 7. Formación de radicales libre de derivados fenólicos con LTV	11
Figura 8. Estructura tridimensional de la peroxidasa de rábano	12
Figura 9. Grupo hemo de peroxidasa de rábano	12
Figura 10. Mecanismo de acción de la HRP en la formación de radicales	13
Figura 11. Estructura pared celular de las bacterias G (+)	14
Figura 12. Estructura pared celular de las bacterias G (-)	15
Figura 13. Reacción enzimática general para la polimerización AG con LTV	20
Figura 14. Reacción enzimática general para la polimerización AG con HRP	32
Figura 15. Espectro FT-IR del AG, PGAL-LTV y PGAL HRP	35
Figura 16. Espectro FT-IR del GO y PGO	36
Figura 17. Espectro FT-IR del AG, GO, Pgal-co-GO (30:70), Pgal-co-GO (40:60) y Pgal-co-GO (50:50)	37
Figura 18. Mecanismo de reacción propuesto de la lacasa de una quinona derivada del ácido gálico	38
Figura 19. Espectro FT-IR del AG, GO, Pgal-co-GO (30:70) Et, Pgal-co-GO (40:60) Et y Pgal-co-GO (50:50) Et	39
Figura 20. Espectro ¹ H RMN de AG, PGAL-LTV y PGAL-HRP	40
Figura 21. Espectro ¹ H RMN de GO y PGO	41
Figura 22. Espectro ¹ H RMN del Pgal-co-GO (30:70), Pgal-co-GO (40:60) y Pgal-co-GO (50:50)	42
Figura 23. Espectro ¹ H RMN del Pgal-co-GO (30:70) Et, Pgal-co-GO (40:60) Et y Pgal-co-GO (50:50) Et	43
Figura 24. Determinación de MIC de AG, GO, PGAL-LTV, PGAL-HRP y PGO para <i>S. aureus</i>	45
Figura 25. Determinación de MIC de AG, GO, PGAL-LTV, PGAL-HRP y PGO para <i>E. faecalis</i>	45
Figura 26. Determinación de MIC de AG, GO, Pgal-co-GO (30:70), Pgal-co-GO (40:60) y Pgal-co-GO (50:50) para <i>S. aureus</i>	47
Figura 27. Determinación de MIC de AG, GO, Pgal-co-GO (30:70), Pgal-co-GO (40:60) y Pgal-co-GO (50:50) para <i>E. faecalis</i>	47
Figura 28. Determinación de MIC de EtOH, AG, GO, Pgal-co-GO (30:70) Et, (40:60) Et y Pgal-co-GO (50:50) Et para <i>S. aureus</i>	49
Figura 29. Determinación de MIC de EtOH, AG, GO, Pgal-co-GO (30:70) Et, Pgal-co-GO (40:60) Et y Pgal-co-GO (50:50) Et para <i>E. faecalis</i>	49

	Pág.
Figura 30. Determinación de MIC de AG, GO, PGAL-LTV, PGAL-HRP y PGO para <i>E. coli</i>	51
Figura 31. Determinación de MIC de AG, GO, PGAL-LTV, PGAL-HRP y PGO para <i>P. aeruginosa</i>	51
Figura 32. Determinación de MIC de AG, GO, Pgal-co-GO (30:70), Pgal-co-GO (40:60) y Pgal-co-GO (50:50) para <i>E. coli</i>	53
Figura 33. Determinación de MIC de AG, GO, Pgal-co-GO (30:70), Pgal-co-GO (40:60) y Pgal-co-GO (50:50) para <i>P. aeruginosa</i>	53
Figura 34. Determinación de MIC de EtOH, AG, GO, Pgal-co-GO (30:70) Et, Pgal-co-GO (40:60) Et y Pgal-co-GO (50:50) Et para <i>E. coli</i> .	55
Figura 35. Determinación de MIC de EtOH, AG, GO, Pgal-co-GO (30:70) Et, Pgal-co-GO (40:60) Et y Pgal-co-GO (50:50) Et para <i>P. aeruginosa</i>	55

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Resultados de la actividad específica de LTV y HRP	31
Tabla 2. Rendimientos y distribución de PM de los materiales obtenidos	33
Tabla 3. Resultados de la MIC para los materiales obtenidos	44
Tabla 4. Resultados de la IC ₅₀ para los materiales obtenidos	57

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la co-polimerización de fenoles catalizada por enzimas, en particular aquella realizada por peroxidasa de rábano (HRP). Su síntesis se ha hecho importante porque la consecución de derivados polifenólicos con estructuras altamente conjugadas ha aumentado su demanda. Recientemente, se ha propuesto para su síntesis el uso de enzimas tales como oxidoreductasas,

La poli-oxidación enzimática del ácido gálico y galato de octilo con la enzima HRP, se lleva acabo manteniendo variables fijas como pH y temperatura, lo cual nos permite obtener 5 materiales novedosos solubles en agua y 4 solubles en etanol, siendo el Poli(ácido gálico)-co-galato de octilo el producto de interés. Se analizaron sus pesos moleculares y estructuras. Así mismo se estudiaron diferentes concentraciones de ambos fenoles presentes (ácido gálico y galato de octilo), 30:70, 40:60 y 50:50 respectivamente, con la finalidad de comprender el efecto de la proporción de estos fenoles sobre el crecimiento bacteriano.

Como es conocido los fenoles debido a la presencia de uno o varios grupos hidroxilo unidos al anillo bencénico, le confieren propiedades antimicrobianas y al ser polimerizados podrían mantener dicha capacidad, esto se analizó por diferentes métodos, la MIC (Concentración Mínima Inhibitoria) donde los materiales solubles en etanol Pgal-co-GO (30:70) Et, Pgal-co-GO (40:60) Et y Pgal-co-GO (50:50) Et presentaron los valores menores de concentración necesaria para inhibir las bacterias G (+) con 200,400 y 400 g/mL y concentraciones de 400,600 y 600 g/mL para bacterias G (-). Por último la Ic_{50} (Inhibición del 50% de los microorganismos presentes), donde también los valores menores se presentaron para los materiales solubles en etanol.

Tomando en cuenta el tamaño y tipo de la cadena polimérica que se podría obtener, se observa de qué manera esto influye en las características antimicrobianas de los materiales sintetizados en este trabajo.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los polímeros comerciales se obtienen con procesos químicos que no son amigables con el medio ambiente. Debido a esto, se han realizado investigaciones para el desarrollo de materiales ambientalmente amigables, obtenidos de fuentes alternativas, con menor consumo de energía, biodegradables y no tóxicos para el medio ambiente.

Esta investigación se realizó con el objetivo de observar el comportamiento de los co-polímeros solubles en agua y solubles en etanol como alternativa. La estructura de estos compuestos depende de la composición y la distribución de los monómeros en la cadena. Las macromoléculas pueden ser lineales o ramificadas y las unidades repetitivas pueden estar arregladas al azar, alternante o en bloque.

Se han empleado una gran variedad de métodos químicos para modificar polifenoles, como son reacciones de oxidación, halogenación y autocondensación en medio ácido implementando el uso de activadores del tipo ácido de Lewis, entre ellos cloruro de titanio. Sin embargo, las modificaciones químicas no son preferidas para aplicaciones en alimentos debido a que se pone en entredicho la inocuidad de los productos. Es por eso que la modificación enzimática es una alternativa atractiva, ya que las enzimas promueven reacciones más limpias y seguras. El uso de enzimas oxidativas representa un método atractivo para la modificación de biopolímeros. Las oxidoreductasas son enzimas con la habilidad de poder co-polimerizar compuestos fenólicos con propiedades antimicrobianas.

Los polifenoles son moléculas que tienen gran actividad biológica y resultan interesantes desde el punto de vista de la industria farmacéutica, biomedicina, biotecnología, agricultura y alimentos. Estos polímeros han emergido como una nueva clase de materiales fisiológicos de alta funcionalidad debido a su actividad antimicrobiana, antioxidante y excelente biocompatibilidad.

1. ANTECEDENTES

1.1 ¿Qué son los polifenoles?

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Estos compuestos podemos denominarlos polifenoles. Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.). Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Quiñones, *et al.*, 2012), como se muestra en la figura 1.

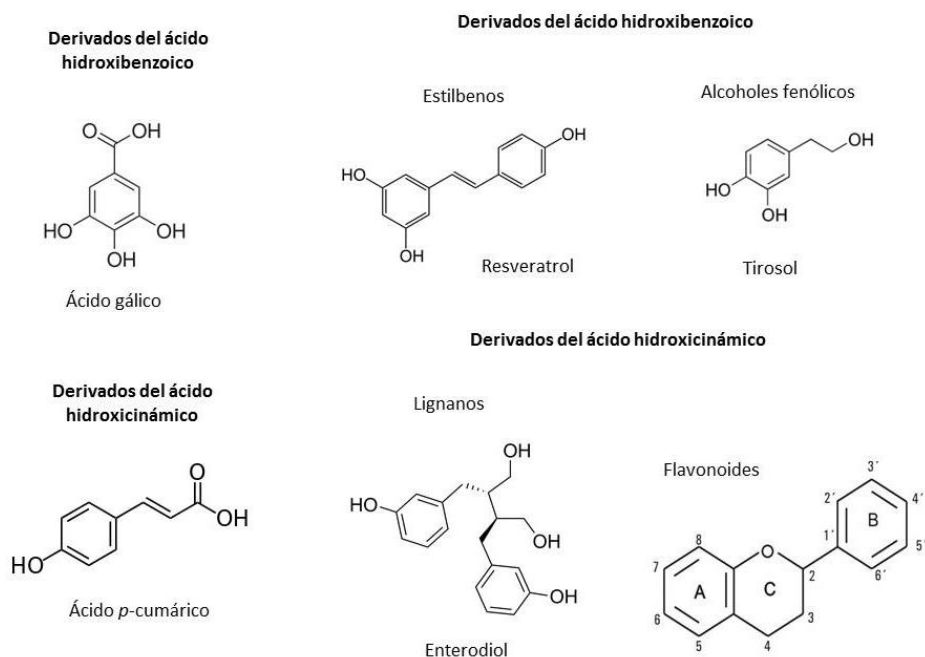


Figura 1. Núcleo estructural de los principales grupos de polifenoles.

(Quiñones, *et al.*, 2012)

El término flavonoides denota un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura benzo- γ -pirano, los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se encuentran de forma universal en las plantas vasculares, en forma de glicósidos. Estas sustancias son de naturaleza fenólica y se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general $C_6 - C_3 - C_6$, los cuales pueden formar o no un tercer anillo (Figura 2) (Cartaya, *et al.*, 2001).

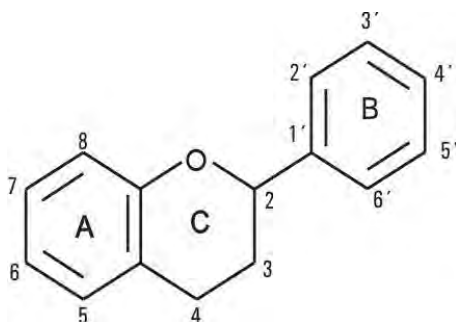


Figura 2. Estructura básica de los flavonoides y su sistema de numeración.
(Cartaya, *et al.*, 2001)

En la figura 2, los anillos son denominados A, B y C; los átomos de carbono individuales son referidos por un sistema numérico, el cual utiliza números ordinarios para los anillos A y C y números primos para el anillo B (Cartaya, *et al.*, 2001).

Los principales subgrupos de compuestos flavonoides son: flavonoles, flavonas, flavanonas (dihidroflavonas), isoflavonas, antocianidinas y flavanoles:

- **Flavonoles:** Se caracterizan por poseer un grupo ceto en el carbono C_4 y una insaturación entre los carbonos C_2 y C_3 . Poseen además un grupo hidroxilo adicional en el carbono C_3 . Representan el grupo más ubicuo de polifenoles presente en los alimentos. La quercetina es el compuesto más representativo.

- **Flavonas:** Poseen un grupo ceto en el carbono C₄ y una insaturación entre los carbonos C₂ y C₃. Son los flavonoides menos abundantes en los alimentos. Perejil y apio representan la única fuente comestible de flavonas.
- **Flavononas:** Son análogos de las flavonas con el anillo C saturado. Se glucosilan principalmente por la unión de un disacárido en el carbono C₇. Constituyen un grupo minoritario en los alimentos. Las flavanonas aparecen a altas concentraciones en cítricos y en tomates.
- **Isoflavonas:** Poseen un anillo bencénico lateral en posición C₃. Su estructura recuerda a la de los estrógenos. Las isoflavonas poseen grupos hidroxilos en los carbonos C₇ y C₄, al igual que sucede en la estructura molecular de la hormona estriol (uno de los tres estrógenos mayoritarios junto al estradiol y la estrona).
- **Antocianidinas:** Son compuestos hidrosolubles, y constituyen uno de los grupos más importantes de pigmentos vegetales. Se encuentran principalmente como heterósidos con los tres anillos de su estructura conjugados. La glucosilación ocurre principalmente en la posición 3 del anillo C o en las posiciones 5 y 7 del anillo A. Se pueden encontrar en ciertas variedades de cereales, en el vino tinto y en algunos vegetales.
- **Chalconas y dihidrochalconas:** Son poco abundantes, pues se convierten en flavanonas en medio ácido y la reacción es fácilmente observable “in vitro” (Quiñones, *et al.*, 2012).

Los ácidos fenólicos pertenecen a los grupos fenólicos simples que tienen un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo, incluyen los derivados del ácido hidroxibenzoico y del ácido hidroxicinámico. Algunos ejemplos pueden ser ácido caféico (3,4-hidroxicinámico), ácido ferúlico (4-hidroxi-3-metoxicinámico), ácido p-cumárico (4-hidroxicinámico), ácido cinámico (4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico) y ácido clorogénico (5 cafeoil quínico) (Gómez, *et al.*, 2012).

Los derivados del ácido cinámico están formados por 9 átomos de carbono mientras que los derivados del ácido benzoico poseen 7 átomos de carbono y son los más simples que se encuentran en la naturaleza (Iglesias, 2009).

A continuación (Figura 3) se presentan las estructuras químicas de los ácidos hidroxicinámicos e hidrobenczoicos más relevantes (Gómez, *et al.*, 2012).

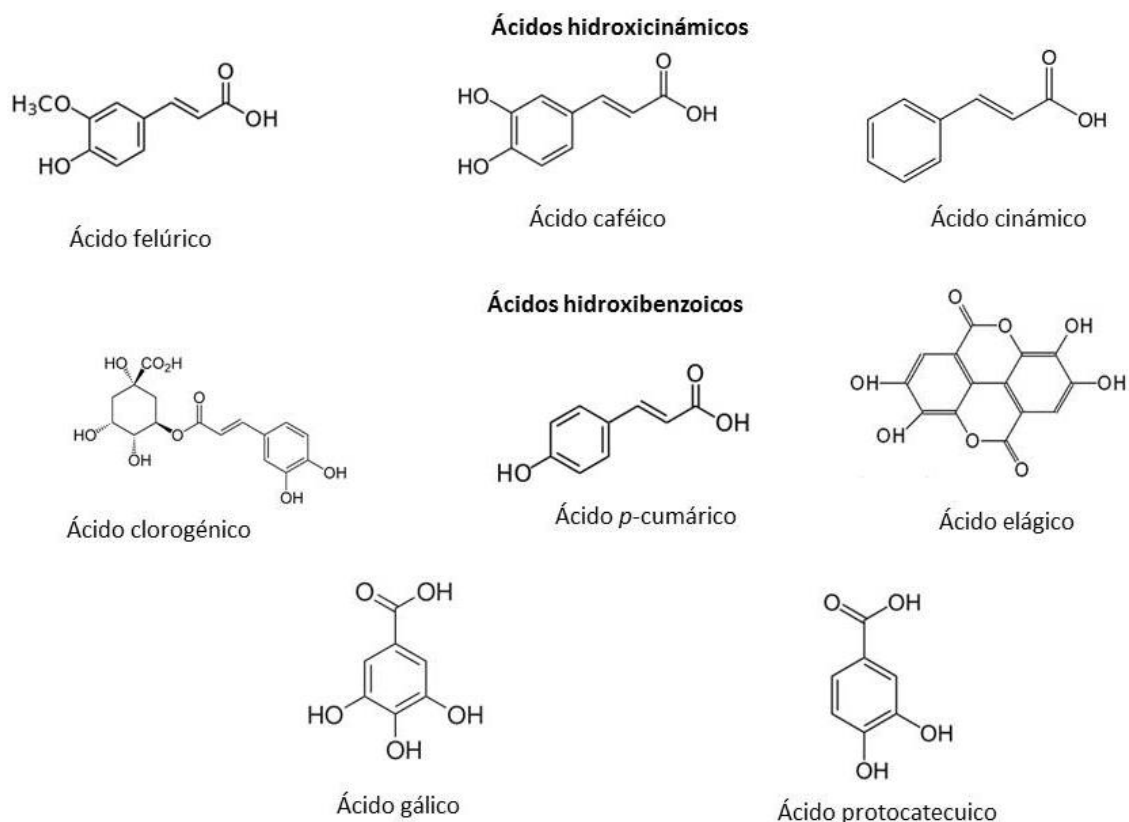


Figura 3. Derivados de ácido benzoico y ácido cinámico.
(Gómez, *et al.*, 2012)

Uno de los principales derivados del ácido benzoico es el ácido gálico, del cual se tiene conocimiento que este compuesto inhibe la oxidación de sustratos simples y complejos, es por esto, que se le atribuyen diversas propiedades biológicas, entre ellas su actividad antimicrobiana y antioxidante, ya que han mostrado algunos beneficios en la salud (Iglesias, 2009).

1.2 Ácido gálico

El ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, AG (Figura 4) es un derivado fenólico natural, que se produce en el metabolismo de muchas plantas por lo que puede considerarse no tóxico, además de ser relativamente económico. Puede encontrarse en diversas frutas (uva, granada, plátano, fresa, limón, arándano, cáscara de manzana y mango) y verduras (acelgas y espinacas) (Saha, *et al.*, 2009).

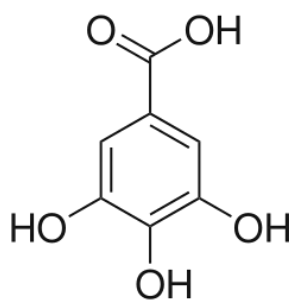


Figura 4. Estructura química del ácido gálico.
(Kim, 2007)

Es producido industrialmente por la hidrólisis ácida de galotaninos (presentes en el aceite de la nuez de agalla) y en menor grado a través de la hidrólisis enzimática de éstos, usando cultivos en medio líquido de *Aspergillus niger* o *Penicillium glaucum* que contengan tanasas (López, 2014).

Los usos principales del ácido gálico se dan en la producción de antimicrobianos, antivirales, analgésicos, incluso exhibe actividad cito-tóxica contra células cancerígenas. Debido a su naturaleza polifenólica le facilita la entrada a la membrana celular; también se utiliza en la determinación de fenoles totales de extractos expresados como equivalentes de ácido gálico mediante el procedimiento de Folin–Ciocalteu (López, 2014; Sharma *et al.*, 1997; Kim, 2007).

1.3 Galatos

El término galato usualmente se refiere a los ésteres de ácido gálico, propil, octil y dodecil (lauril). Los galatos son usados principalmente como antioxidantes en grasas y aceites para prevenir la rancidez y el deterioro. También se utilizan en cosméticos y materiales de embalaje y como aditivos alimentarios en la manteca vegetal, productos horneados, dulces, goma de mascar y leche en polvo. Pueden utilizarse solos o en combinación con Butil hidroxitolueno (BHT) y/o Butil hidroxianisol (Van der Heijden *et al.*, 1986).

1.3.1 Galato de octilo

El galato de octilo (GO), n-octilo de 3,4,5- ácido trihidroxibenzoico o 3,4,5, octil-trihidroxibenzoato (Figura 5) es obtenido a partir de la esterificación del ácido gálico con el n-octanol. Es utilizado ampliamente en el curtido de cuero, la tinción de telas, la fabricación de tintas y como astringente en algunas enfermedades debido a sus propiedades bacteriostáticas (Fujita, *et al.*, 2002).

Es un polvo cristalino, sin sabor y olor, blanco insoluble en agua pero soluble en aceites vegetales, etanol, acetona y éter. Es inestable en presencia de humedad y puede producir un color indeseado en presencia de iones metálicos, por lo que a menudo se utiliza con un secuestrante como el ácido cítrico (Hughes, 1989).

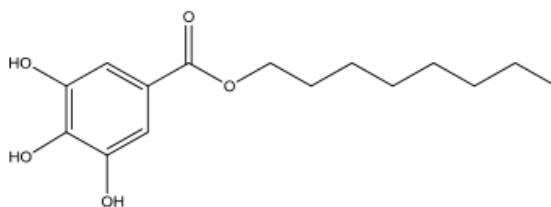


Figura 5. Estructura química del galato de octilo.

(Hughes, 1989)

1.4 Síntesis enzimática de compuestos orgánicos

Los polímeros derivados de compuestos fenólicos se producen industrialmente por síntesis química, lo que involucra el uso de compuestos tóxicos (p.e.: formaldehído, piridina), incluidos metales pesados (p.e.: complejos de Cu), además de que no se tiene bajo control la estructura del producto. En los últimos años se ha estudiado la polimerización enzimática como una alternativa de síntesis a los métodos convencionales que involucran pH extremo, materiales tóxicos y cargas de calor (Kobayashi, *et al.*, 2003)

El estudio de la polimerización enzimática es ventajosa al ofrecer condiciones de reacción suaves y benignas ambientalmente. Esta vía de síntesis ha empleado enzimas oxidoreductasas, como los son la lacasa de *Trametes versicolor* (LTV) y peroxidasa de rábano (HRP), esperando que los catalizadores enzimáticos provean nuevos materiales poliméricos en términos de estructura molecular difíciles de obtener por otras rutas más convencionales (Xu, *et al.*, 2006).

La naturaleza provee un claro ejemplo del poder de las enzimas en la preparación de polímeros fenólicos a través de la síntesis de lignina, uno de los polímeros más abundante sobre la tierra. Las condiciones suaves de reacción aunadas a la alta reactividad y estabilidad de la familia de las oxidoreductasas (enzimas que catalizan la transferencia de electrones, participando en reacciones REDOX) las hacen ideales para las aplicaciones de síntesis. En particular, la HRP y la LTV, han sido usadas para sintetizar polímeros y co-polímeros fenólicos a partir de un amplio intervalo de monómeros, incluyendo *p*-cresol, *p*-fenilfenol, varios naftalenos y el mismo fenol (López, *et al.*, 2014).

En soluciones acuosas, la pobre solubilidad de los monómeros fenólicos aunado a la aún más baja solubilidad de sus derivados polioxidados da como resultado precipitación temprana en el seno de la reacción.

Una forma de mejorar las condiciones de reacción es aprovechar la relativa estabilidad y actividad de las peroxididasas en soluciones microacuosas de disolventes orgánicos (Zaragoza-Gasca, *et al.*, 2010).

1.4.1. Lacasa de *Trametes versicolor*

La lacasa de *Trametes versicolor* es una enzima con actividad fenoloxidasas que contiene átomos de cobre en su centro activo (Figura 6). Tiene un peso molecular de 66 KDa actuando sobre una gran variedad de sustratos, teniendo una mayor predilección por sustratos de tipo fenólico y catecólico, dichos sustratos son oxidados y la oxidación es catalizada por los átomos de cobre y aminoácidos específicos como histidina, metionina y cisteína; la catálisis se lleva a cabo mediante la formación de radicales libres y la posterior reducción del oxígeno molecular a agua.



Figura 6. Estructura tridimensional de la lacasa de *Trametes versicolor*.

(Moya, 2011)

La LTV pertenece al grupo de las oxidasas multicobre (ascorbato oxidasa, ceruloplasmina, fenoxacinona sintasa, bilirrubin oxidasa, entre otras) y es una enzima comúnmente monomérica que contiene 4 átomos de cobre unidos a 3 sitios redox, clasificados de acuerdo a sus características espectroscópicas. El sitio tipo 1 (T1) es mononuclear y le confiere el color azul a la enzima en solución y se caracteriza por una banda de absorción a 600 nm. El sitio tipo 2 (T2) también es mononuclear y presenta una geometría metálica trigonal y propiedades de Resonancia Paramagnética Nuclear comparables con los complejos tetragonales de Cu (II). Finalmente, el sitio tipo 3 (T3) es dinuclear y presenta un estado basal diamagnético que se origina por el acoplamiento antiferromagnético fuerte entre los dos iones Cu (II), conectados por un ión hidroxilo. En el Sitio T1 el sustrato interactúa con la enzima y se lleva a cabo la sustracción de un electrón, mientras que en el sitio T2/T3 se lleva a cabo la reducción del oxígeno a agua (Figura 7) (Román, *et al.*, 2001).

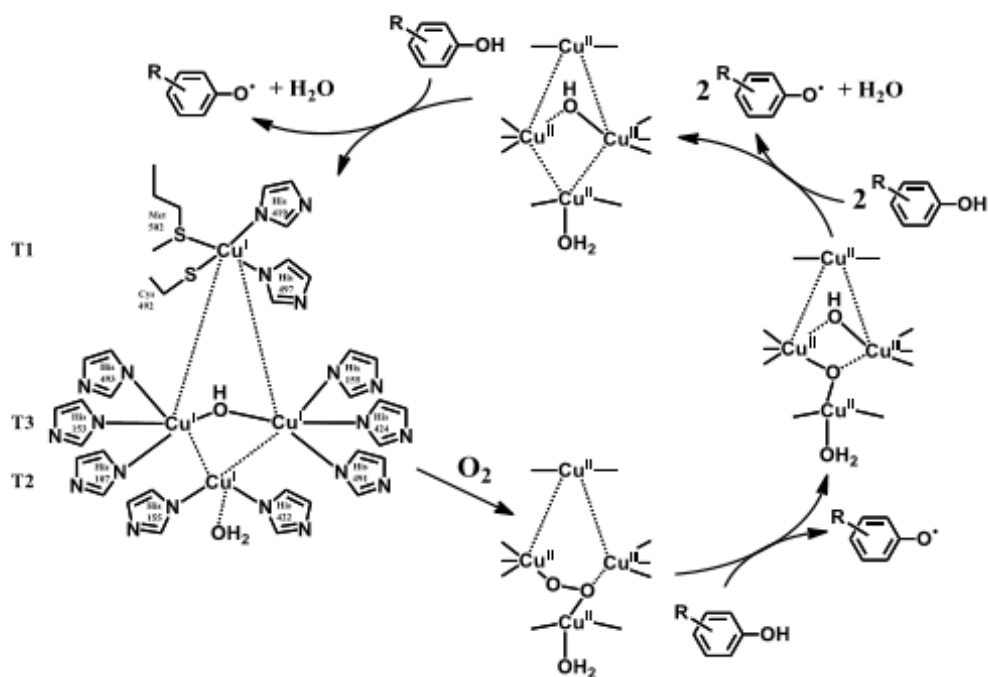


Figura 7. Formación de radicales libre de derivados fenólicos con LTV. (Román, *et al.*, 2001).

1.4.2 Peroxidasa de rábano

Las peroxidases pertenecen a las categorías de las oxido-reductasas y están ampliamente distribuidas en la naturaleza y pueden ser extraídas fácilmente de la mayoría de las células de las plantas, algunos órganos y tejidos animales. De entre ellas, la extraída del rábano picante, por sus siglas en inglés HRP, horseradish peroxidase (Figura 8), es la más usada (Gutiérrez, 2011).



Figura 8. Estructura tridimensional de la peroxidasa de rábano.
(Gutiérrez, 2011)

Esta enzima utiliza como cofactor el grupo hemo (Figura 9). Estas oxidoreductasas usan el peróxido de hidrógeno o alquil peróxidos como oxidantes. Las peroxidases se caracterizan por catalizar la oxidación de uno o dos electrones de varios sustratos orgánicos e inorgánicos, principalmente en presencia de peróxido de hidrógeno (Mahmoudi, *et al.*, 2008).

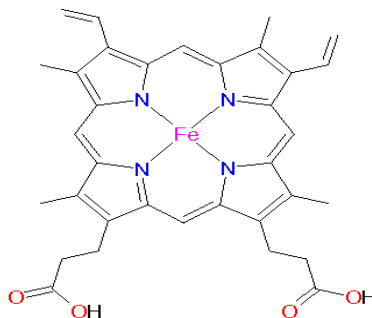


Figura 9. Grupo hemo de peroxidasa de rábano.
(Mahmoudi, *et al.*, 2008)

Las peroxidasas son utilizadas en laboratorios clínicos y en la industria. Así, los ensayos para la determinación y cuantificación de metabolitos como glucosa, ácido úrico, colesterol o triglicéridos en fluidos biológicos usan peroxidasas como enzima acoplada (Gutiérrez, 2011).

Se ha reportado un posible mecanismo de acción de la enzima peroxidasa, en el cual el sitio activo de la enzima, o grupo hemo hierro- protoporfirina se une al peróxido de hidrógeno como se muestra en la figura 10. El mecanismo de reacción involucra la oxidación del Fe^{+3} a un derivado oxo-hierro a expensas del H_2O_2 como se mencionó anteriormente; seguido por la sustitución de un electrón precedente de un sustrato rico en electrones (Puskas, *et al.*, 2009).

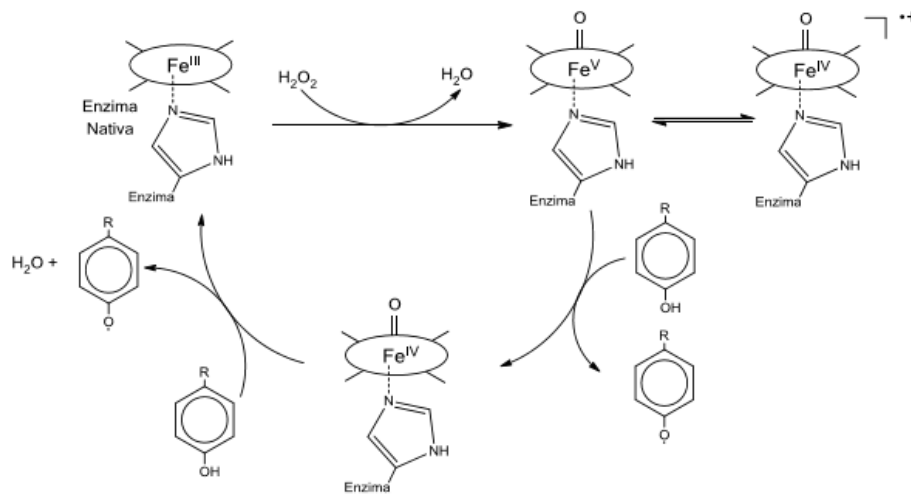


Figura 10. Mecanismo de acción de la HRP en la formación de radicales. (Puskas, *et al.*, 2009)

1.5 Bacterias patógenas empleadas para el efecto de inhibición

Las bacterias son organismos unicelulares procariontes, esto quiere decir que están formados por una sola célula carente de núcleo. No tienen organelos, como mitocondria, cloroplastos o aparato de Golgi. A pesar de su sencilla organización celular, cuentan con una pared celular que envuelve a la célula proporcionándole rigidez y protección (Prescott, *et al.*, 1999)

El tamaño de las bacterias oscila entre las 0.5 y 3 μm , pudiendo llegar en algunos tipos a 10 μm . Solo son visibles entonces, al microscopio óptico.

La forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de la pared celular. Básicamente, se diferencian según su forma en cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral) (Schaechter, *et al.*, 1993).

De acuerdo a la composición de la pared celular, pueden clasificarse en bacterias Gram positivas (G (+)) donde la pared celular contiene una capa gruesa de peptidoglicano además de ácidos teicoicos, que son polímeros de glicerol o ribitol-fosfato. Los ácidos teicoicos se unen al peptidoglicano o a la membrana citoplasmática como se muestra en la figura 11 (Heras, *et al.*, 2009).

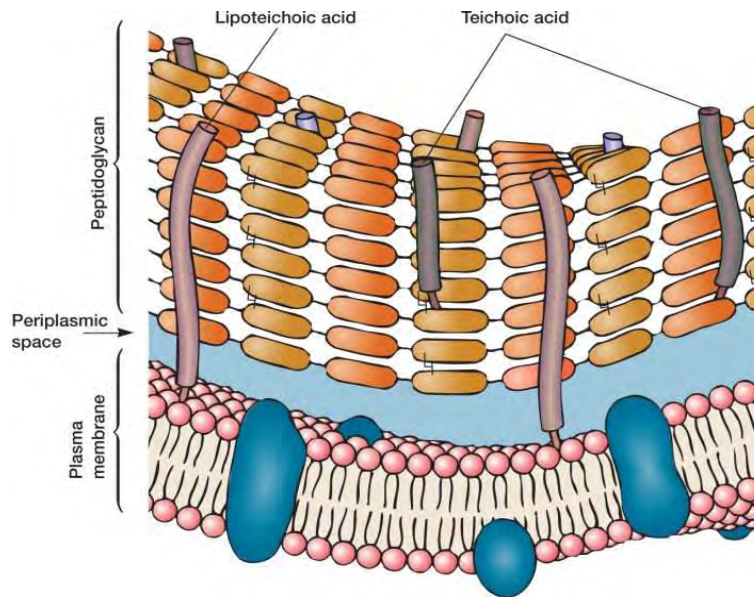


Figura 11. Estructura pared celular de las bacterias G (+).
(Heras, *et al.*, 2009)

Mientras que las bacterias Gram negativas (G (-)) presentan la capa de peptidoglicano relativamente fina y se encuentra rodeada por una segunda membrana lipídica exterior que contiene lipopolisacáridos y lipoproteínas. La capa de peptidoglicano se une a la membrana externa por medio de lipoproteínas (Figura 12) (Heras, *et al.*, 2009).

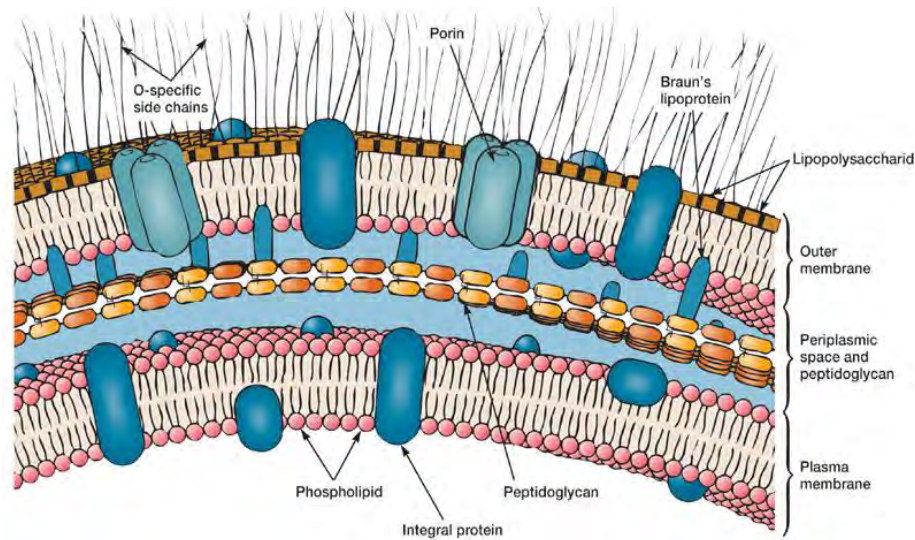


Figura 12. Estructura pared celular de las bacterias G (-).
(Heras, *et al.*, 2009)

Entre los principales microorganismos patógenos que se pueden encontrar en alimentos están *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* provocando infecciones gastrointestinales, vías respiratorias y tejidos (heridas). También podemos encontrar a *Staphylococcus aureus*, productor de la toxina A, que produce gastroenteritis y a *Enterococcus faecalis* que puede causar infecciones de vejiga y próstata (Cappuccino *et al.*, 1992).

1.5.1 *Escherichia coli*

Esta bacteria fue aislada por primera vez en 1885 por el bacteriólogo alemán Theodore Escherich, la cual denominó *Bacterium coli commune*. Es el microorganismo facultativo más predominante en el intestino del hombre y es el bacilo entérico más frecuentemente aislado en el laboratorio (Gallegos, 1999).

Forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*, el género *Escherichia* comprende las especies de *E. coli*, *E. hermannii*, *E. blattae*, *E. vulneris* y *E. fergusonii*. Pero es la especie *E. coli* que mejor se conoce en relación a su capacidad patogénica (Luna, 2003).

Es un bacilo corto, G (-), no esporulado, generalmente con flagelos peritricos y fimbrias. Es un anaerobio facultativo, que crece a temperaturas desde 2.5 a 45 °C y puede sobrevivir a temperaturas de refrigeración congelación. Puede crecer en un intervalo de pH de 4.4 a 9.0. En medio sólido forman colonias lisas, circulares, convexas, con bordes bien definidos (Luna, 2003).

Sus cepas forman la mayor parte de la flora comensal aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo de animales y humanos, eliminándose por las heces al exterior. Por esto, es frecuente que se encuentren en el medio ambiente, donde son capaces de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento constituye un indicador de contaminación fecal (Peña, 2006).

1.5.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, es un bacilo G (-) de metabolismo oxidativo versátil, que posee una ubicua presencia en el ambiente y es resistente a una gran variedad de agentes físicos y químicos, lo cual influye en la alta frecuencia de aislamiento observada y en que sea considerado un patógeno nosocomial primario (Trilla, *et al.*, 1996)

Pseudomonas aeruginosa junto a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*, es uno de los principales patógenos nosocomiales. La incidencia de *P. aeruginosa* en infecciones en hospitales es de alrededor del 14% (Putrit, *et al.*, 1998).

Es un bacilo que con tiene cápsula, generalmente con fimbrias. Es un aerobio estricto, que crece a temperaturas desde 35 a 47 °C y pH de 5.6 a 8.0 (Kamath, et al., 1999).

Para un patógeno oportunista como *P. aeruginosa*, la infección comienza luego de la alteración de los mecanismos normales del sistema inmune del hospedero y se caracteriza por su invasividad. El proceso infeccioso se produce generalmente en tres etapas fundamentales: unión bacteriana (colonización), invasión local y enfermedad sistémica diseminada. Sin embargo según la terapia, el proceso pudiera ser detenido en cualquiera de las etapas (Rumbaugh, et al., 1998)

1.5.3 *Staphylococcus aureus*

Desde su descubrimiento por el médico Alexander Ogston en 1880, *Staphylococcus aureus* es considerado un patógeno con gran potencial para causar múltiples infecciones en el humano y en los animales. Está formado por cocos G (+), con un diámetro de 0.5 a 1.5 µm, agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. El crecimiento ocurre en un amplio rango de temperatura 6.5 a 50 °C, teniendo el óptimo de 30 a 40 °C y un pH entre 4.7 y 9.0 (Olaechea, et al., 2010).

S. aureus forma parte de la flora normal del humano, entre 25 y 50% de la población sana está colonizada por esta bacteria, constituyendo un riesgo por su diseminación. Éste puede ser adquirido a través del contacto con otras personas por exposición al ambiente. Es una de las bacterias patógenas humanas formadoras de toxinas más resistentes que producen gastroenteritis. Algunas cepas producen una o más exoproteínas adicionales, que incluyen: toxina -I del shock tóxico estafilocócico (TSST-I) y toxina exfoliativa (ETA y ETB) (Dinges, et al., 2000).

Las enterotoxinas mencionadas son potentes agentes eméticos y por esta razón están históricamente relacionadas con un cuadro bien definido que es la intoxicación alimentaria por *Staphylococcus aureus* (Dinges, *et al.*, 2000).

1.5.4 *Enterococcus faecalis*

E. faecalis es un coco G (+), anaerobio facultativo, inmóvil y no esporulado. El tamaño de cada célula oscila entre 0.5 y 0.8 micrómetros y es habitante normal del tracto gastrointestinal humano. Esta bacteria ha atraído recientemente la atención de diversos investigadores porque ha sido identificada como una causa frecuente de infecciones periapicales persistentes (Washington, *et al.*, 2005).

La temperatura óptima de crecimiento *in vitro* de este microorganismo es de 35°C, no obstante, se ha observado crecimiento entre 10 °C y 45 °C. Todas las cepas pueden crecer en medios que contengan esculina, la cual hidrolizan en presencia de sales biliares al 40% (medio agar bilis-esculina). Casi todas las cepas son homofermentativas, siendo el ácido láctico el producto final principal de la fermentación de la glucosa, no producen gas y no contienen enzimas citocrómicas (Pardi, *et. al* 2009).

E. faecalis puede causar endocarditis, infecciones de vejiga, próstata, epidídimo; las infecciones de sistema nervioso son menos comunes. Es causa frecuente de infección en tracto urinario (ITU), especialmente en los pacientes hospitalizados. En las mujeres jóvenes puede causar menos del 5% de ITU. Sin embargo, en aquellos pacientes, especialmente hombres mayores, que han tenido cateterización urinaria o algún tipo de instrumentación de las vías urinarias, tienen enfermedades del tracto urinario, o recibieron antibióticos, la tasa de ITU causada por *E. faecalis* aumenta dramáticamente (Pardi, *et. al* 2009).

1.6 Concentración mínima inhibitoria (MIC)

La MIC se define como la concentración más baja de un agente antimicrobiano que pueda inhibir el crecimiento de un microorganismo bajo condiciones definidas (Andrews, *et al.*, 2001).

Existen varios métodos para la determinación de MIC pero las más comunes son los métodos de dilución en agar y de dilución en caldo.

- **Dilución en agar:** En este método las soluciones con un número de bacterias definido son inoculadas directamente sobre placas de agar nutritivo que tienen incorporado diferentes concentraciones de antibiótico o antimicrobiano. Después de la incubación, la presencia de colonias de bacterias sobre las placas indica el crecimiento del organismo.
- **Dilución en caldo:** Este método utiliza el medio de cultivo líquido que contiene una creciente concentración (por lo general una serie de diluciones) del agente antimicrobiano, que se inocula con un número determinado de células bacterianas. El volumen final de la prueba determina si el método se denomina macrodilución, cuando se utiliza un volumen total de 2 mL, o microdilución, si se realiza en placas de microtitulación con $\leq 500 \mu\text{L}$ por pocillo. Después de la incubación, la presencia de turbidez o sedimento indica un crecimiento del organismo (Wiegand, *et al.*, 2008)

Para el presente estudio se empleó el método dilución en caldo para su posterior inoculación en agar y conteo en placa.

1.7 Antecedentes de grupo

En 2011, Carlos Juvencio López Jiménez comenzó una investigación para la síntesis de materiales polifenólicos con propiedades conductoras, mediante la poli-oxidación enzimática mediada por LTV de sustancias y derivados naturales (AG), buscando productos que exhibieran propiedades electro-ópticas tales como conductividad o luminiscencia en donde propuso un método para sintetizar Poli(ácido gálico) (PGAL) con LTV.

López propuso la reacción enzimática general que esquematiza para la polimerización de AG por medio de la enzima LTV (Figura 13).

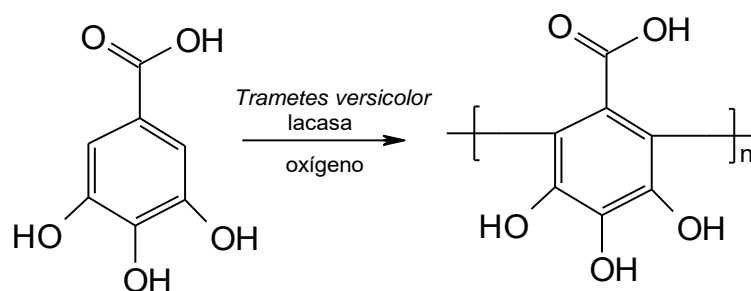


Figura 13. Reacción enzimática general para la polimerización AG con LTV.
(López, 2014)

Posteriormente se continuó analizando sus características, debido a la importancia que tienen los polifenoles, se llevan a cabo investigaciones para determinar sus propiedades antioxidantes (Espino, 2016), conductoras, así como propiedades para recubrimiento (Romero, 2016).

1.8 Justificación

Los polifenoles son moléculas a las que se les atribuyen varias características como su capacidad antimicrobiana y resultan muy interesantes desde el punto de vista de la Química, de la Farmacia, de la Ingeniería Química y de la Biología. La capacidad antioxidante de estas moléculas las hace muy recomendables para la prevención de cáncer y enfermedades cardiovasculares. Se encuentran en varios productos alimenticios, como el vino, la cerveza o el aceite de oliva y, sobre todo, en la cáscara de las frutas. El PGAL y Poli(ácido gálico)-co-polímero-Galato de octilo (Pgal-co-GO) al ser polímeros constituidos por fenoles son materiales novedosos y se tiene interés en el estudio de su capacidad antimicrobiana.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO

2.1 Hipótesis

Debido a que el Poli(ácido gálico) contiene unidades fenólicas y el galato de octilo también, más una cadena alquílica, pueden ampliar el espectro de inhibición microbiana para bacterias Gram positivas y Gram negativas.

2.2 Objetivo general

Obtener los materiales PGAL y co-polímero Pgal-co-GO mediante síntesis enzimática y determinar la concentración mínima necesaria para la inhibición de bacterias (MIC).

2.3 Objetivos específicos

- Determinar la actividad específica de las enzimas empleadas (HRP y LTV).
- Caracterizar los productos obtenidos por medio de FT-IR y ¹H RMN.
- Determinar la solubilidad de los diferentes productos obtenidos.
- Obtener el peso molecular de los diferentes productos por medio de HPLC/SEC.
- Determinar la MIC e IC₅₀ de los productos obtenidos para bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) y Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) mediante cuenta en placa.

3. METODOLOGÍA

Se realizaron 9 síntesis enzimáticas de las cuales se muestra su nomenclatura:

- **PGAL-LTV:** Poli(ácido gálico) sintetizado con la enzima LTV.
- **PGAL-HRP:** Poli(ácido gálico) sintetizado con la enzima HRP.
- **PGO:** Poli(galato de octilo) sintetizado con la enzima HRP.
- **Pgal-co-GO (30:70):** Co-polimerización ácido gálico (30 mM) – galato de octilo (70 mM) soluble en agua.
- **Pgal-co-GO (40:60):** Co-polimerización ácido gálico (40 mM) – galato de octilo (60 mM) soluble en agua.
- **Pgal-co-GO (50:50):** Co-polimerización ácido gálico (50 mM) – galato de octilo (50 mM) soluble en agua.
- **Pgal-co-GO (30:70) Et:** Co-polimerización ácido gálico (30 mM) – galato de octilo (70 mM) soluble en etanol.
- **Pgal-co-GO (40:60) Et:** Co-polimerización ácido gálico (40 mM) – galato de octilo (60 mM) soluble en etanol.
- **Pgal-co-GO (50:50) Et:** Co-polimerización ácido gálico (50 mM) – galato de octilo (50 mM) soluble en etanol.

3.1 Materiales

LTV (enzima libre, Fluka, EUA) con una actividad específica (U) de 0.5 U/mg y HRP (enzima libre, Sigma Aldrich, EUA) con una actividad específica (U) de 250-330 U/mg. Las sustancias químicas utilizadas: ABTS ((2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)), AG, GO, cloruro de sodio (NaCl), cloruro de litio (LiCl) y fosfato de potasio monobásico y dibásico fueron adquiridas de Sigma Aldrich (EUA). Etanol (EtOH), acetona, cloroformo (CHCl₃), hidróxido de sodio (NaOH) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) grado reactivo fueron adquiridas de

Química Suastes S.A. de C.V. (México). Todos los otros compuestos químicos utilizados fueron analíticamente puros y fueron usados como fueron recibidos.

3.2 Determinación de la actividad enzimática de la enzima LTV

La actividad enzimática fue medida agregando 0.05 mL de solución enzimática (1 mg/mL) a 2.9 mL de solución de ABTS (9.1 mM) disuelto en solución amortiguadora de fosfato de potasio (100 mM y pH 5), midiendo la variación de la absorbancia a 405 nm por 2 min ($\epsilon_{405} = 36.8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) utilizando un espectrofotómetro Genesys 10S Uv-vis (Thermoscientific, UEA). La U fue definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1.0 μmol de ABTS por minuto a pH 5.0 (López, 2014).

3.3 Determinación de la actividad enzimática de la enzima HRP

La actividad enzimática fue medida agregando 0.05 mL de solución enzimática (1 mg/mL) a 2.9 mL de solución de ABTS (9.1 mM) disuelto en solución amortiguadora de fosfato de potasio (100 mM y pH 5) y 0.05mL de H_2O_2 (0.3%), midiendo la variación de la absorbancia a 405 nm por 2 min ($\epsilon_{405} = 36.8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) en el espectrofotómetro Genesys 10S Uv-vis (Thermoscientific, UEA). La U fue definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1.0 μmol de ABTS por minuto a pH 5.0 (López, 2014).

Los resultados fueron tratados con las siguientes ecuaciones:

$$AE = \frac{m (VT)(FD)}{E(VE)(lcelda)} \quad (1)$$

$$m = \left(\frac{\Delta abs_{405 \text{ nm}}}{\text{min test}} - \frac{\Delta abs_{405 \text{ nm}}}{\text{min blanco}} \right) \quad (2)$$

$$AE = \frac{\text{Unidades}}{\text{mg de enzima}} \quad (3)$$

Dónde:

AE= es actividad específica

VT= es el volumen total del ensayo

FD = es el factor de dilución

ϵ = es el coeficiente de extinción milimolar a 405 nm

VE = es el volumen de enzima

L = es la longitud de la celda (1 cm)

3.4 Síntesis enzimática de PGAL con LTV

Se agregaron 8.51 g de AG a una mezcla de 250 mL de solución amortiguadora de acetatos (250 mM a pH 5) y 20 mL de NaOH (2 M) en un matraz de bola de tres bocas color ámbar. Esta mezcla de reacción se acondicionó a 25 ± 1 °C con agitación constante (RCT basic safety control IKAMAG®, EUA) mientras se burbujeaba aire usando una bomba Elite 800 (Hagen Inc, Canada) hasta alcanzar una concentración inicial de oxígeno disuelto (OD) de 6 mg mL^{-1} , medida con un sensor de oxígeno Aplisens conectado a un controlador ez-OD (Applikon, Holanda). Posteriormente, se agregaron 0.9481 g (256 U) de LTV y la mezcla de reacción se mantuvo a 25 °C durante 2 días; la mezcla de reacción se precipitó gota a gota en etanol frío (5 °C) bajo condiciones de agitación. Esta mezcla se dejó sedimentar a temperatura de 4°C; se filtró (0.45 μm) y se secó al vacío usando un horno (40 °C) acoplado a sistema de bomba de vacío Vacuubrand PC 3 RZ 2.5 (4×10^{-4} mbar). El polvo de color negro brillante recuperado se pesó y se calculó el rendimiento con base en el porcentaje peso del material purificado entre el peso de sustrato inicial (López, 2014).

3.5 Síntesis enzimática de PGAL con HRP

Se agregaron 3.40 g de AG a una mezcla de 100 mL de solución amortiguadora de acetatos (250 mM a pH 5) y 8 mL de NaOH (2 M) en un matraz de bola color ámbar. Posteriormente, se agregaron 0.0102 g (3357.8 U) de HRP y la mezcla de reacción se mantuvo a 25 ± 1 °C con agitación constante (RCT basic safety control IKAMAG®, EUA) mientras se adicionaba por goteo 3.6 mL de H₂O₂ (0.5 v%) por intervalos de 10 min durante 1 hora, posteriormente se dejó en agitación constante (RCT basic safety control IKAMAG®, EUA) durante una hora. La mezcla de reacción se precipitó gota a gota en etanol frío (5 °C) bajo condiciones de agitación. Esta mezcla se dejó sedimentar a temperatura de 4°C; se filtró (0.45 μm) y se secó al vacío usando un horno (40 °C) acoplado a sistema de bomba de vacío Vacuubrand PC 3 RZ 2.5 (4×10^{-4} mbar). El polvo de color café rojizo recuperado se pesó y se calculó el rendimiento con base en el

porcentaje peso del material purificado entre el peso de sustrato inicial (López, 2014).

3.6 Síntesis enzimática de PGO con HRP

Se agregaron 0.70 g de GO para tener 50 mL de una solución 50 mM en acetona grado reactivo en un matraz de bola color ámbar. Posteriormente, se agregaron 0.0021 g (690.48 U) de HRP y la mezcla de reacción se mantuvo a 25 ± 1 °C mientras se adicionaba por goteo 0.70 mL de H₂O₂ (0.5 v%) por intervalos de 10 min durante 1 hora, posteriormente se dejó en agitación constante (RCT basic safety control IKAMAG®, EUA) durante una hora. La mezcla de reacción se precipitó gota a gota en agua bajo condiciones de agitación. Esta mezcla se dejó sedimentar a temperatura de 4°C; se filtró (0.45 µm) y se secó al vacío usando un horno (40 °C) acoplado a sistema de bomba de vacío Vacuubrand PC 3 RZ 2.5 (4×10^{-4} mbar). El polvo de color amarillo cristalino recuperado se pesó y se calculó el rendimiento con base en el porcentaje peso del material purificado entre el peso de sustrato inicial.

3.7 Síntesis enzimática de los co-polímeros Pgal-co-GO solubles en agua

Se agregaron 50 mL de una solución de AG (30 mM, 40 mM o 50 mM) en solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M a pH 5.5) y 50 mL de una solución GO (70 mM, 60 mM o 50 mM) en acetona grado reactivo en un matraz de bola color ámbar. Posteriormente, se agregaron 0.0032 g (394.56 U) de HRP y la mezcla de reacción se mantuvo a 25 ± 1 °C mientras se adicionaba por goteo 1.4 mL de H₂O₂ (0.5 v%) por intervalos de 10 min durante 1 hora, posteriormente se dejó en agitación constante (RCT basic safety control IKAMAG®, EUA) durante una hora. La mezcla de reacción se precipitó gota a gota en etanol frío (5 °C) bajo condiciones de agitación. Esta mezcla se dejó sedimentar a temperatura de 4°C; se filtró (0.45 µm) y se secó al vacío usando un horno (40 °C) acoplado a sistema de bomba de vacío Vacuubrand PC 3 RZ 2.5 (4×10^{-4} mbar). El polvo de color café recuperado se pesó y se calculó el rendimiento con base en el porcentaje

peso del material purificado entre el peso de sustrato inicial. Las síntesis se realizaron por duplicado.

3.8 Síntesis enzimática de los co-polímeros Pgal-co-GO solubles en etanol

Se agregaron 50 mL de una solución de AG (30 mM, 40 mM o 50 mM) en solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M a pH 5.5) y 50 mL de una solución GO (70 mM, 60 mM o 50 mM) en acetona grado reactivo en un matraz de bola color ámbar. Posteriormente, se agregaron 0.0032 g (394.56 U) de HRP y la mezcla de reacción se mantuvo a 25 ± 1 °C mientras se adicionaba por goteo 1.4 mL de H₂O₂ (0.5 v%) por intervalos de 10 min durante 1 hora, posteriormente se dejó en agitación constante (RCT basic safety control IKAMAG®, EUA) durante una hora. La mezcla de reacción se precipitó gota a gota en agua bajo condiciones de agitación. Esta mezcla se dejó sedimentar a temperatura de 4°C; se filtró (0.45 µm) y se secó al vacío usando un horno (40 °C) acoplado a sistema de bomba de vacío Vacuubrand PC 3 RZ 2.5 (4 x 10⁻⁴ mbar). El polvo de color amarillo se pesó y se calculó el rendimiento con base en el porcentaje peso del material purificado entre el peso de sustrato inicial.

3.9 Determinación de la inhibición microbiana mediante cuenta en placa

3.9.1 Medios de cultivo y microorganismos

Se preparó caldo nutritivo y agar bacteriológico Muller Hinton (MH) como se muestra en la tabla B.1 (Apéndice B). Se empleó *S. aureus* (ATCC 29213), *E. faecalis* (ATCC 29212), *E. coli* (ATCC 25922) y *P. aeruginosa* (ATCC 27853) como microorganismos para evaluar la actividad antimicrobiana.

3.9.2 Preparación de inóculo

Se inocularon los microorganismos mencionados en agar bacteriológico MH por estría y se incubaron a 37°C durante 18 horas. Se repitió este proceso por segunda ocasión pero tomando del cultivo por asada y colocándolo en 10 mL de caldo nutritivo MH.

3.9.3 Determinación de MIC

Para la determinación de la MIC se utilizó la técnica de microdilución en placas. Se utilizaron diferentes concentraciones de los materiales 100, 200, 400, 600, 800, 900 y 1000 mg/L. Para esto se preparó 10 mL de una solución madre (2000 mg/L) de cada material y las preparaciones se realizaron en tubos eppendorf para homogeneizar las muestras, tal como se muestra en la tabla B. 2 (Apéndice B).

Se inoculó 250 µl del microorganismo, 1×10^3 UFC/mL, en solución salina isotónica (SSI) [0.9%] adicionado con los materiales, se incubó durante 18 horas a 37 °C. Después de este tiempo se realizó la determinación de crecimiento del microorganismo por un método modificado de siembra sobre superficie, en el cual se depositaron 5 µL de la dilución (hasta 10^{-3}) en una caja petri con agar nutritivo. Para obtener el número de unidades formadoras por mililitro (UFC/mL) se contaron las colonias de la dilución mayor y se multiplicó por 200 (para obtener 1 mL) y por el inverso de la dilución.

3.9.4 Determinación de la IC₅₀

La IC₅₀ se obtuvo mediante la pendiente y ordenada al origen de graficar el % de inhibición contra la concentración presente de los materiales. Se calculó con la ecuación 4:

$$I_{50} = \frac{50\% - b}{m} \quad (4)$$

El porcentaje de inhibición se calculó con la ecuación 5:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{UFCc - UFCt}{UFCc} \right) \quad (5)$$

Dónde:

UFCc: Se refiere a las unidades formadoras de colonias que se contabilizaron en el medio de cultivo sin la presencia del material después de 18 horas de incubación.

UFCt: Se refiere a las unidades formadoras de colonias que se contabilizaron en el medio de cultivo adicionado con el material después de 18 horas de incubación.

3.10 Espectroscopia FT-IR

La espectroscopia FT-IR se realizó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI) de la Facultad de Química en un espectrofotómetro ATR FT-IR Spectrum 400 (Perkin Elmer, EUA).

3.11 Resonancia Magnética Nuclear

RMN en líquido se realizó en la USAI de la Facultad de Química. Los espectros de RMN de protón (^1H RMN) se recolectaron en un espectrómetro modelo Unity Inova (Varian, EUA).

3.12 Cromatografía de exclusión por tamaño (HPLC/SEC)

Se realizó una medición mediante SEC en un cromatógrafo Agilent 1210 series (EUA) equipado con automuestreador y detector de índice de refracción. Para el análisis de los productos solubles en agua se utilizó una columna Ultrahydrogel 500 (7.8 x 300 mm, Waters, EUA) y una solución 0.1 M de LiCl en agua ultrapura desionizada (Millipore infinity UV) como fase de elución (para evitar la formación de agregados) a un flujo de 0.8 mL/min y 30 °C. Estándares de polietilenglicol (Varian, UEA) fueron usados para la calibración; tanto los estándares como las muestras de producto fueron disueltas en la fase móvil (entre 1.5 y 2.5 mg mL⁻¹) y filtradas (0.45 µm) antes de ser inyectadas al cromatógrafo.

Mientras que para los productos solubles en etanol se utilizó una columna PLgel 10 µm (7.5 x 300 mm, Organic, EUA) y una solución de CHCl₃ en como fase de elución (para evitar la formación de agregados) a un flujo de 0.8 mL/min y 25 °C. Estándares de poliestireno (Varian, UEA) fueron usados para la calibración; tanto los estándares como las muestras de producto fueron disueltas en la fase móvil (entre 1.5 y 2.5 mg mL⁻¹) y filtradas (0.45 µm) antes de ser inyectadas al cromatógrafo.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 Determinación de la actividad enzimática específica U/mg de la LTV y HRP

Al realizar el análisis de la actividad enzimática los resultados obtenidos están reportados en la Tabla C.1 (Apéndice C).

Tabla 1. Resultados de la actividad específica de LTV y HRP

Enzima	Actividad específica (U/mg enzima)
LTV	0.27
HRP	328.80

La enzima LTV que contiene en su etiqueta una actividad enzimática específica de 0.5 U/mg, reportó una actividad de 0.27 U/ mg.

Mientras que la actividad enzimática específica calculada de la enzima HRP, resultó ser de 328.80 U/mg. La etiqueta dada por el fabricante (SIGMA-ALDRICH) reporta una actividad enzimática de 330 U/mg, por lo que podemos concluir que la diferencia es mínima.

4.2 Síntesis enzimática y caracterización de los productos obtenidos

Los datos reportados por López, 2014, indican que las reacciones tienden a formar radicales libres y de acuerdo al tipo de enzima se puede pensar que la reacción con HRP formará secuencias de propagación fenil-fenil y/o fenil-oxi, mientras que la reacción con LTV tiende a formar compuestos lineales de propagación únicamente fenil-fenil. Por lo que se cree que la figura 14 muestra el esquema de la reacción enzimática para la polimerización del AG utilizando la enzima HRP con la posible estructura del producto.

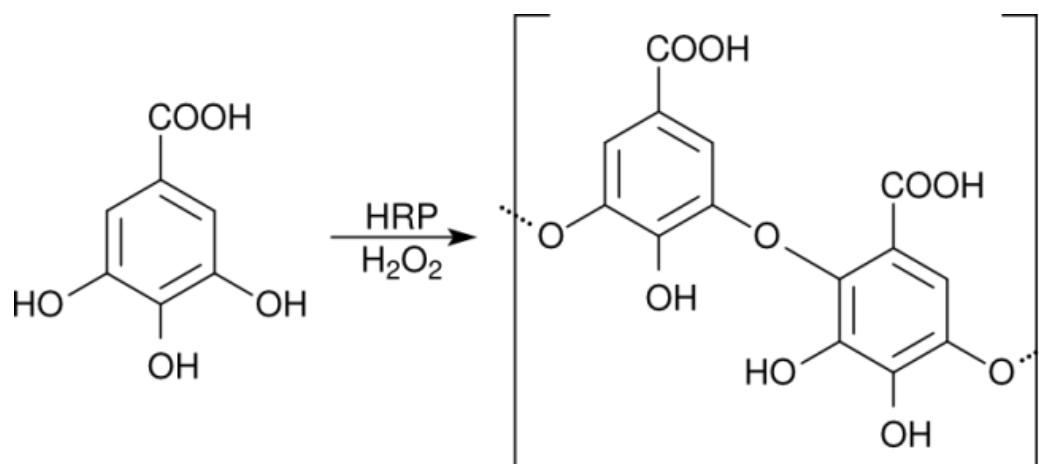


Figura 14. Reacción enzimática general para la polimerización AG con HRP.

De acuerdo a lo anterior, las co-polimerizaciones (Pgal-co-GO) realizadas con AG y GO con la enzima HRP posiblemente podrían presentar enlaces fenil-fenil y/o fenil-oxi.

Se determinaron los rendimientos de cada una de la síntesis tomando como referencia el peso de AG y/o GO inicial y el peso del producto obtenido, la solubilidad se determinó agregando miligramo por miligramo de cada material en un mililitro de agua hasta no tener aparición de precipitado alguno. También se obtuvo el peso molecular (PM) y polidispersidad (PDI) mediante SEC, los cuales se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Rendimientos y distribución de PM de los materiales sintetizados

Muestra	Rendimiento (%)	PM (g/mol)	PDI	Solubilidad en agua (mg/mL)	Solubilidad en etanol (mg/mL)
PGAL-LTV	95.74	7576	1.1783	500	----
	89.77	7550	1.1567	510	
PGAL-HRP	17.52	4838	1.0001	60	
	14.98	4844	1.0235	55	
PGO	36.45	1406	1.0426	----	400
	40.65	1422	1.2222	----	390
Pgal-co-GO (30:70)	25.20	3549	1.0392	7	----
	19.41	3551	1.0411	5	
Pgal-co-GO (40:60)	28.06	3504	1.0515	9	
	21.13	3517	1.0687	10	
Pgal-co-GO (50:50)	22.47	3626	1.0015	12	
	20.56	3603	1.0377	14	
Pgal-co-GO (30:70) Et	73.57	1033	1.0456	----	350
	79.24	998	1.0319		370
Pgal-co-GO (40:60) Et	68.54	1119	1.0738		325
	77.77	1111	1.0417		300
Pgal-co-GO (50:50) Et	76.56	1071	1.0392		270
	75.03	1024	1.0356		250

Tomando en cuenta la solubilidad del PGAL-LTV reportada por López en el año 2014 con un valor de 500 mg/mL, el cual coincide al resultado experimental, se observa una disminución en la solubilidad en el polímero PGAL-HRP, el cual tienen una solubilidad de 57.5 mg/mL promedio. Por lo que hubo una disminución del PM y de la solubilidad, esto puede ser debido a la presencia del enlace fenil-oxil provocado por la enzima HRP. Mientras, en el material PGO la solubilidad se conserva con respecto a la del monómero (350 mg/100 mL EtOH) que es reportada en la literatura (Hughes, 1989). Se puede suponer que se tienen aproximadamente 5 unidades del monómero GO, ya que el PM de éste es de 282.33 g/mol y el del polímero PGO es 1414 g/mol promedio.

Se realizó un análisis de SEC en una fase acuosa de LiCl y una fase orgánica de CHCl₃, usando estándares de polietilenglicol y poliestireno, respectivamente en los materiales de acuerdo a la naturaleza de su solubilidad,

obteniendo resultados de peso molecular promedio en número y PDI de las muestras de polímero.

De acuerdo a la tabla 2 el PM es mayor en los co-polímeros Pgal-co-GO solubles en agua. Se puede concluir que en estos materiales se tiene la formación de polímeros posiblemente con mayor cantidad de AG por lo cual son solubles en agua como sucede en PGAL-HRP, pero ésta disminuye en los co-polímeros solubles en agua por los enlaces fenil-oxi y la cadena alquílica del GO que pueda estar inmersa en el co-polímero. Mientras, en los materiales solubles en etanol se podría dar la formación de oligómeros, suponiendo tener mayor cantidad de unidades de GO, haciéndolos co-polímeros más hidrofóbicos aumentando su solubilidad en etanol.

Al obtener el rendimiento se tiene mayor rendimiento en los materiales solubles en etanol con respecto a los solubles en agua, observando el favorecimiento de la formación de oligómeros.

Cabe destacar que en los dos tipos de materiales solubles en etanol y solubles en agua, no hubo diferencia entre ellos de PM por las diferentes proporciones de AG y GO que se colocaron, más no fue así para la solubilidad ya que en el caso de los materiales solubles en agua, presentó menor solubilidad el co-polímero Pgal-co-GO (30:70) como se esperaba, ya que en éste se colocó mayor proporción de GO y este compuesto es hidrófobo, mientras que el material Pgal-co-GO (30:70) Et, presentó mayor solubilidad en etanol.

El SEC está basado en la permeabilidad de las moléculas y se puede hipotetizar que la estructura molecular del materiales obtenidos con HRP pueden ser lineales y tener ramificaciones, por lo cual al tener ramificaciones hace que el volumen hidrodinámico sea menor y este producto permee más y por consiguiente se sobreestime el peso molecular contra los estándares lineales de polietilenglicol. Otro dato que puede dar fuerza a esta hipótesis podría ser la solubilidad, en una propagación fenil-fenil los grupos polares próticos como hidroxilo y carboxílico favorecen más la solvatación por la formación por puentes de hidrógeno. Sin

embargo, la longitud de cadena puede ser un factor determinante en cuanto a la solubilidad del compuesto.

Los materiales fueron caracterizados por las siguientes técnicas.

4.2.1 Espectroscopia FT-IR

En la Figura 15 se muestran los espectros de FT-IR del AG, PGAL-LTV y PGAL-HRP. En el PGAL-LTV se observa bandas anchas (indicativos de polimerización); tanto la banda intensa y ancha de entre 3000 y 3400 cm^{-1} , indicativo de la presencia de una gran proporción de grupos hidroxilo, como la ausencia de una banda entre 1230 y 1270 cm^{-1} (característica de enlaces éter C-O-C aromáticos) son indicativos de una elongación polimérica vía enlaces fenil-fenil entre los carbonos 2 y 6 de la unidad de repetición. Mientras que en el caso del PGAL con HRP se encuentra la banda entre 1230 y 1270 cm^{-1} la cual da indicios de un probable enlace fenil – oxi entre los carbonos 2 y 6 de acuerdo con López *et al.*, 2014.

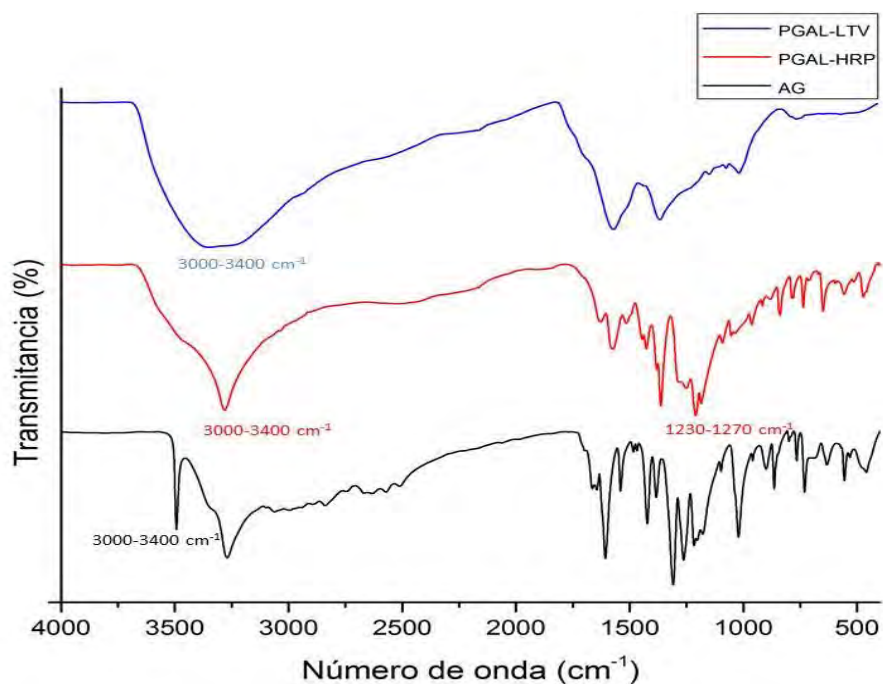


Figura 15. Espectro FT-IR del AG, PGAL-LTV y PGAL HRP.

El espectro FT-IR del PGO, contiene también el ensanchamiento de las bandas evidenciando la co-polimerización, la banda entre 2800 y 2900 cm^{-1} nos muestra la cadena alquílica contenida en la estructura del GO y al igual que en el espectro FT-IR del se puede ver una banda en 1242.62 cm^{-1} evidenciando la posible presencia del enlace fenil-oxi provocado por la enzima HRP (Figura 16).

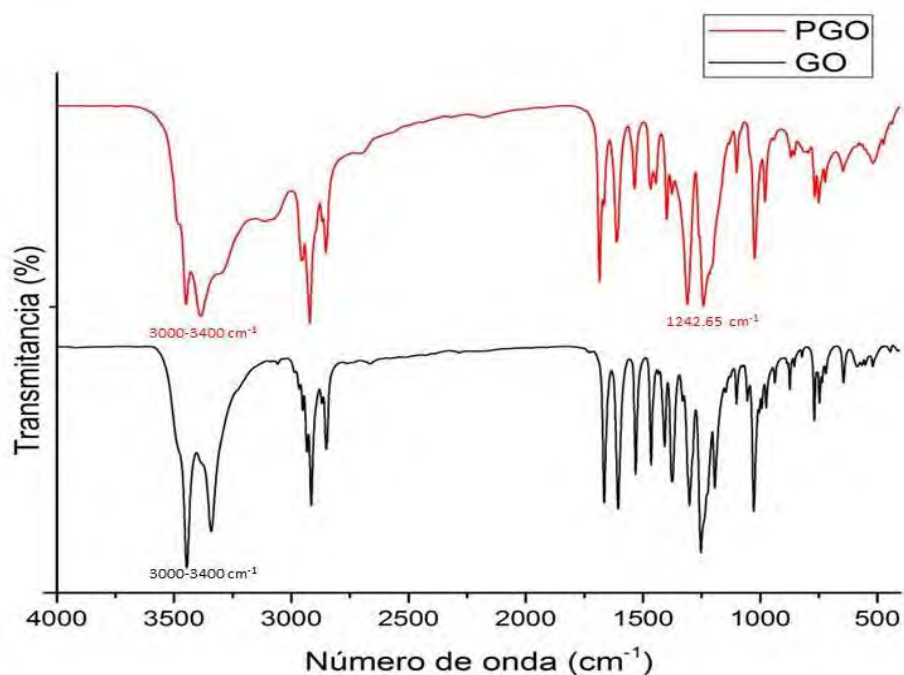


Figura 16. Espectro FT-IR del GO y PGO.

La figura 17 ilustra los espectros FT-IR de los co-polímeros Pgal-co-GO solubles en agua, como se puede ver en estos tres materiales la presencia de la banda que refleja a los grupos hidroxilo (-OH), entre 3000 y 3400 cm^{-1} , disminuye notablemente con respecto a los monómeros AG y GO, esto es debido a que los radicales del fenol generados por la oxidoreductasa, en este caso por HRP pueden reaccionar principalmente a través de sus grupos hidroxilo, formando enlaces fenil-fenil, fenil-oxi y/o carboxi-oxi (Nady, *et al.*, 2012). El esquema de reacción de una enzima oxidoreductasa de lo anterior mencionado se puede observar en la figura 18.

Con respecto a la banda del grupo éter (C-O-C aromáticos) donde podemos observar el enlace fenil-oxi (entre 1230 y 1270 cm^{-1}), se encuentra intensa y ancha evidenciando la polimerización, mientras que entre 2800 y 2900 cm^{-1} la banda es apenas visible, correspondiente a la cadena alquílica del GO. Con esto se puede concluir que es mínima la cantidad de GO presente en el polímero como se suponía al determinar el PM y la solubilidad. No se mostró diferencia entre los espectros de FT-IR de los materiales Pgal-co-GO solubles en agua.

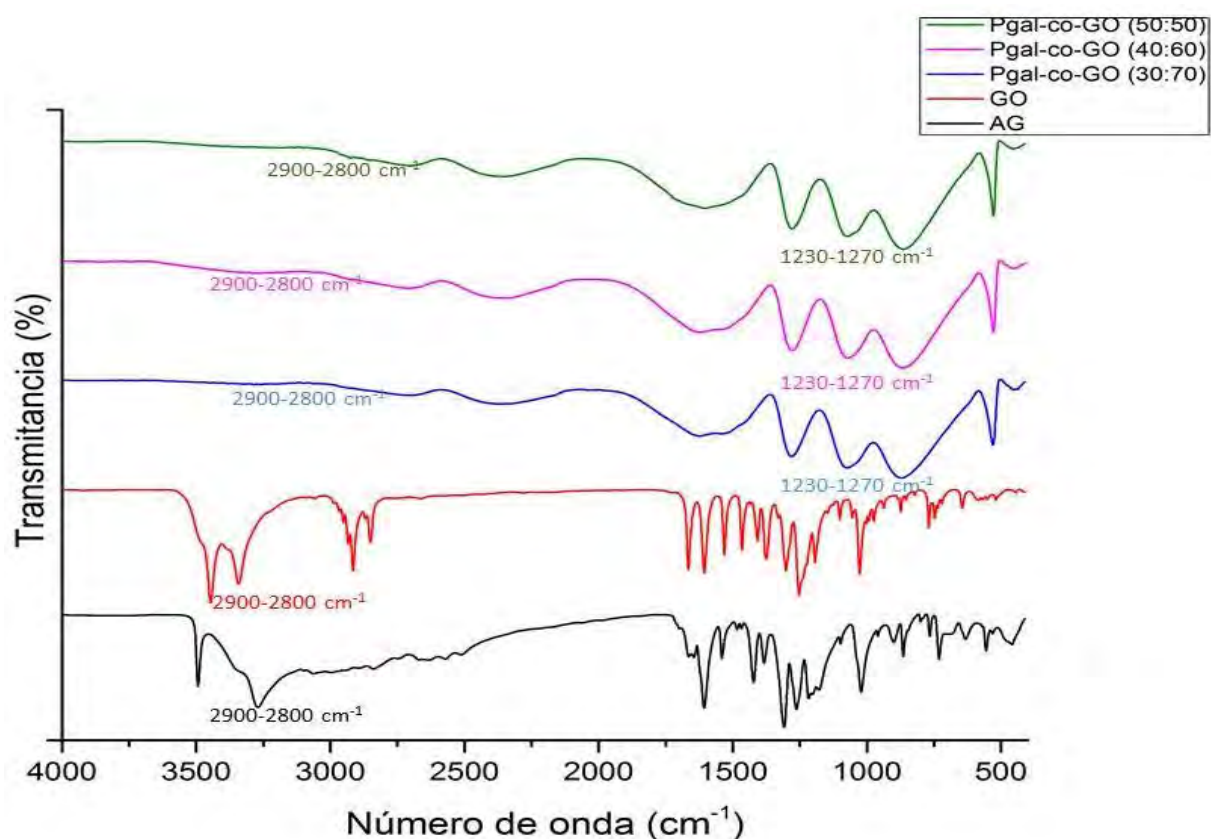


Figura 17. Espectro FT-IR del AG, GO, Pgal-co-GO (30:70), Pgal-co-GO (40:60) y Pgal-co-GO (50:50).

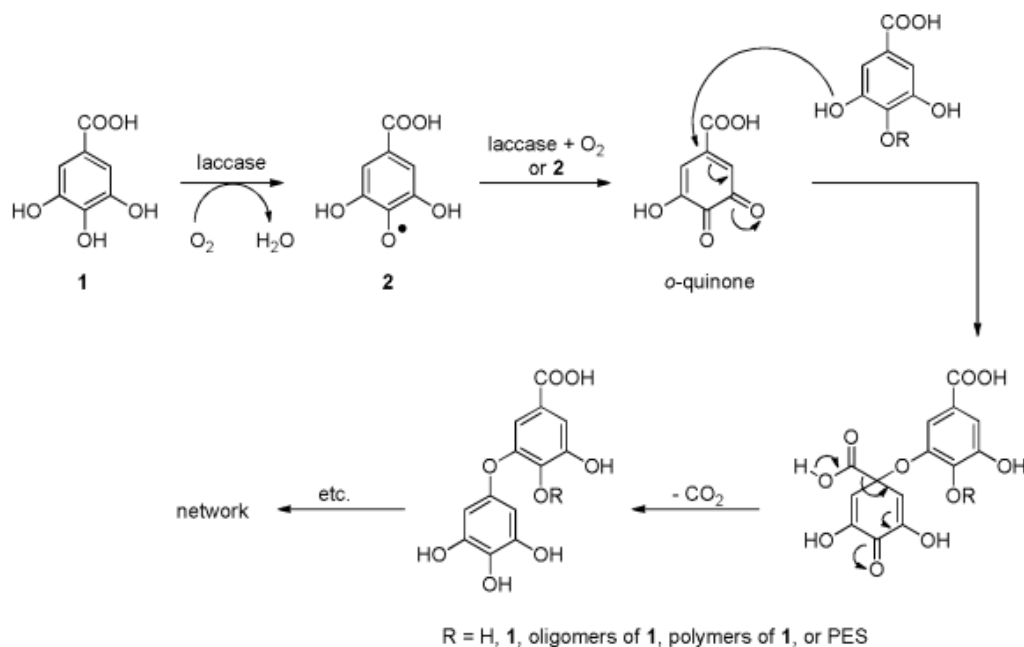


Figura 18. Mecanismo de reacción propuesto de la lacasa de una quinona derivada del ácido gálico.

(Nady, *et al.*, 2012)

Los espectros FT-IR de los productos Pgal-co-GO solubles en etanol, se muestran en la figura 19, y como se observa, estos presentan bandas muy parecidas a las del espectro FT-IR del GO pero se puede descartar la presencia de éste por los PM reportados en la tabla 2. Es decir, la banda entre 2800 y 2900 cm^{-1} nos muestra la cadena alquílica contenida en el GO y una banda entre 1230 y 1270 cm^{-1} evidenciando la posible presencia del enlace fenil-oxi provocado por la enzima HRP. Se puede concluir que posiblemente se dé la formación de oligómeros con mayor número de unidades de GO, desfasando así las señales características del AG. Esto también se pudo ver con el PM y solubilidad de estos materiales. No se mostró diferencia entre los espectros de FT-IR de los materiales Pgal-co-GO solubles en etanol.

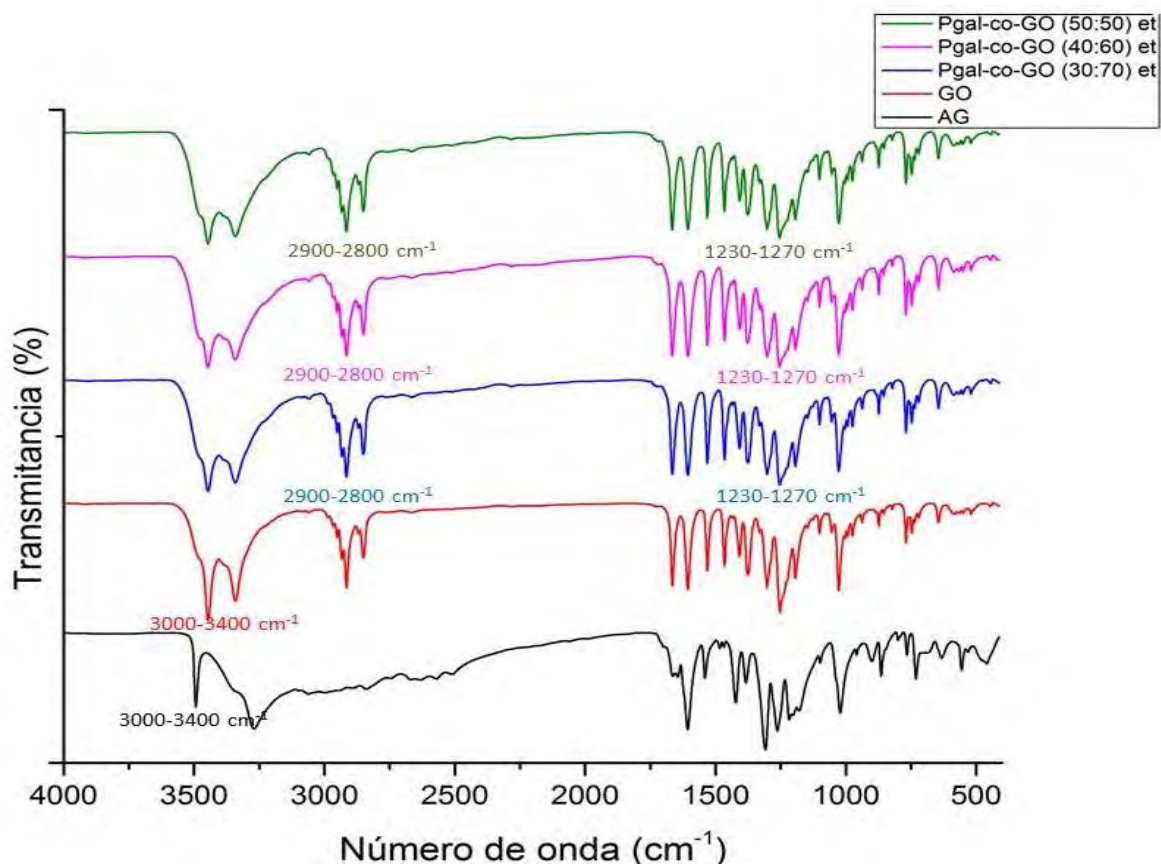


Figura 19. Espectro FT-IR del AG, GO, Pgal-co-GO (30:70) Et, Pgal-co-GO (40:60) Et y Pgal-co-GO (50:50) Et.

4.2.2 Resonancia Magnética Nuclear

La RMN es la herramienta más poderosa de la que se dispone para la determinación de una estructura molecular. En RMN se utilizan una amplia variedad de isótopos con número atómico impar como ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F y ^{31}P . Los más usados en química orgánica son la de protón (^1H) y la de carbono 13 (^{13}C), ya que el carbono y el hidrógeno son los componentes mayoritarios de las moléculas orgánicas (Wade, 2004). Para este trabajo se usó el análisis de protón (^1H).

De acuerdo con el análisis antes realizado se encontró que, el espectro de ^1H RMN de PGAL-LTV no mostró señales en la región aromática (7.0-8.5 ppm), en contraste con la del AG (Figura 20). La desaparición de esta señal indicó que el crecimiento polimérico se dio vía enlaces fenil-fenil (López, 2014).

Mientras que en el PGAL-HRP al ampliar el espectro este muestra señales en la región aromática, al igual que el AG, por lo cual nuevamente se dan indicios de un enlace fenil-oxi, tal y como se discutió anteriormente con la SEC y FT-IR además que ayuda en plantear la idea de una estructura lineal o ramificada (Figura 20).

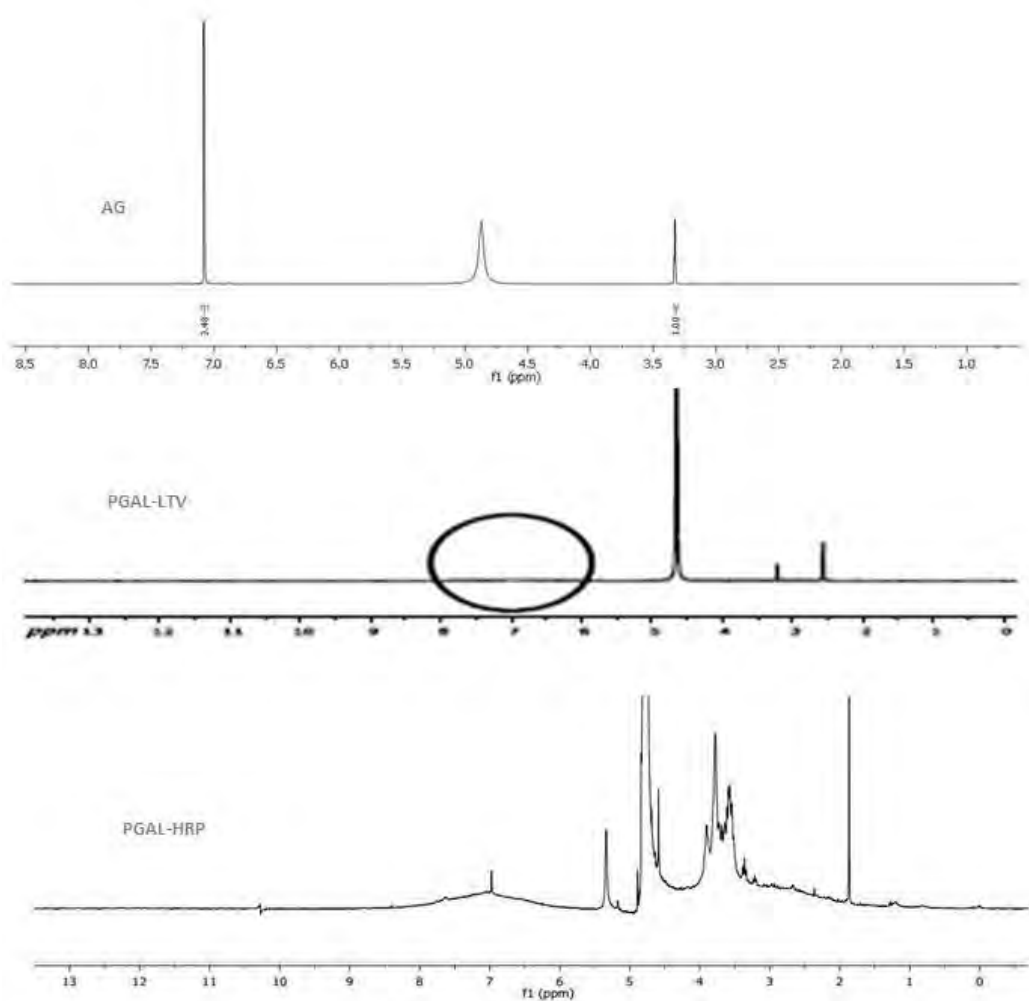


Figura 20. Espectro ^1H RMN de AG, PGAL-LTV y PGAL-HRP.

Para el caso del polímero PGO, el espectro ^1H RMN (Figura 21) muestra señal intensa en la zona aromática (7.0-8.5 ppm). Confirmando la presencia de esta zona, se puede observar también una señal entre 4.0 y 4.7 ppm que indica la presencia del grupo fenol.

Las señales del polímero PGO que se muestran entre 1.0-2.3 ppm corresponden a la cadena alifática también presentes en el GO (Figura 20). Estas señales se observan intensas en comparación a las del espectro ^1H RMN (Figura 21) del monómero GO, lo que nos indica que si se llevó a cabo la polimerización de este.

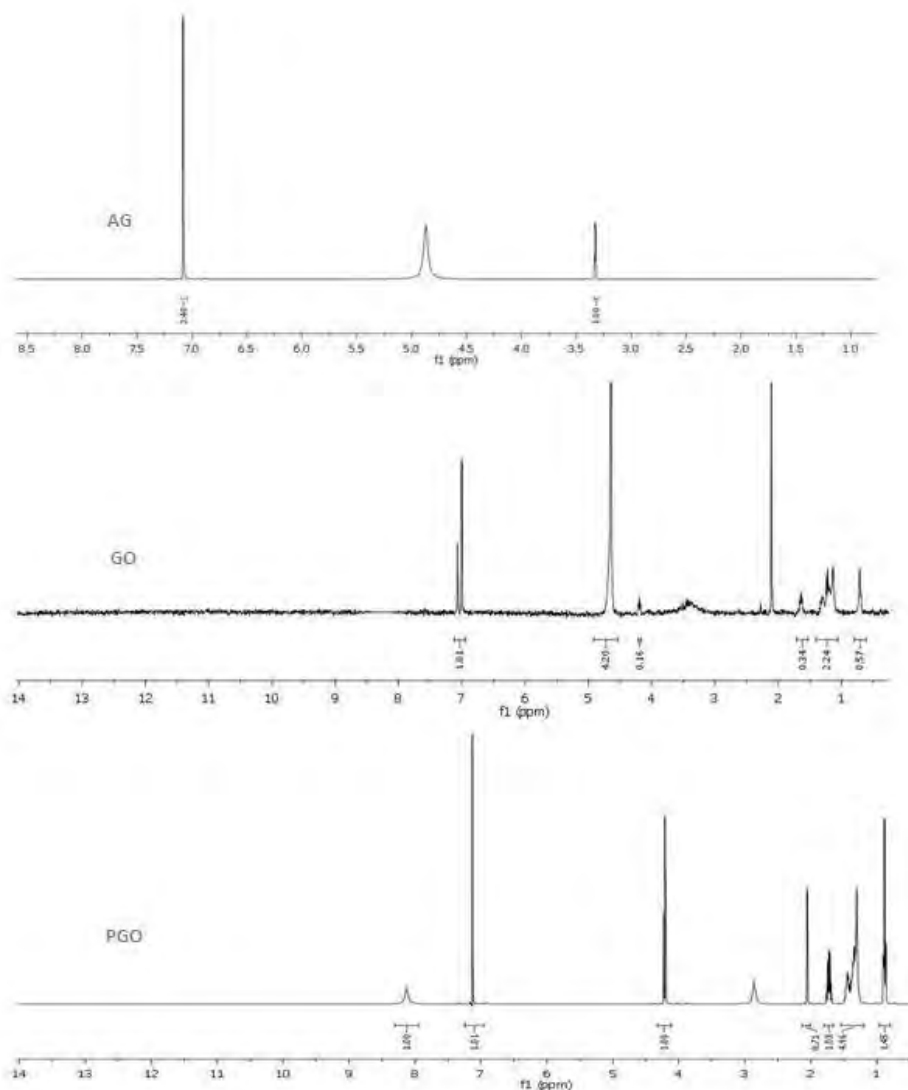


Figura 21. Espectro ^1H RMN de AG, GO y PGO.

Los espectros ^1H RMN de los productos Pgal-co-GO solubles en etanol, se muestran en la figura 23, y como se observa, estos presentan señales muy parecidas a las del espectro ^1H RMN del PGO (Figura 20). Es decir, aparece señal intensa en la zona aromática (7.0-8.5 ppm) y las señales entre 1.3 y 2.0 característica de la cadena alquílica del GO. Se puede concluir que posiblemente se dé la formación de oligómeros con mayor número de unidades de GO, desfasando así las señales características del AG como se pudo ver con el SEC y FT-IR de estos productos. No se mostró diferencia entre los espectros ^1H RMN de los materiales Pgal-co-GO solubles en etanol.

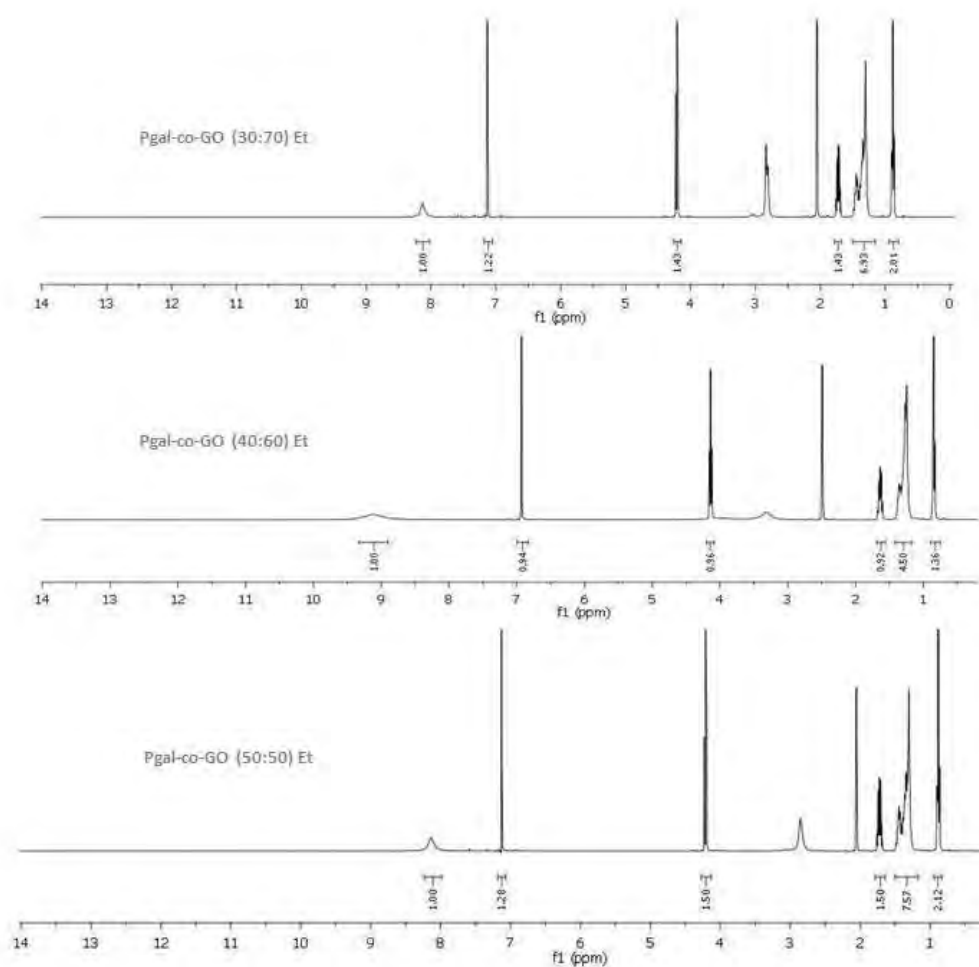


Figura 23. Espectro ^1H RMN del Pgal-co-GO (30:70) Et, Pgal-co-GO (40:60) Et y Pgal-co-GO (50:50) Et.

4.3 Determinación de la inhibición microbiana mediante cuenta en placa

4.3.1 Determinación de MIC

Después de 18 horas de incubación a 37° C se observó crecimiento de las bacterias patógenas empleadas, se realizó la determinación del crecimiento por la técnica de la gota y se obtuvieron los siguientes resultados de la MIC (Tabla 3):

Tabla 3. Resultados de la MIC para los materiales obtenidos

Material	MIC (mg/L)			
	G (+)		G (-)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
AG	600	600	900	900
GO	400	400	800	800
EtOH	200	200	400	400
PGAL-LTV	900	900	----	
PGAL-HRP	800	800	900	900
PGO	600	600	800	800
Pgal-co-GO (30:70)	400	400	600	600
Pgal-co-GO (40:60)	600	600	800	800
Pgal-co-GO (50:50)	800	800	900	900
Pgal-co-GO (30:70) Et	200	200	400	400
Pgal-co-GO (40:60) Et	400	400	600	600
Pgal-co-GO (50:50) Et	400	400	600	600

4.3.1.1 Determinación de MIC en bacterias G (+)

En las figura 24 y 25 se muestra la cuenta bacteriana de *S. aureus* y *E. faecalis* respectivamente, determinada en agar MH para los controles AG y GO y para los polímeros PGAL-LTV, PGAL-HRP y PGO.

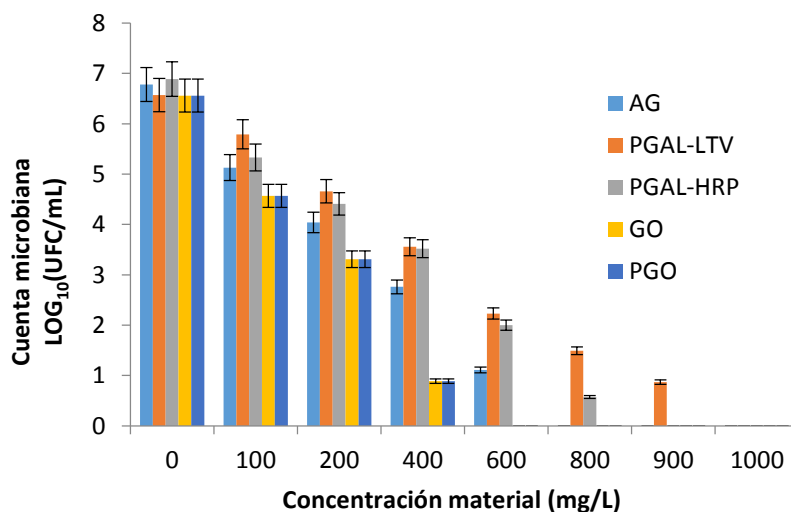


Figura 24. Determinación de MIC de AG, GO, PGAL-LTV, PGAL-HRP y PGO para *S. aureus*. Se presenta el error estándar de la media.

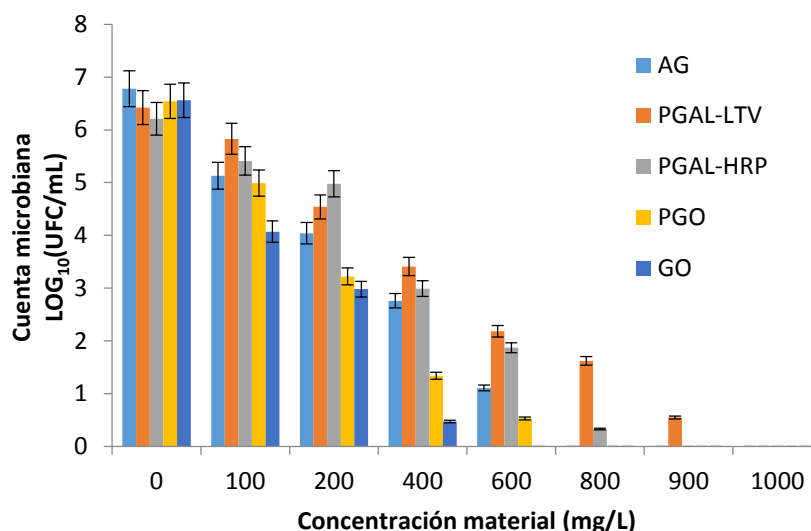


Figura 25. Determinación de MIC de AG, GO, PGAL-LTV, PGAL-HRP y PGO para *E. faecalis*. Se presenta el error estándar de la media.

De acuerdo a las figuras 24 y 25 la MIC determinada para las bacterias G (+) (*S. aureus* y *E. faecalis*) del polímero PGAL-LTV es de 900 mg/L, mientras que para PGAL-HRP es de 800 mg/L, es decir estos materiales presentan inhibición de dichas bacterias. Esta inhibición es menor a la presentada por el AG de 600 mg/L que coincide con la reportada por Borges *et al.* en el año 2013 para bacterias G (+), al ser polimerizado ésta disminuye. La inhibición de PGAL-HRP es mayor a la de PGAL-LTV, posiblemente es debido a la presencia del enlace fenil-oxi, lo que hace a dicho material menos soluble facilitando así la entrada del polímero a la membrana de acuerdo a su conformación.

El polímero PGO presenta la MIC en 600 mg/L para las bacterias G (+), ésta aumentó en comparación al GO que experimentalmente coincidió con lo reportado en el año 2010 para bacterias G (+) por Rúa *et al.* No se ha establecido un mecanismo de la forma en que el GO actúa sobre el microorganismo se piensa que el GO, al tener una estructura de cabeza – cola, actúa como un surfactante no iónico, es decir, el mecanismo de acción del GO involucra la interacción con la membrana, con pérdida de potencial de la misma y la fuga de materiales intercelulares lo que podría ser una de las causas de la inhibición del crecimiento microbiano (Mellegard, et al., 2011).

De acuerdo al análisis estadístico de medias de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95% para ambas bacterias G (+) (Apéndice E), entre los materiales AG, GO, PGAL-LTV y PGAL-HRP, existe diferencia significativa en PGAL-LTV para las bacterias *S. aureus* y *E. faecalis* siendo el que inhibió menos, esto se le puede atribuir al enlace fenil-fenil que se encuentra en su estructura haciéndolo más soluble en agua pero menos compatible con la membrana de las bacterias G(+).

En las figura 26 y 27 se muestra la cuenta bacteriana de *S. aureus* y *E. faecalis* respectivamente, determinada en agar MH para los controles AG y GO y los co-polímeros Pgal-co-GO solubles en agua.

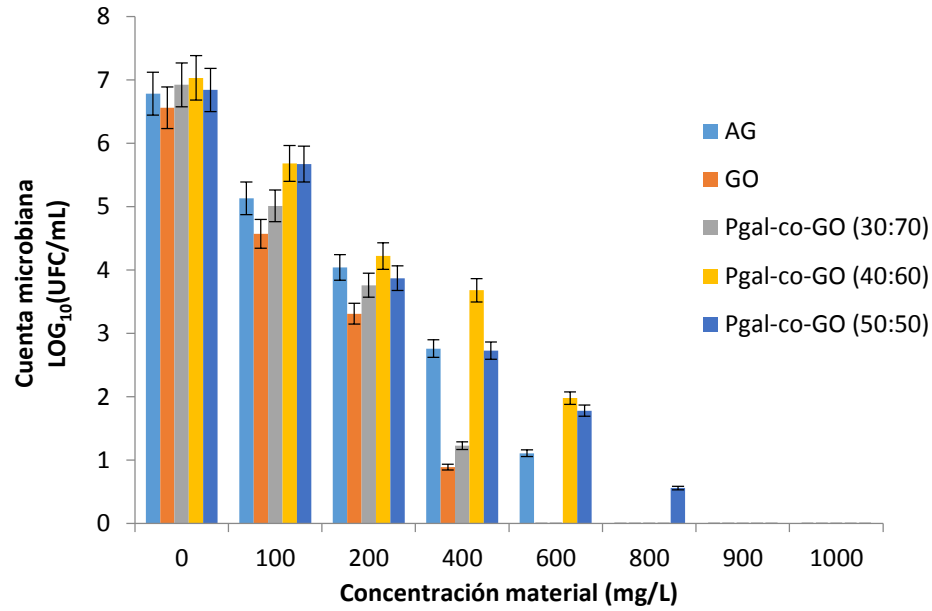


Figura 26. Determinación de MIC de AG, GO, Pgal-co-GO (30:70), Pgal-co-GO (40:60) y Pgal-co-GO (50:50) para *S. aureus*. Se presenta el error estándar de la media.

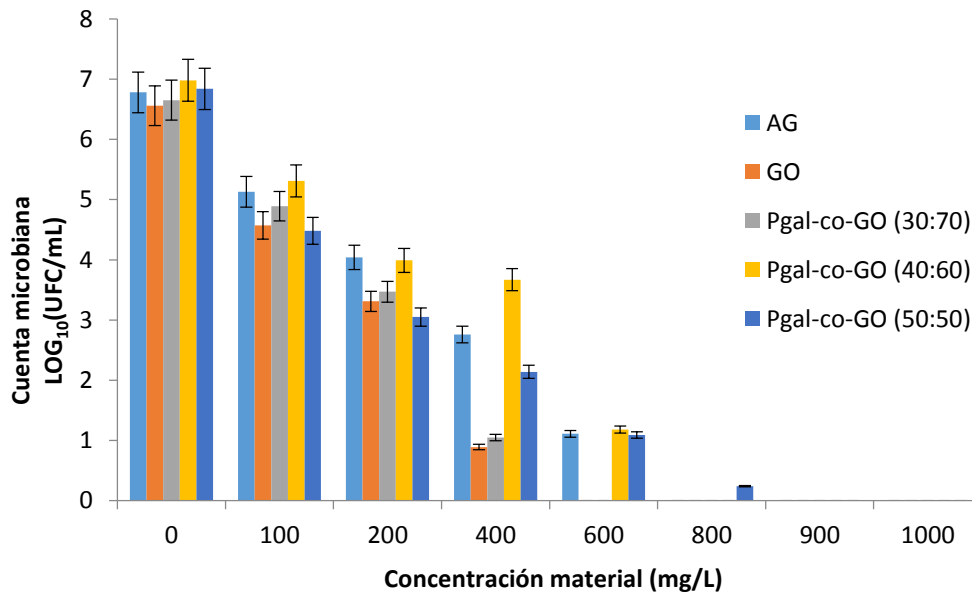


Figura 27. Determinación de MIC de AG, GO, Pgal-co-GO (30:70), Pgal-co-GO (40:60) y Pgal-co-GO (50:50) para *E. faecalis*. Se presenta el error estándar de la media.

Con respecto a las figuras 26 y 27, los co-polímeros Pgal-co-GO solubles en agua mostraron inhibición para las bacterias G (+). El polímero que presentó menos MIC tanto en *S. aureus*, como en *E. faecalis* fue el co-polímero Pgal-co-GO (30:70) con 400 mg/L, seguido del Pgal-co-GO (60:40) con 600 mg/L y del Pgal-co-GO (50:50) 800 mg/L. Es decir, la menor MIC se presentó en los co-polímeros que presentan mayor cantidad de GO y menos solubles en agua. Se puede atribuir a la cadena alquílica de éste, al volverse parcialmente hidrofóbico, podría unirse a la pared celular, provocando la muerte.

Lo anterior mencionado coincidió con el análisis estadístico de medias de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95%, mostró que para ambas bacterias G (+) (Apéndice E), entre los materiales AG, GO, Pgal-co-GO (30:70), Pgal-co-GO (40:60) y Pgal-co-GO (50:50), existe diferencia significativa en Pgal-co-GO (30:70) para las bacterias *S. aureus* y *E. faecalis* siendo el que inhibió más. Como se ha dicho anteriormente estos materiales pueden contener mayor cantidad de AG, y menor cantidad de GO. Pero ésta es suficiente para inhibir más que los polímeros PGAL-LTV y PGAL-HRP (Figura 24 y Figura 25).

En las figuras 28 y 29 se muestra la cuenta bacteriana de *S. aureus* y *E. faecalis* respectivamente, determinada en agar MH para los controles EtOH, AG, GO y los co-polímeros Pgal-co-GO solubles en etanol.

Con respecto a los co-polímeros Pgal-co-GO solubles en etanol, mostraron inhibición para ambas bacterias G (+). Como se puede observar en las figuras 28 y 29, se determinó la MIC de estos polímeros, teniendo mayor inhibición Pgal-co-GO (30:70) Et con 200 mg/L, seguido de los materiales Pgal-co-GO (40:60) Et y Pgal-co-GO (50:50) Et con 400 mg/L.

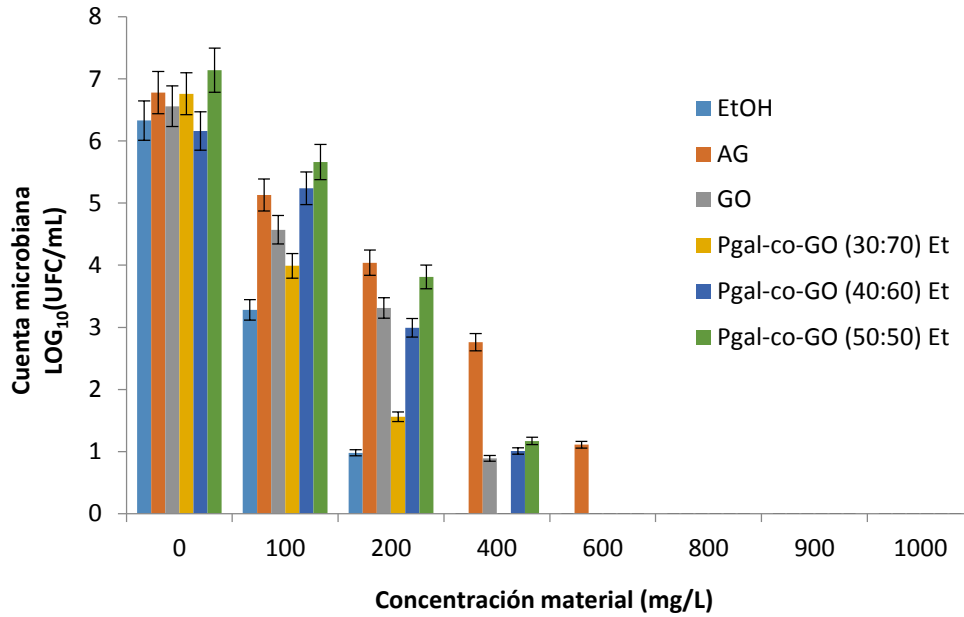


Figura 28. Determinación de MIC de EtOH, AG, GO, Pgal-co-GO (30:70) Et, Pgal-co-GO (40:60) Et y Pgal-co-GO (50:50) Et para *S. aureus*. Se presenta el error estándar de la media.

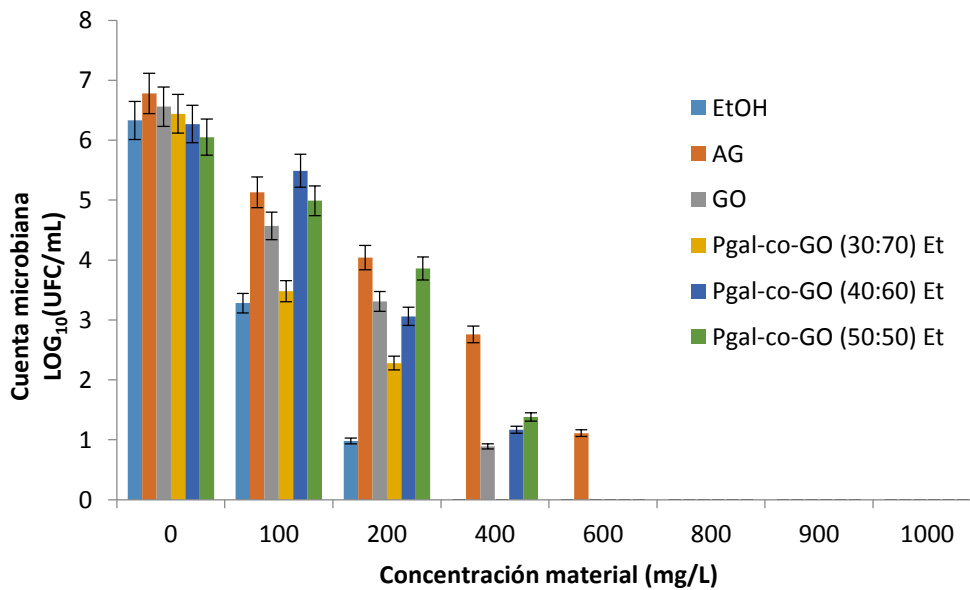


Figura 29. Determinación de MIC de EtOH, AG, GO, Pgal-co-GO (30:70) Et, Pgal-co-GO (40:60) Et y Pgal-co-GO (50:50) Et para *E. faecalis*. Se presenta el error estándar de la media.

La menor MIC se presentó en el co-polímero Pgal-co-GO (30:70) Et que presenta mayor cantidad de GO y más soluble en etanol. Mientras que no existió diferencia entre los otros dos polímeros restantes. Como se ha dicho anteriormente en estos polímeros pueden existir mayor presencia de GO, involucrando la interacción con la membrana, con pérdida de potencial de la misma y la fuga de materiales intercelulares lo que podría ser una de las causas de la muerte celular de *S. aureus* y *E. faecalis*.

Los materiales solubles en etanol presentaron mayor inhibición que PGO y los materiales Pgal-co-GO solubles en agua.

Lo anterior mencionado coincidió con el análisis estadístico de medias de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95%, mostró que para ambas bacterias G(+) (Apéndice E), entre los materiales AG, GO, Pgal-co-GO (30:70) Et, Pgal-co-GO (40:60) Et y Pgal-co-GO (50:50) Et, existe diferencia significativa en Pgal-co-GO (30:70) Et para las bacterias *S. aureus* y *E. faecalis* siendo el que inhibió más.

4.3.1.2 Determinación de MIC en bacterias G (-)

Las figura 30 y 31 muestra la cuenta bacteriana de *E. coli* y *P. aeruginosa* respectivamente, determinada en agar MH para los controles AG y GO y para los polímeros PGAL-LTV, PGAL-HRP y PGO.

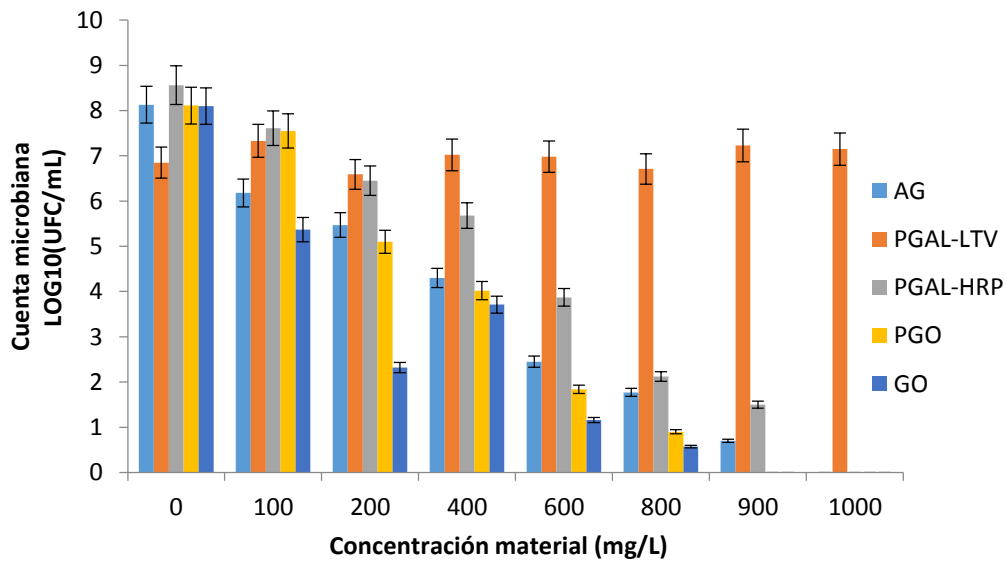


Figura 30. Determinación de MIC de AG, GO, PGAL-LTV, PGAL-HRP y PGO para *E. coli*. Se presenta el error estándar de la media.

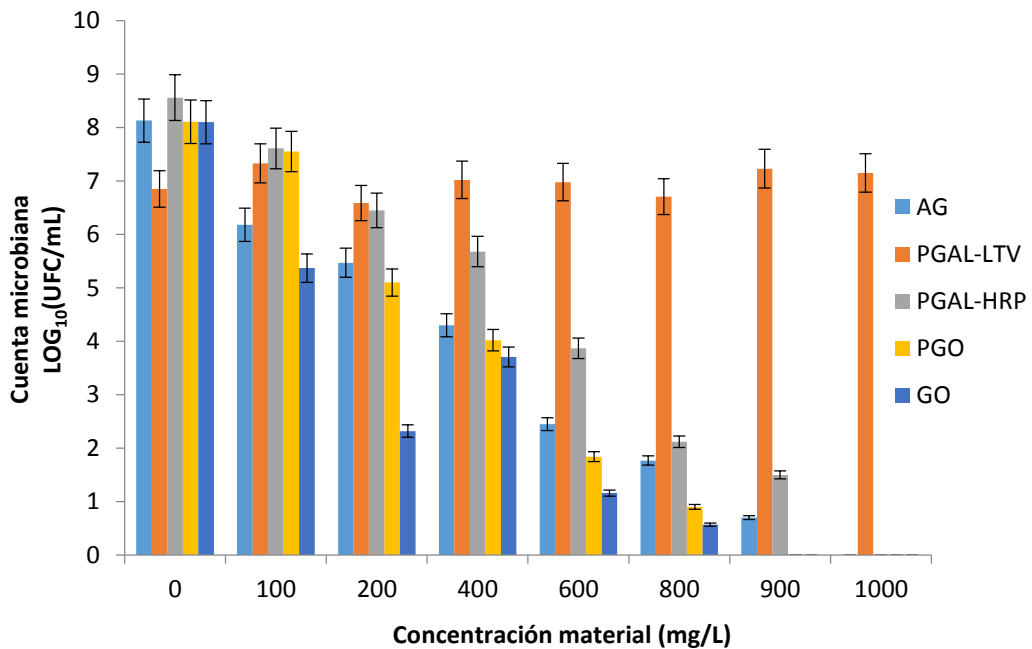


Figura 31. Determinación de MIC de AG, GO, PGAL-LTV, PGAL-HRP y PGO para *P. aeruginosa*. Se presenta el error estándar de la media.

La MIC determinada para las bacterias G (-) (*E. coli* y *P. aeruginosa*) para PGAL-HRP es de 900 mg/L, mientras que PGAL-LTV no presentó inhibición alguna.

Para PGAL-HRP la inhibición es menor a la presentada en las G (+) (800 mg/L) y al AG de 900 mg/L. Al igual que para las bacterias G (+) al ser polimerizado ésta disminuye. La inhibición de PGAL-HRP puede presentarse debido al enlace fenil-oxi, lo que hace a dicho material menos soluble en agua facilitando así la entrada del polímero a la membrana de acuerdo a su conformación. Mientras que el material PGAL-LTV siendo el más soluble en agua presenta solo enlaces fenil-fenil, lo que puede impedir la entrada a la pared de las bacterias G (-).

El polímero PGO presenta la MIC en 800 mg/L para las bacterias G (-), ésta resultó ser igual a GO que experimentalmente coincidió con lo reportado en el año 2010 para bacterias G (-) por Rúa *et al.* Pero la inhibición también disminuyó comparado con las bacterias G (+).

De acuerdo al análisis estadístico de medias de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95% para ambas bacterias G (-) (Apéndice E), entre los materiales AG, GO, PGAL-LTV y PGAL-HRP, existe diferencia significativa en PGAL-LTV para las bacterias *E. coli* y *P. aeruginosa* donde no hubo inhibición.

En las figura 32 y 33 se muestra la cuenta bacteriana de *E. coli* y *P. aeruginosa* respectivamente, determinada en agar MH para los controles AG y GO y los co-polímeros Pgal-co-GO solubles en agua.

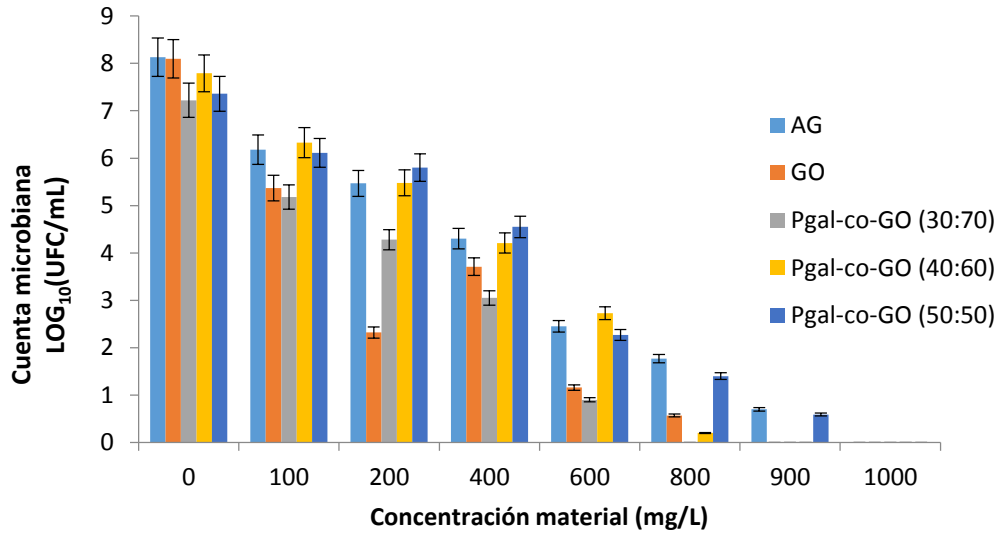


Figura 32. Determinación de MIC de AG, GO, Pgal-co-GO (30:70), Pgal-co-GO (40:60) y Pgal-co-GO (50:50) para *E. coli*. Se presenta el error estándar de la media.

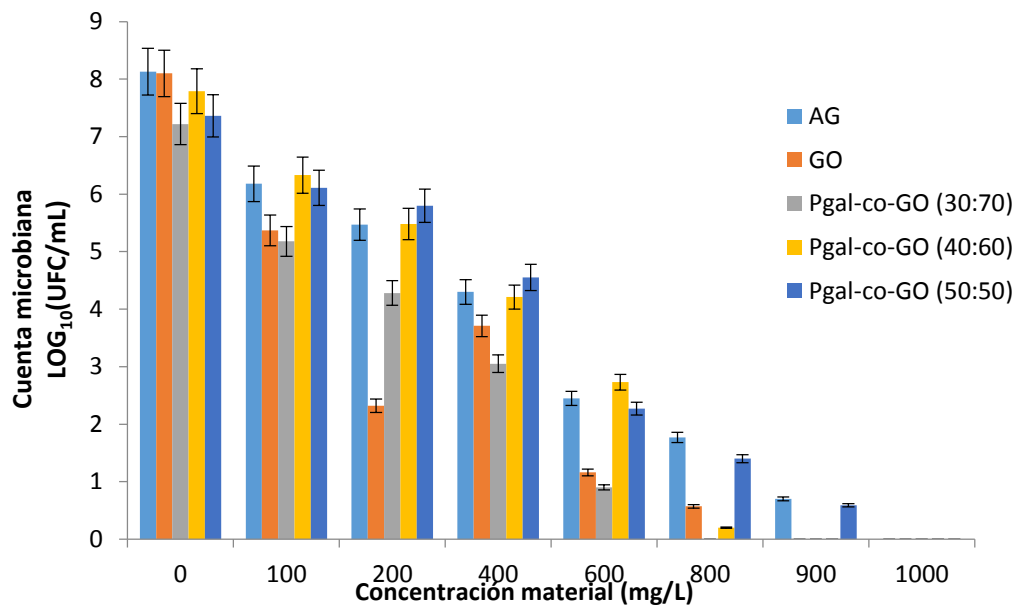


Figura 33. Determinación de MIC de AG, GO, Pgal-co-GO (30:70), Pgal-co-GO (40:60) y Pgal-co-GO (50:50) para *P. aeruginosa*. Se presenta el error estándar de la media.

Con respecto a las figuras 32 y 33, los co-polímeros Pgal-co-GO solubles en agua mostraron inhibición para las bacterias G (-). Al igual que para las bacterias G (+), el polímero que presentó menos MIC tanto en *E. coli*, como en *P. aeruginosa* fue el co-polímero Pgal-co-GO (30:70) con 600 mg/L, seguido del Pgal-co-GO (60:40) con 800 mg/L y del Pgal-co-GO (50:50) 900 mg/L. Es decir, la menor MIC se presentó en los co-polímeros que presentan mayor cantidad de GO y menos solubles en agua. La cadena alquílica que el GO presenta los volverá parcialmente hidrofóbicos y así podrán anclarse a los lipopolisacáridos de la pared celular presentes en las bacterias G (-), provocando la muerte y presentando inhibición, comparado a solo la polimerización de AG con LTV dando lugar al polímero PGAL-LTV.

Lo anterior mencionado coincidió con el análisis estadístico de medias de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95%, mostró que para ambas bacterias G(-) (Apéndice E), entre los materiales AG, GO, Pgal-co-GO (30:70), Pgal-co-GO (40:60) y Pgal-co-GO (50:50), existe diferencia significativa en Pgal-co-GO (30:70) y GO para las bacterias *E. coli* y *P. aeruginosa* siendo el los materiales con menor MIC.

Estos materiales, presentaron menor inhibición y mayor MIC en las bacterias G (-) que en las bacterias G (+). Como se ha mencionado anteriormente debido a la naturaleza de sus paredes y membranas celulares.

En las figuras 34 y 35 se muestra la cuenta bacteriana de *E. coli* y *P. aeruginosa* respectivamente, determinada en agar MH para los controles EtOH, AG, GO y los co-polímeros Pgal-co-GO solubles en etanol.

Con respecto a los co-polímeros Pgal-co-GO solubles en etanol, mostraron inhibición para ambas bacterias G (-).

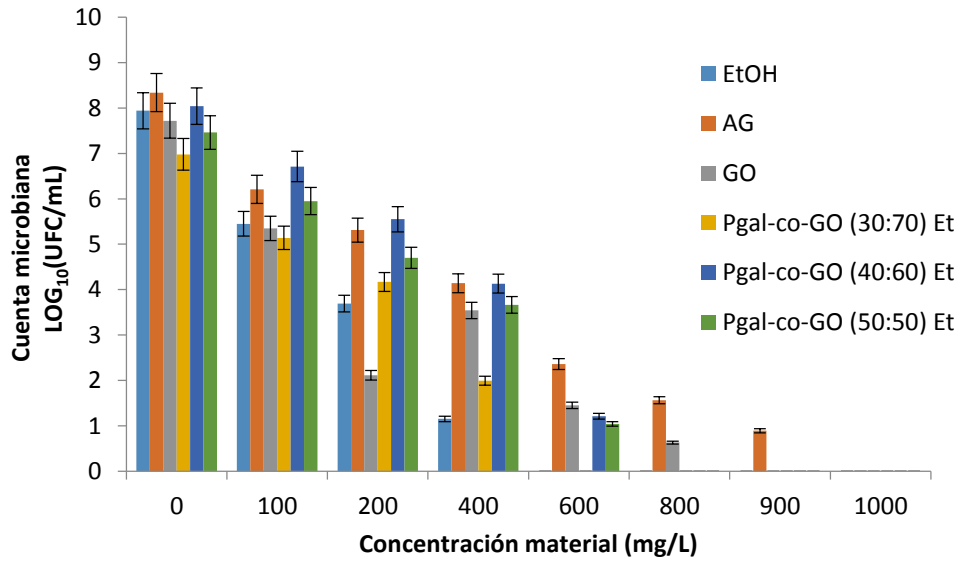


Figura 34. Determinación de MIC de EtOH, AG, GO, Pgal-co-GO (30:70) Et, Pgal-co-GO (40:60) Et y Pgal-co-GO (50:50) Et para *E. coli*. Se presenta el error estándar de la media.

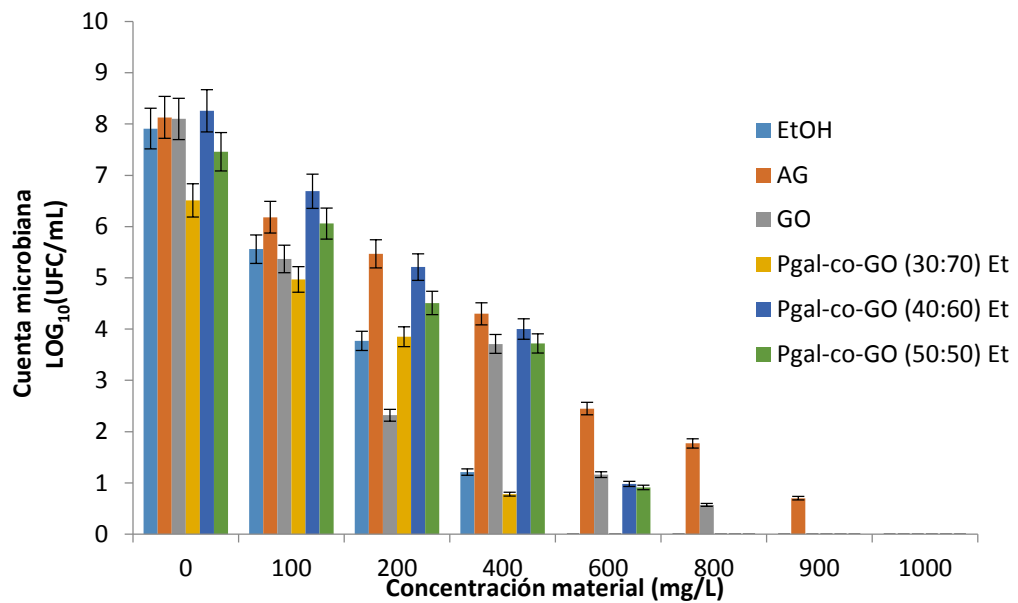


Figura 35. Determinación de MIC de EtOH, AG, GO, Pgal-co-GO (30:70) Et, Pgal-co-GO (40:60) Et y Pgal-co-GO (50:50) Et para *P. aeruginosa*. Se presenta el error estándar de la media.

Como se puede observar en las figuras 34 y 35, se determinó la MIC de estos polímeros, teniendo mayor inhibición Pgal-co-GO (30:70) Et con 400 mg/L, seguido de los materiales Pgal-co-GO (40:60) Et y Pgal-co-GO (50:50) Et con 600 mg/L.

Al igual que en las bacterias G (-), la menor MIC se presentó en el copolímero Pgal-co-GO (30:70) Et que presenta mayor cantidad de GO y más soluble en etanol. Mientras que no existió diferencia entre los otros dos polímeros restantes podría ser porque ya no se lleva a cabo mayor polimerización.

Los materiales solubles en etanol presentaron menor inhibición y mayor MIC en las bacterias G (-) que en las bacterias G (+), pero mayor inhibición que PGO, PGAL-HRP y los materiales Pgal-co-GO solubles en agua entre G (-).

Lo anterior mencionado coincidió con el análisis estadístico de medias de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95%, mostró que para ambas bacterias G (-) (Apéndice E), entre los materiales AG, GO, Pgal-co-GO (30:70) Et, Pgal-co-GO (40:60) Et y Pgal-co-GO (50:50) Et, existe diferencia significativa en Pgal-co-GO (30:70) Et para las bacterias *E. coli* y *P. aeruginosa* siendo el que inhibió más.

4.3.2 Determinación IC₅₀

La IC₅₀ se define como la concentración a la cual se tiene la inhibición del 50% de los microorganismos presentes, se obtuvo mediante la pendiente y ordenada al origen de graficar el % de inhibición microbiana contra la concentración presente de los materiales. A continuación se muestran los resultados para los materiales de interés (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de la IC₅₀ para los materiales obtenidos

Material	IC ₅₀ (mg/L)			
	G (+)		G(-)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
AG	322.74	334.61	443.97	443.44
GO	270.44	268.56	435.39	406.77
EtOH	140.92	132.58	234.89	239.58
PGAL-LTV	447.55	447.61	----	
PGAL-HRP	458.09	414.72	468.77	432.61
PGO	241.43	255.15	419.97	413.93
Pgal-co-GO (30:70)	256.59	260.45	297.04	304.68
Pgal-co-GO (40:60)	313.82	358.39	425.54	424.09
Pgal-co-GO (50:50)	410.52	458.58	472.09	442.68
Pgal-co-GO (30:70) Et	163.82	156.65	257.04	274.76
Pgal-co-GO (40:60) Et	259.99	265.80	374.93	355.78
Pgal-co-GO (50:50) Et	258.77	283.87	357.67	354.93

De acuerdo a la tabla 4, la menor IC₅₀ para los materiales sintetizados de las bacterias G (+) se presenta en el material Pgal-co-GO (30:70) Et, con una IC₅₀ para *S. aureus* de 163.82 mg/L y 156.65 mg/L para *E. faecalis*. Coincide con lo analizado anteriormente para la MIC. Es decir, al contener mayor cantidad de GO la pérdida de potencial en la membrana y la fuga de materiales intercelulares provocarán la muerte celular.

A pesar, de que el co-polímero que inhibió más fue el Pgal-co-GO (30:70) Et, el co-polímero soluble en agua Pgal-co-GO (30:70) mostró la menor inhibición, con 256.59 mg/L para *S. aureus* y 260.45 mg/L para *E. faecalis* con respecto a los demás co-polímeros solubles en agua y a los controles AG, GO, PGAL-LTV y PGAL-HRP. Es decir, puede existir mayor

co-polimerización de AG, uniéndose posiblemente al peptidoglicano de la pared formando precipitados, produciendo interrupción en la biosíntesis de ésta y provocando la muerte celular (Shimamura, *et al.* 2007), inhibiendo menos que los co-polímeros que contienen más GO.

Para el caso de las bacterias G (-) no fue diferente, es decir también se presentó mayor inhibición en el co-polímero Pgal-co-GO (30:70) Et con una IC₅₀ para *E. coli* de 257.04 mg/L y 274.76 mg/L para *P. aeruginosa*, comparadas con las IC₅₀ de las G (+) estas son mayores, debido al tipo de pared contenida de lipopolisacáridos, es más compleja por la cual es más difícil de anclar y penetrar.

Comparando los materiales solubles en agua también la menor IC₅₀ se obtuvo en el material Pgal-co-GO (30:70) con 297.04 mg/L para *E. coli* y 304.68 mg/L para *P. aeruginosa* con respecto a los demás co-polímeros solubles en agua y a los controles AG, GO, PGAL-LTV, PGAL-HRP y PGO.

5. CONCLUSIONES

- Se llevó a cabo la reacción de síntesis enzimática de los polímeros con rendimientos menores a 28% para los materiales solubles en agua y mayores a 66% para los no solubles.
- Los pesos moleculares obtenidos por HPLC/SEC son mayores en los polímeros solubles en agua.
- Los espectros de FT-IR y ^1H RMN presentan las señales características de los grupos presentes en las moléculas de interés.
- Se determinó la actividad antimicrobiana de los polímeros sintetizados con las bacterias G (+) (*S. aureus* y *E. faecalis*) y G (-) (*E. coli* y *P. aeruginosa*), obteniendo inhibición en ambos grupos.
- La mayor inhibición microbiana se presenta en el polímero con mayor cantidad de galato de octilo y soluble en etanol (Pgal-co-GO (30:70) Et).

6. TRABAJO A FUTURO

- Definir las condiciones de reacción adecuadas para mejorar el rendimiento de cada una de las síntesis.
- Determinar el mecanismo de reacción y mecanismo de inhibición microbiana de los polímeros sintetizados.
- Realizar análisis calorimétricos como TGA y espectroscópicos como rayos X, y RMN de carbono para caracterización de los polímeros sintetizados.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Andrews, J. M., 2001, Determination of minimum inhibitory concentrations, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, Vol. 48 (S1), 5-16.
2. Arnous, A. y Meyer, A., 2010, Discriminated release of phenolic substances from red wine grape skins (*Vitis vinifera L.*) by multicomponent enzymes treatment., *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 49 (1), 68-77.
3. Bekturov, E.A. y Bakauova, Z. Kh., 1986, *Synthetic Water-Soluble Polymers in Solution*, Germany, Hüthing and Wepf, 204.
4. Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J. y Simões, M., 2013, Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria, *Microb Drug Resist*, Vol. 19 (4), 256-265.
5. Cappuccino, J.G. y Sherman, N., 1992, *Microbiology. A Laboratory Manual*, California, The Benjamin/Cummings Publishing. Co. Inc., 3ª Edición, 47.
6. Cartaya, O. y Reynaldo, I., 2001, Flavonoides: Características químicas y aplicaciones, *Cultivos tropicales*, Vol. 22 (2), 5-14.
7. Dinges, M., Orwin, P. y Schlievert P., 2000, Exotoxins of *Staphylococcus aureus*, *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 13, 16-34.
8. Eker, B., Zagorevski, D., Zhu, G., Linhardt, R. J. y Dordick, J. S. J, 2009, *Mol. Catal. B Enzym*, Vol.59, 177–184.
9. Espino, A., 2016, Evaluación de la capacidad antioxidante por EPR del Poli(ácido gálico) sintetizado enzimáticamente, Tesis de licenciatura, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM.

10. Fujita, K. y Kubo I., 2002, Antifungal activity of octyl gallate, *Journal of Food Microbiology*, Vol. 79, 193-201.
11. Gallegos Cruz, E. G., 1999, Recopilación bibliográfica de antibióticos Beta-lactámicos empleados como tratamiento de última elección en cepas multirresistentes de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aureoginosa*, Tesis de Licenciatura, FES-Cuautitlán, Edo. de Mex.
12. Gómez, R., Martínez, C. G., Rodríguez, R. y Aguilar, C., 2012, Fuentes y beneficios de los antioxidantes fenólicos, *Ciencia Cierta Universidad Autónoma de Coahuila*, Vol. 31, 56-60.
13. Gutierrez, P., 2011, Estudio de la polimerización de fenoles utilizando peroxidasa presentes en rábano común (*Raphanus sativus var sativus*), con aplicación en la biorremediación de aguas residuales de una empresa textilera, Tesis de Licenciatura, Departamento de Ciencias de la vida, Escuela politécnica del ejército
14. Heras, B., Shouldice, S. R., Totsika, M., Scanlon, M. J., Schembri, M. A. y Marti, J. L., 2009, DSB proteins and bacterial pathogenicity, *Nat. Rev. Microbiology*, Vol. 7, 215-225.
15. Hughes, C. C., 1989, *The additives Guide*, 1ª Edición, Gran Bretaña, Editorial John Wiley & Sons.
16. Iglesias, J., 2009, Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca, Tesis de Doctorado, Departamento de Química analítica, nutrición y Bromatología, Universidad de Santiago de Compostella (USC).

17. Kamath, S., Kapatral, V. y Chakrabarty, A. M., 1998, Cellular function of elastase in *Pseudomonas aeruginosa*: role in the cleavage of nucleoside diphosphate kinase and in alginate synthesis, *Molecular Microbiology*, Vol. 30 (5), 933-941.
18. Kim, Y., 2007, Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 30, 1052–1055.
19. Kobayashi, S., y Higashimura, H., 2003, Oxidative polymerization of phenols revisited, *Progress in Polymer Science*, Vol. 28, 1015-1048.
20. López, J., 2014, Síntesis enzimática de materiales polifenólicos semiconductores, Tesis de Doctorado, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM.
21. Luna Méndez, O., 2003, Prevalencia de los principales grupos diarreogénicos de *Escherichia Coli* en niños menores de cinco años hospitalizados por diarrea aguda grave en la ciudad de México, Tesis de licenciatura, FES-Cuautitlán, Edo. de Mex.
22. Mahmoudi, A., Nazari, K., Khoshraneh, M., Mohajerani, B., Kelay, V. y Moosavi- Movahedi, A.A., 2008, Can aminoacids protect horseradish peroxidase against its suicide-peroxidase substrate?, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 43, 329-335.
23. Mellegard, H., Strand, S.P., Christensen, B. E., Granum, P. E. y Hardy. S. P., 2011, Antibacterial activity of chemically defined chitosans: influence of molecular weight, degree of acetylation and test organism, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 148, 48 –54.

24. Moya, R., 2011, Caracterización de la lacasa de *Streptomyces cyaneus* cect 3335 y aproximación al estudio de su potencial oxidativo y función biológica, Tesis de Doctorado, Departamento de microbiología y parasitología, Universidad de Alcalá.
25. Nadya, N., Karin, Sh., Franssenb, M., Mohy, M., Zuilhof, H. y Booma, R., 2011, Laccase-catalyzed modification of PES membranes with 4-hydroxybenzoic acid and gallic acid, *Journal of Membrane Science*, Vol. 25, 394-395.
26. Olaechea, P. M., Insausti, J., Blanco, A. y Luque P., 2010, Epidemiología e impacto de las infecciones nosocomiales, *Med. Intensiva*, Vol. 34, 256-267.
27. Pardi, G., Guilarte, C., Cardozo, E. I. y Briceño, E. N., 2009, Detección de *Enterococcus faecalis* en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico, *Acta Odontológica Venezolana*, Vol. 47 (1), 456-468.
28. Peña, N. C., 2006, Investigación hemero – bibliográfica de aspectos más recientes de la producción de diarrea por los diferentes patotipos de *Escherichia coli* en México, haciendo énfasis en ETEC y EHEC, Tesis de licenciatura, FES-Cuautitlán, Edo. de Mex.
29. Prescott, L. M., Harley J.P. y Klein G.A., 1999, *Microbiología*, México, Mc Graw-Hill Interamericana, 4ª Edición, 247.
30. Prutit, B. A., Mc., Manus A. T., Kim, S. H. y Goodwing, C. W, 1998, Burn Wound Infections: Current Status, *World J. Surg*, Vol. 22, 135-145.

31. Puskas, J. E., Sen, M. Y. y Su Seo, K., 2009, Green Polymer Chemistry Using Nature's Catalysts, Enzymes. *Journal of polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, Vol. 47, 2959-2976.
32. Quiñones, M., Miguel, M., y Aleixandre, A., 2012, Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular, *Nutrición Hospitalaria*, Vol. 27 (1), 76-89.
33. Román, R., Torres-Duarte, C., Ayala, M. Y Vázquez-Duhalt, R., 2010, Producción a escala piloto de lacasa de *Corioloropsis gallica*, *Revista Mexicana de Micología*, Vol. 32, 19-27.
34. Romero, A., Síntesis y caracterización de películas de poli (ácido gálico) entrecruzado con carboximetilcelulosa con potenciales aplicaciones biomédicas, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM.
35. Rúa, J., Fernández-Álvarez, L., de Castro, C., Del Valle, P., de Arriaga, D. y García-Armesto, M. R., 2010, Antibacterial activity against foodborne *Staphylococcus aureus* and antioxidant capacity of various pure phenolic compounds, *Foodborne Pathogens and Disease*, Vol. 8 (1), 149-157.
36. Rumbaugh, K. P., Hamood, A. N. y Griswold, J .A., 1999, Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates for possible variations within the virulence genes exotoxin A and Exoenzyme S, *Journal of Surgical Research*, Vol. 82, 95- 105.
37. Saha, A., Roy, B., Garai, A. y Nandi, K., 2009, Two-Component hermoresversible Hydrogels of Melamine and Gallic Acid, *Indian Association for the Cultivation of Science*, Vol. 25 (15), 8457-8461.

38. Schaechter, M., Medoff, G., Eisenstein, B. I. y Guerra H, 1993, Microbiología. Mecanismos de las enfermedades infecciosas, Buenos Aires, Panamericana, 2ª Edición, 121.
39. Sharma, S., Wyatt, G., y Steele, V., 1997, A carcinogen DNA binding assay as a biomarker screen for identifying potential chemo-preventive agents, *Methods in Cell Science*, Vol. 19, 4548.
40. Shimamura, T., Zhao, W.-H. y Qing, Z, 2007, Mechanism of action and potential for use of tea catechin as an antiinfective agent., *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, Vol. 6, 57-62.
41. Trilla, A. y Barrio, J. L., 1996, Infecciones nosocomiales. En Farreras y Rozman. *Medicina Interna*, España, Ediciones Mosby- Doyma Libros S.A. [Ed. en CD-ROM], 13ª Edición, 2553-2558.
42. Van der Heijden, C. A., Janssen, P. J. C. M. y Strik, J. J. T. W. A., 1986, Toxicology of gallates: a review and evaluation. *Food and chemical toxicology*, Vol. 24 (10), 1067-1070.
43. Wade, L. G., 2004, *Química Orgánica*, España, Editorial Pearson PrenticeHall, 5ª Edición, 331.
44. Washington, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E. y Proco, G., 2005, *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, Lippincott Williams & Wilkins, 6ª Edition, 256.
45. Wiegand, I., Hilpert, K. y Hancock, R. E. W., 2008, Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, *Nature Protocols*, Vol. 3 (2), 163-175.

46. Xu, P., Singh, y A., Kaplan, D., 2006, Enzymatic catalysis in the synthesis of polyanilines and derivatives of polyanilines, *Advances in Polymer Science*, Vol. 8, 194, 69-94.
47. Zaragoza-Gasca, P.; Villamizar-Gálvez, O. J.; García-Arrazola, R.; Gimeno, M. y Bárzana, E., 2010, Use of ionic liquid for the enzyme-catalyzed polymerization of phenolsy, *Polym. Adv. Tech.*, Vol 21, 454–456.

8. APÉNDICES

- **Apéndice A. Preparación de buffers**

A.1 Buffer de acetatos 1.25 M a pH 5, 250 mL

Mezclar 5.52 mL de ácido acético y 12.56 g de acetato de sodio, disolver y llevar al aforo la solución con agua desionizada. Posteriormente ajustar pH a 5. Para poder utilizar el buffer se toman 50 mL y se lleva a un volumen final de 250 mL con agua desionizada para obtener una concentración de 250 mM.

A.2 Buffer de fosfatos 100 mM a pH 5, 100 mL

Pesar 1.38 g de fosfato monobásico de potasio y 13.91 g de fosfato dibásico de potasio, llevar al aforo de 100 mL (ajustar pH con KOH 1M).

- **Apéndice B. Preparación de medio y suspensión en SSI**

Tabla B.1. Preparación de medio de cultivo MH

Reactivo	g/L
Infusión de carne	2.0
Peptona ácida de caseína	17.5
Almidón	1.5
Agar	17.0
pH	7.3

Tabla B.2. Preparación de suspensión en SSI

Concentración (mg/L)	Solución madre (µL)	SSI (µL)	Inóculo (µL)
0	0	250	250
100	25	225	250
200	50	200	250
400	100	150	250
600	150	100	250
800	200	50	250
900	225	25	250
1000	250	0	250

▪ Apéndice C. Determinación de la U específica

Tabla C.1. Datos de la U específica de LTV y HRP

Parámetro	Blanco	LTV	Blanco	HRP
Δ Abs /min test (promedio)	0.037	0.202	0.034	0.437
Volumen total de ensayo (mL) [VT]	3.05	-----	3.01	-----
Factor de dilución (FD)	10		100	
Vol. de enzima (mL)	0.05		0.01	

▪ Apéndice D. Inhibición microbiana en cuenta en placa

Tabla D.1. Determinación de MIC para AG

Concentración	<i>S. aureus</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. faecalis</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. coli</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>P. aeruginosa</i> (Log ₁₀ UFC/mL)	
	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE
0	6.78	0.075	6.57	1.056	8.34	0.078	8.13	0.456
100	5.13	1.096	5.01	0.075	6.21	1.222	6.18	1.489
200	4.04	0.086	4.22	1.903	5.31	0.856	5.47	0.899
400	2.76	1.033	1.99	0.875	4.14	1.932	4.3	2.001
600	1.11	0.034	0.87	1.211	2.36	0.789	2.45	0.785
800	0.00	0.00	0.00	0.00	1.56	0.998	1.77	1.006
900	0.00	0.00	0.00	0.00	0.89	0.567	0.70	0.999
1000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla D.2. Determinación de MIC para GO

Concentración	<i>S. aureus</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. faecalis</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. coli</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>P. aeruginosa</i> (Log ₁₀ UFC/mL)	
	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE
0	6.56	1.223	6.39	1.345	7.72	0.085	8.10	0.346
100	4.57	0.998	4.21	1.076	5.35	0.234	5.37	1.002
200	3.31	0.067	2.98	0.965	2.11	0.963	2.32	0.765
400	0.89	0.007	0.64	0.078	3.54	0.346	3.71	0.237
600	0.00	0.00	0.00	0.00	1.45	0.003	1.16	0.067
800	0.00	0.00	0.00	0.00	0.63	0.022	0.57	0.005
900	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla D.3. Determinación de MIC para EtOH

Concentración	<i>S. aureus</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. faecalis</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. coli</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>P. aeruginosa</i> (Log ₁₀ UFC/mL)	
	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE
0	6.33	0.078	6.67	0.987	7.94	1.001	7.91	0.344
100	3.28	0.211	3.10	0.006	5.45	0.067	5.56	0.009
200	0.98	0.107	0.90	0.021	3.69	0.089	3.77	0.106
400	0.00	0.00	0.00	0.00	1.15	1.256	1.21	0.723
600	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
800	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
900	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla D.4. Determinación de MIC para PGAL-LTV

Concentración	<i>S. aureus</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. faecalis</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. coli</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>P. aeruginosa</i> (Log ₁₀ UFC/mL)	
	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE
0	6.57	0.987	6.42	0.009	7.21	0.346	6.85	1.437
100	5.79	0.064	5.83	0.410	7.37	1.003	7.33	0.075
200	4.66	0.321	4.54	0.593	7.59	1.028	6.59	1.098
400	3.56	0.011	3.41	0.321	6.98	0.985	7.02	0.963
600	2.23	0.645	2.18	0.544	7.01	0.753	6.98	0.346
800	1.49	0.781	1.62	0.030	6.77	0.387	6.71	0.175
900	0.87	0.634	0.55	0.111	7.23	0.754	7.23	0.180
1000	0.00	0.00	0.00	0.00	7.45	0.211	7.15	0.002

Tabla D.5. Determinación de MIC para PGAL-HRP

Concentración	<i>S. aureus</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. faecalis</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. coli</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>P. aeruginosa</i> (Log ₁₀ UFC/mL)	
	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE
0	6.89	1.056	6.21	1.230	8.21	0.329	8.56	1.436
100	5.33	0.987	5.41	0.982	7.43	0.098	7.61	0.936
200	4.41	0.345	4.98	0.450	6.00	0.177	6.45	0.034
400	3.52	0.213	2.99	0.077	5.66	0.456	5.68	0.087
600	2.00	0.004	1.87	0.501	3.76	0.085	3.87	0.786
800	0.57	0.097	0.33	0.821	2.35	0.560	2.12	0.345
900	0.00	0.00	0.00	0.00	1.62	0.007	1.50	0.641
1000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla D.6. Determinación de MIC para PGO

Concentración	<i>S. aureus</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. faecalis</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. coli</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>P. aeruginosa</i> (Log ₁₀ UFC/mL)	
	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE
0	6.44	0.333	6.54	0.678	8.03	1.987	8.11	1.286
100	5.03	0.897	4.99	0.347	7.34	0.223	7.55	0.322
200	3.56	1.020	3.22	1.001	5.27	0.256	5.10	0.011
400	1.17	1.035	1.34	0.098	3.95	0.006	4.02	0.003
600	0.75	0.841	0.53	0.009	1.73	0.128	1.84	0.991
800	0.00	0.00	0.00	0.00	0.92	0.321	0.90	1.323
900	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla D.7. Determinación de MIC para Pgal-co-GO (30:70)

Concentración	<i>S. aureus</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. faecalis</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. coli</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>P. aeruginosa</i> (Log ₁₀ UFC/mL)	
	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE
0	6.92	0.354	6.65	0.456	7.21	0.346	7.22	0.317
100	5.01	0.836	4.89	0.110	5.26	1.876	5.18	0.434
200	3.76	1.034	3.47	0.213	4.11	0.987	4.28	0.745
400	1.23	1.009	1.05	0.009	2.97	0.412	3.05	1.033
600	0.00	0.00	0.00	0.00	1.42	0.021	0.90	0.032
800	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
900	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla D.8. Determinación de MIC para Pgal-co-GO (40:60)

Concentración	<i>S. aureus</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. faecalis</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. coli</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>P. aeruginosa</i> (Log ₁₀ UFC/mL)	
	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE
0	7.03	0.326	6.98	0.735	7.98	0.328	7.79	0.999
100	5.68	0.923	5.31	0.937	6.20	0.777	6.33	1.023
200	4.22	0.346	3.99	0.341	5.36	0.216	5.48	0.728
400	3.68	1.398	3.67	1.345	4.65	1.086	4.21	0.346
600	1.98	0.005	1.18	0.933	2.36	1.323	2.73	0.998
800	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.562	0.20	0.022
900	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla D.9. Determinación de MIC para Pgal-co-GO (50:50)

Concentración	<i>S. aureus</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. faecalis</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. coli</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>P. aeruginosa</i> (Log ₁₀ UFC/mL)	
	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE
0	6.84	0.237	6.84	0.324	7.67	1.321	7.36	1.002
100	5.67	1.354	4.48	1.234	6.23	0.991	6.11	1.253
200	3.87	0.343	3.05	0.564	5.61	0.329	5.80	0.936
400	2.73	1.089	2.14	0.013	4.11	0.771	4.55	0.836
600	1.78	0.998	1.09	0.009	2.32	0.800	2,27	0.033
800	0.56	0.457	0.24	0.012	1.43	0.372	1.40	1.001
900	0.00	0.00	0.00	0.00	0.70	0.832	0.59	0.394
1000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla D.10. Determinación de MIC para Pgal-co-GO (30:70) Et

Concentración	<i>S. aureus</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. faecalis</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. coli</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>P. aeruginosa</i> (Log ₁₀ UFC/mL)	
	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE
0	6.76	1.325	6.44	0.348	6.98	0.988	6.51	0.210
100	3.99	0.900	3.48	0.992	5.14	1.000	4.97	0.384
200	1.56	0.111	2.28	0.012	4.17	0.321	3.85	1.001
400	0.00	0.00	0.00	0.00	1.99	0.631	0.78	0.563
600	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
800	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
900	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla D.11. Determinación de MIC para Pgal-co-GO (40:60) Et

Concentración	<i>S. aureus</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. faecalis</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. coli</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>P. aeruginosa</i> (Log ₁₀ UFC/mL)	
	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE
0	6.16	0.991	6.27	0.922	8.04	0.921	8.26	1.229
100	5.24	0.237	5.49	1.028	6.71	0.782	6.69	0.999
200	2.99	1.062	3.06	1.001	5.55	0.034	5.21	0.632
400	1.01	0.010	1.17	0.378	4.13	0.011	4.00	0.239
600	0.00	0.00	0.00	0.00	1.21	0.009	0.98	0.009
800	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
900	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla D.12. Determinación de MIC para Pgal-co-GO (50:50) Et

Concentración	<i>S. aureus</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. faecalis</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>E. coli</i> (Log ₁₀ UFC/mL)		<i>P. aeruginosa</i> (Log ₁₀ UFC/mL)	
	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE
0	7.14	0.672	6.05	1.098	7.46	0.991	7.46	0.500
100	5.66	1.211	4.99	0.877	5.95	0.836	6.06	1.008
200	3.81	1.044	3.86	0.555	4.70	1.003	4.51	0.888
400	1.17	0.021	1.38	0.789	3.66	1.347	3.72	0.033
600	0.00	0.00	0.00	0.00	1.04	0.990	0.91	0.007
800	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
900	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

- **Apéndice E. Análisis estadístico de medias de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95%**

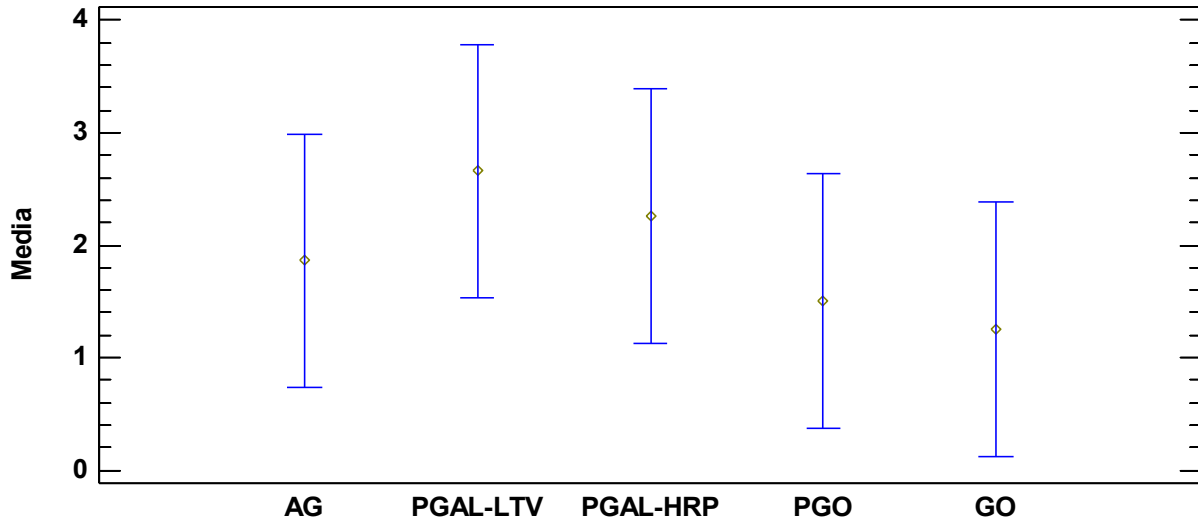


Figura 1.E. Análisis de medias de Fisher LSD para AG, GO, PGAL-LTV, PGAL-HRP y PGO de *S. aureus*.

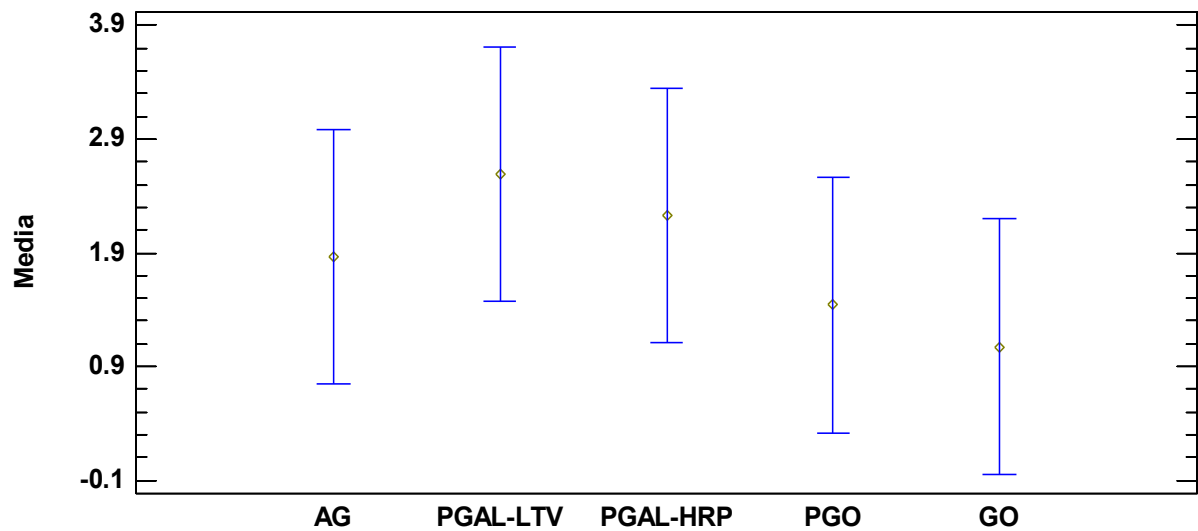


Figura 2.E. Análisis de medias de Fisher LSD para AG, GO, PGAL-LTV, PGAL-HRP y PGO de *E. faecalis*.

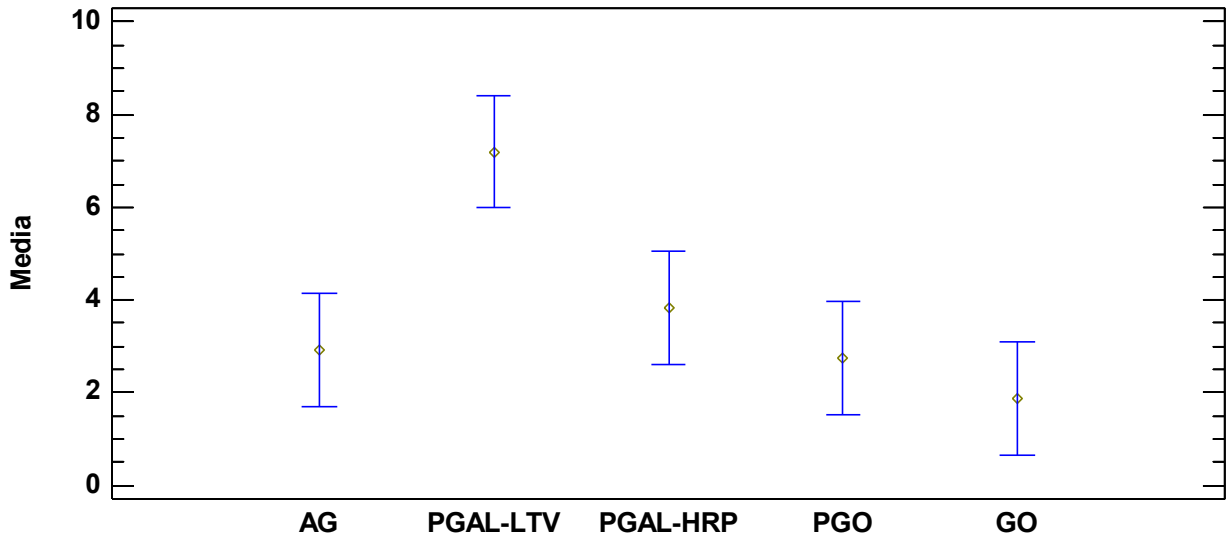


Figura 3.E. Análisis de medias de Fisher LSD para AG, GO, PGAL-LTV, PGAL-HRP y PGO de *E. coli*.

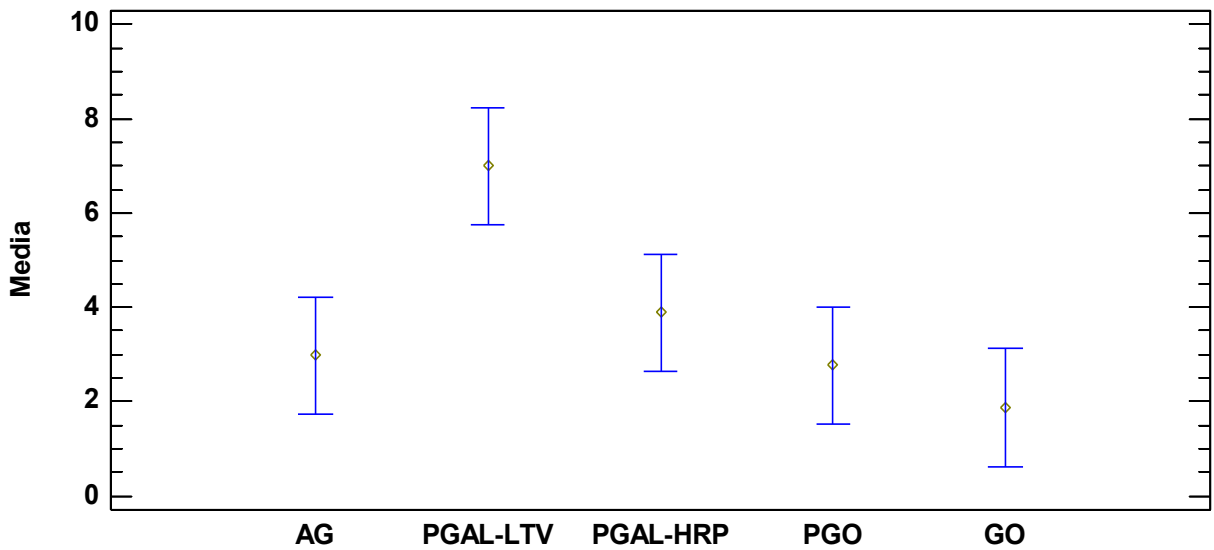


Figura 4.E. Análisis de medias de Fisher LSD para AG, GO, PGAL-LTV, PGAL-HRP y PGO de *P. aeruginosa*.

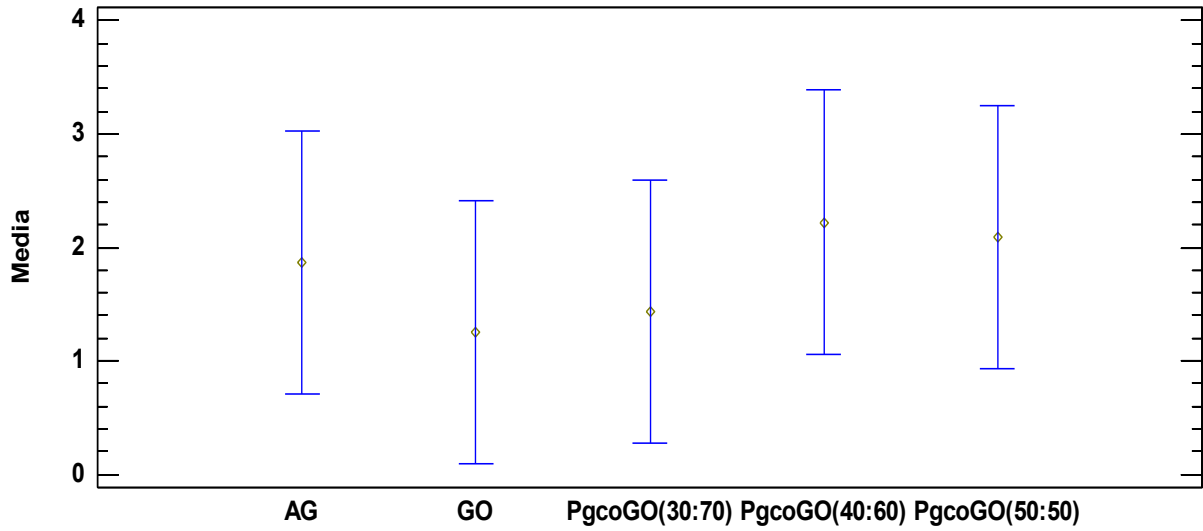


Figura 5.E. Análisis de medias de Fisher LSD para AG, GO, Pgal-co-GO (30:70), Pgal-co-GO (40:70) y Pgal-co-GO (50:50) de *S. aureus*.

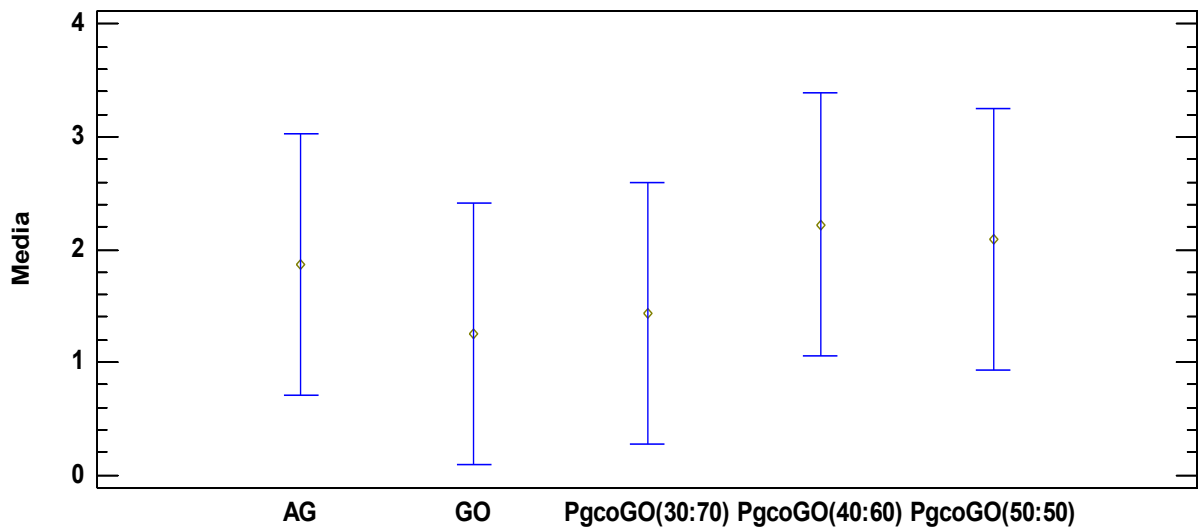


Figura 6.E. Análisis de medias de Fisher LSD para AG, GO, Pgal-co-GO (30:70), Pgal-co-GO (40:70) y Pgal-co-GO (50:50) de *E. faecalis*.

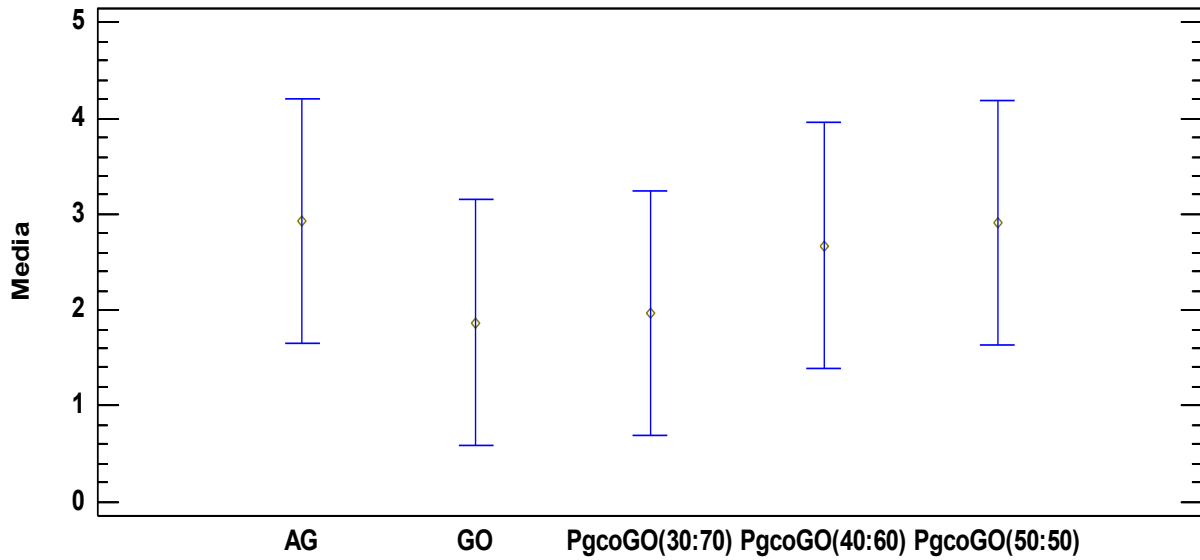


Figura 7.E. Análisis de medias de Fisher LSD para AG, GO, Pgal-co-GO (30:70), Pgal-co-GO (40:70) y Pgal-co-GO (50:50) de *E. coli*.

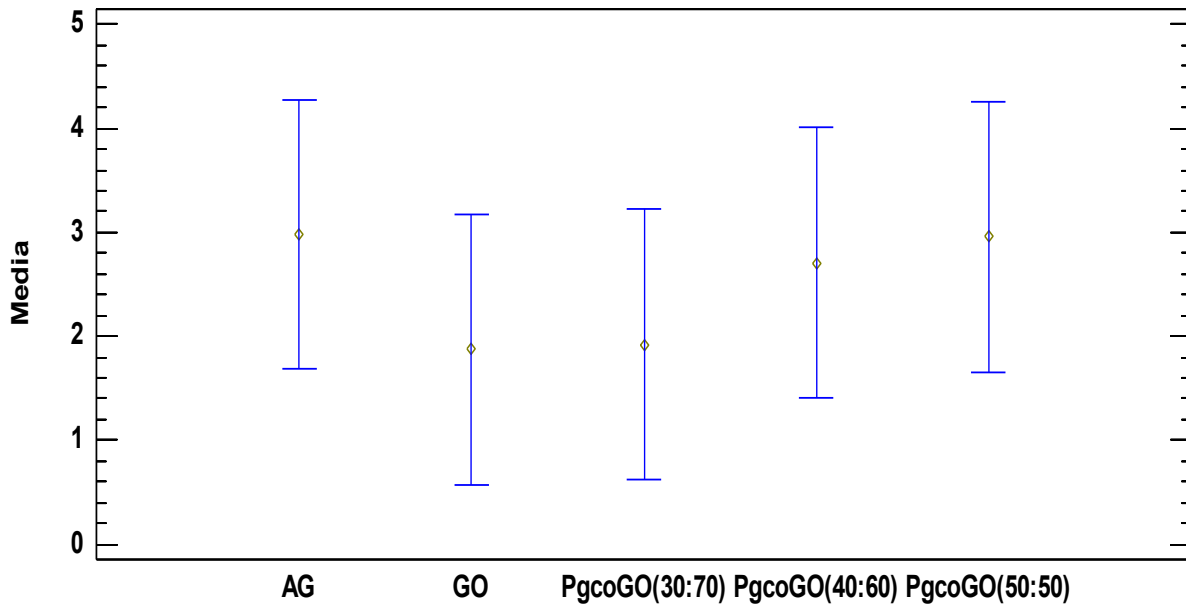


Figura 8.E. Análisis de medias de Fisher LSD para AG, GO, Pgal-co-GO (30:70), Pgal-co-GO (40:70) y Pgal-co-GO (50:50) de *P. aeruginosa*.

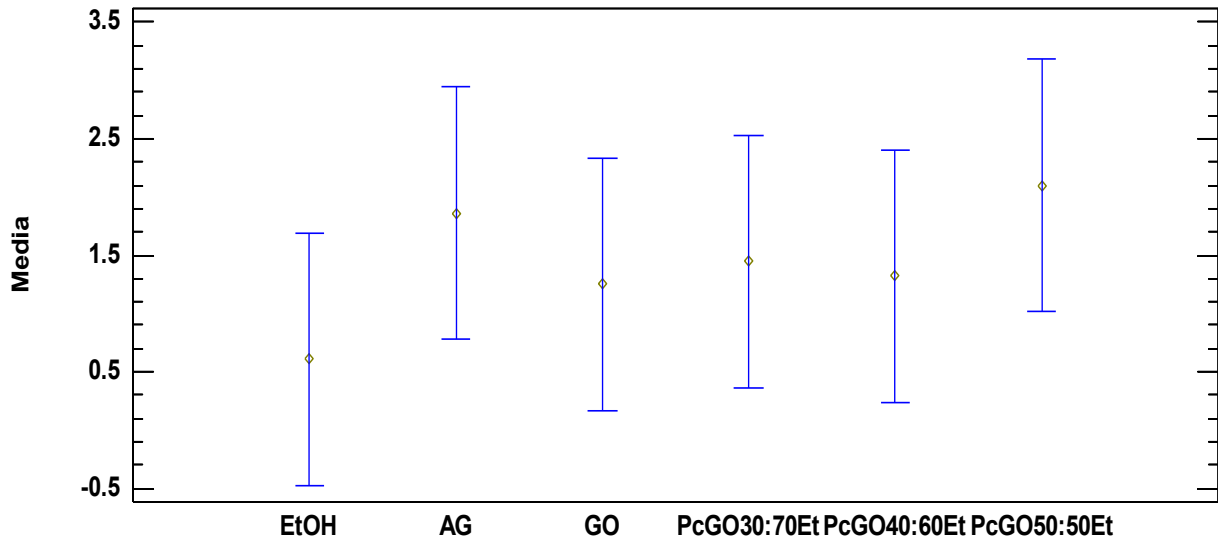


Figura 9.E. Análisis de medias de Fisher LSD para EtOH, AG, GO, Pgal-co-GO (30:70) Et, Pgal-co-GO (40:70) Et y Pgal-co-GO (50:50) Et de *S. aureus*.

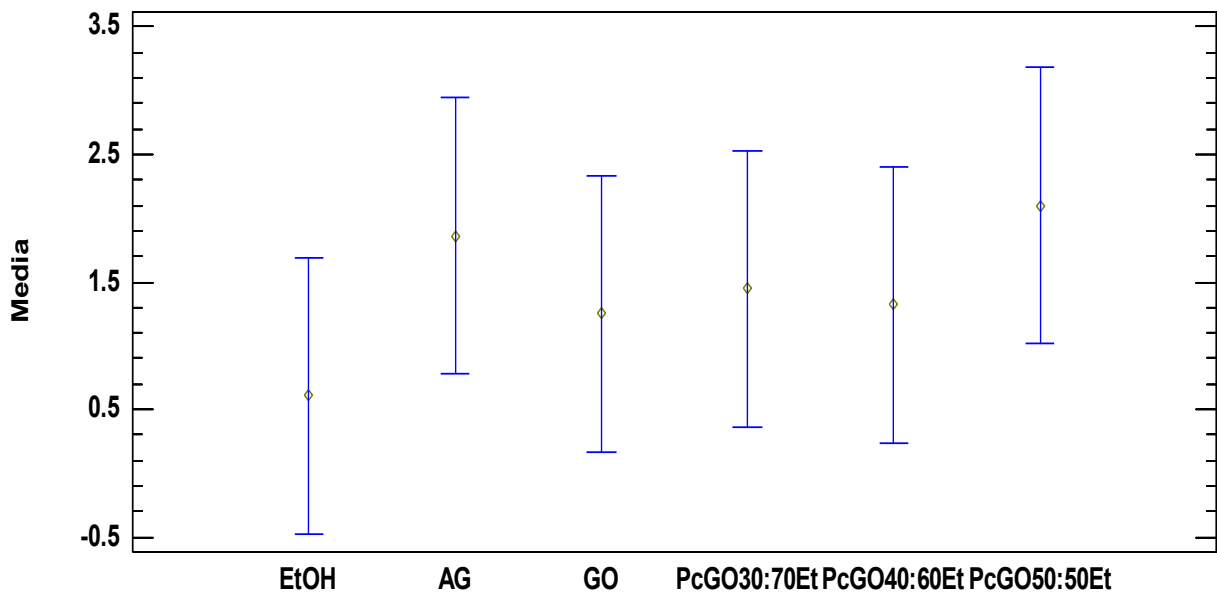


Figura 10.E. Análisis de medias de Fisher LSD para EtOH, AG, GO, Pgal-co-GO (30:70) Et, Pgal-co-GO (40:70) Et y Pgal-co-GO (50:50) Et de *E. faecalis*.

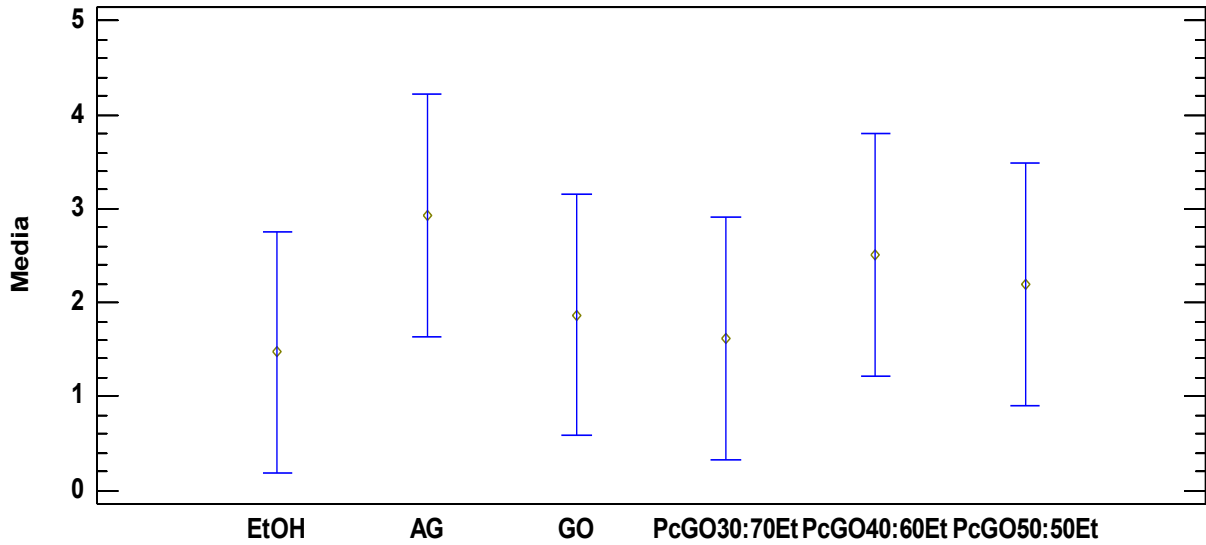


Figura 11.E. Análisis de medias de Fisher LSD para EtOH, AG, GO, Pgal-co-GO (30:70) Et, Pgal-co-GO (40:70) Et y Pgal-co-GO (50:50) Et de *E. coli*.

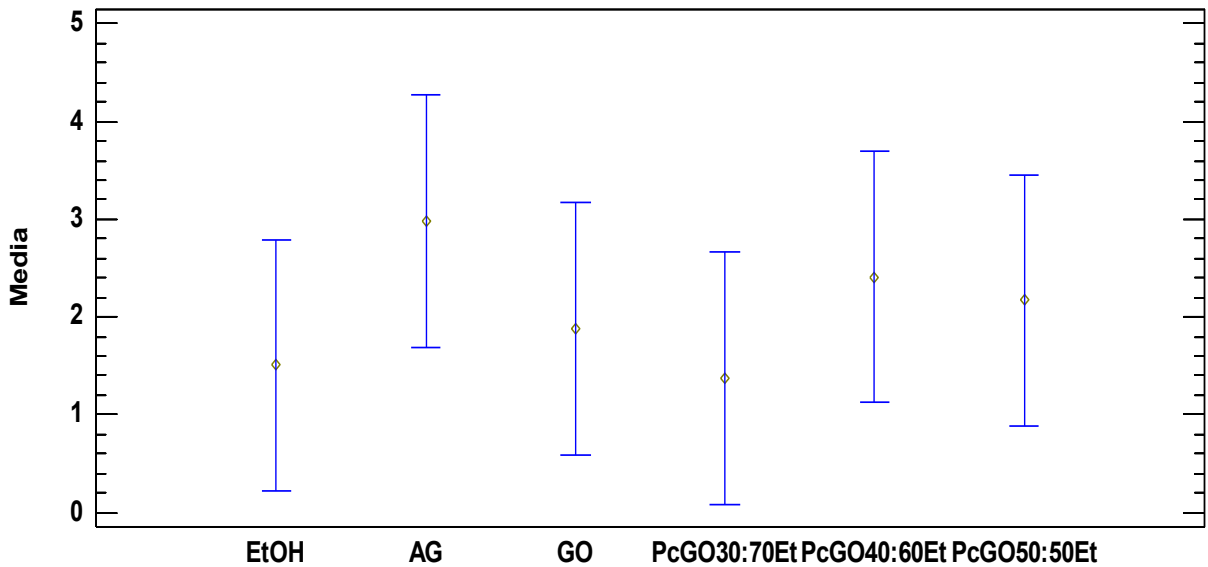


Figura 11.E. Análisis de medias de Fisher LSD para EtOH, AG, GO, Pgal-co-GO (30:70) Et, Pgal-co-GO (40:70) Et y Pgal-co-GO (50:50) Et de *P. aeruginosa*.

▪ **Apéndice F. Determinación IC₅₀**

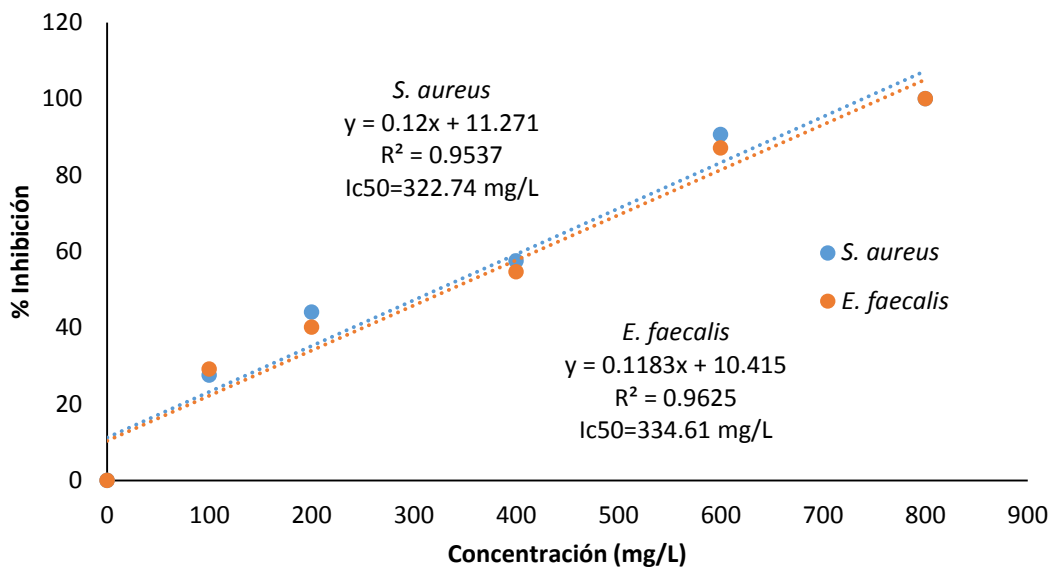


Figura F.1. Determinación IC₅₀ de AG para *S. aureus* y *E. faecalis*.

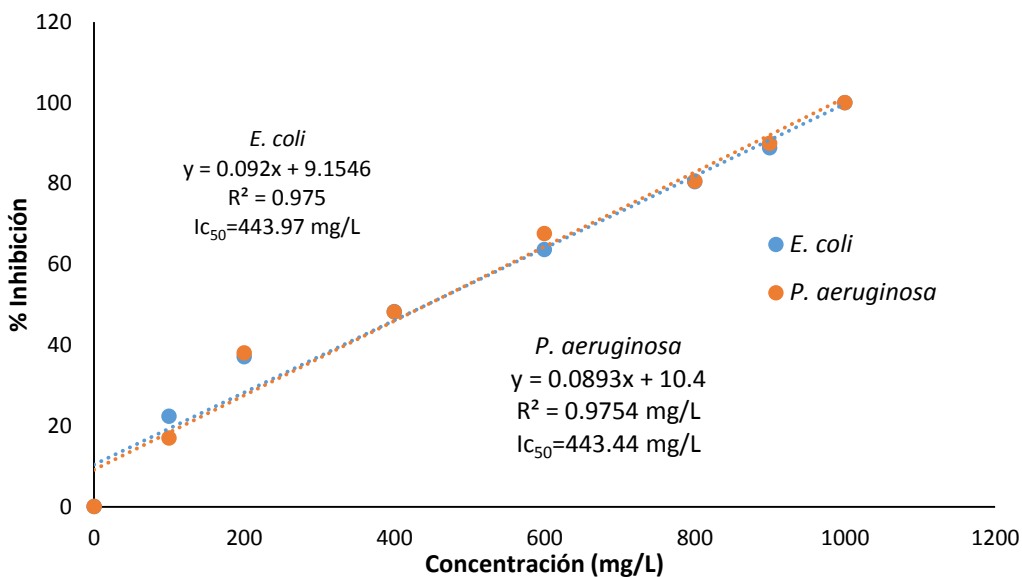


Figura F.2. Determinación IC₅₀ de AG para *E. coli* y *P. aeruginosa*.

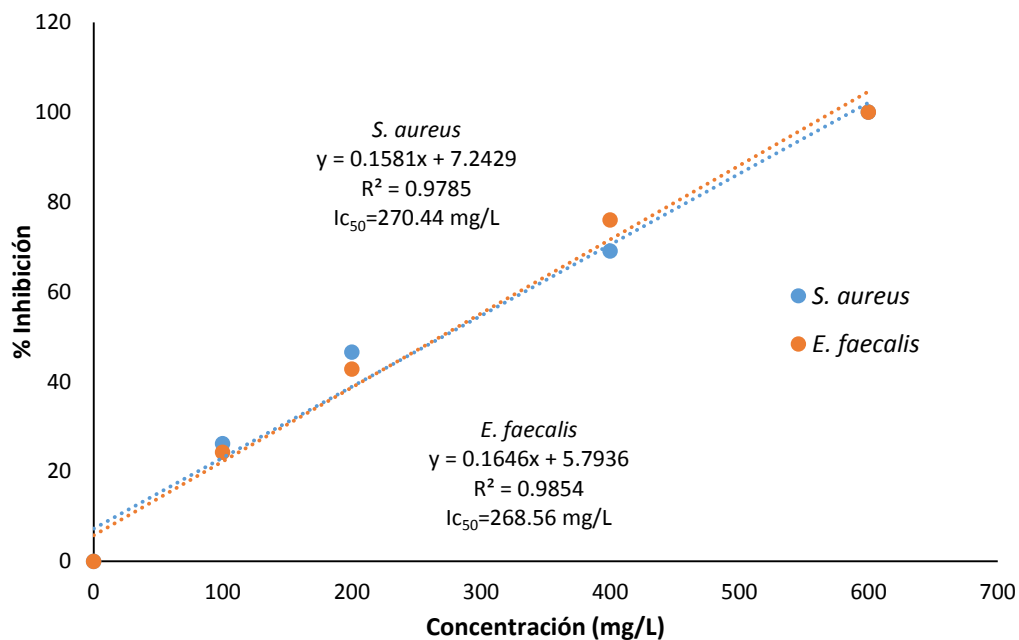


Figura F.3. Determinación IC_{50} de GO para *S. aureus* y *E. faecalis*.

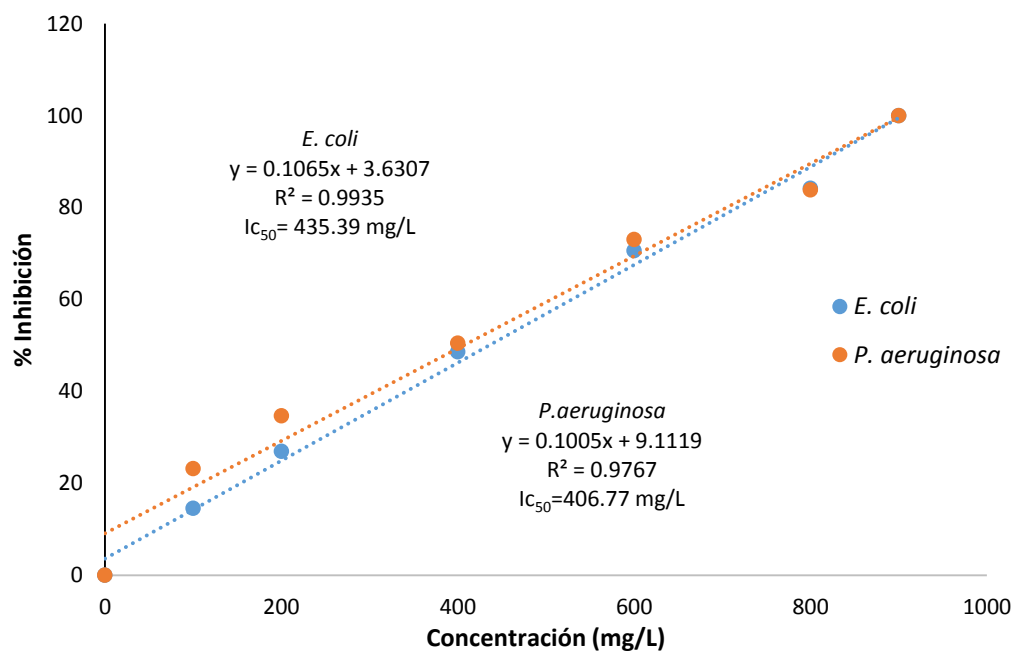


Figura F.4. Determinación IC_{50} de GO para *E. coli* y *P. aeruginosa*.

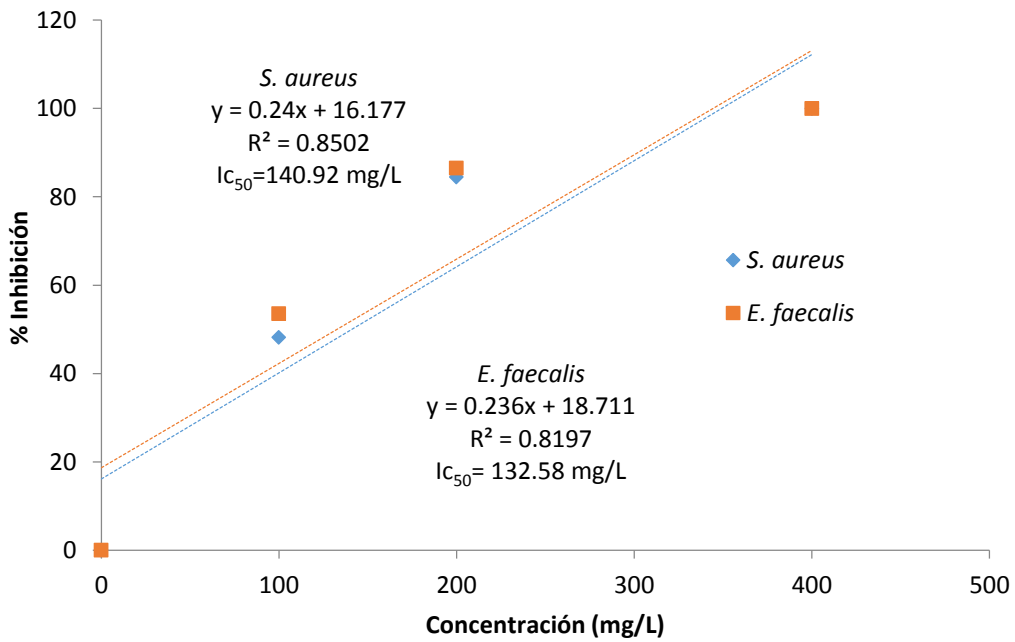


Figura F.5. Determinación IC_{50} de EtOH para *S. aureus* y *E. faecalis*.

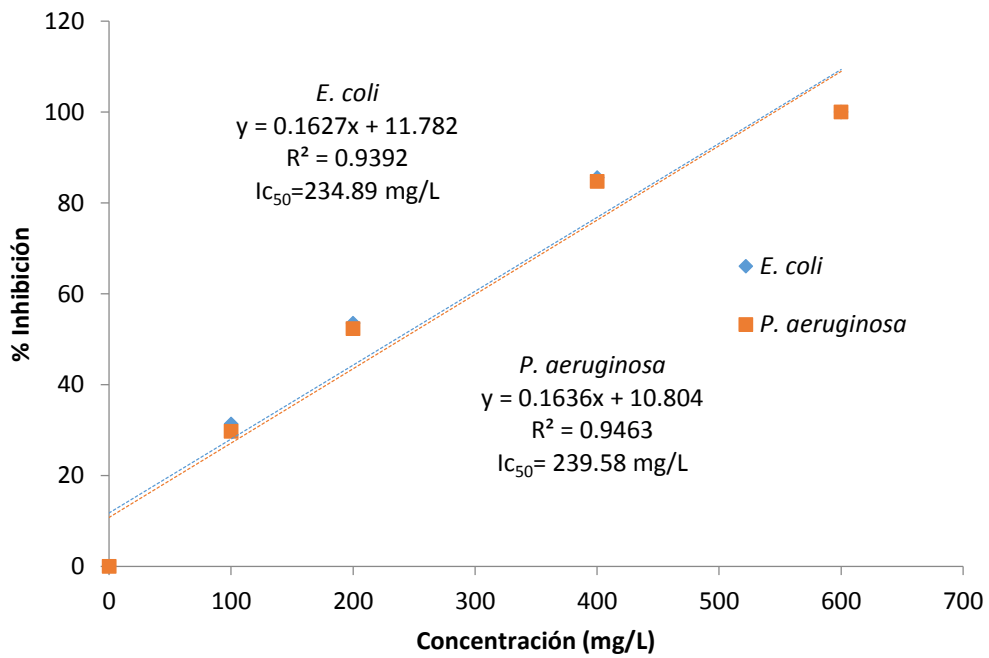


Figura F.6. Determinación IC_{50} de EtOH para *E. coli* y *P. aeruginosa*.

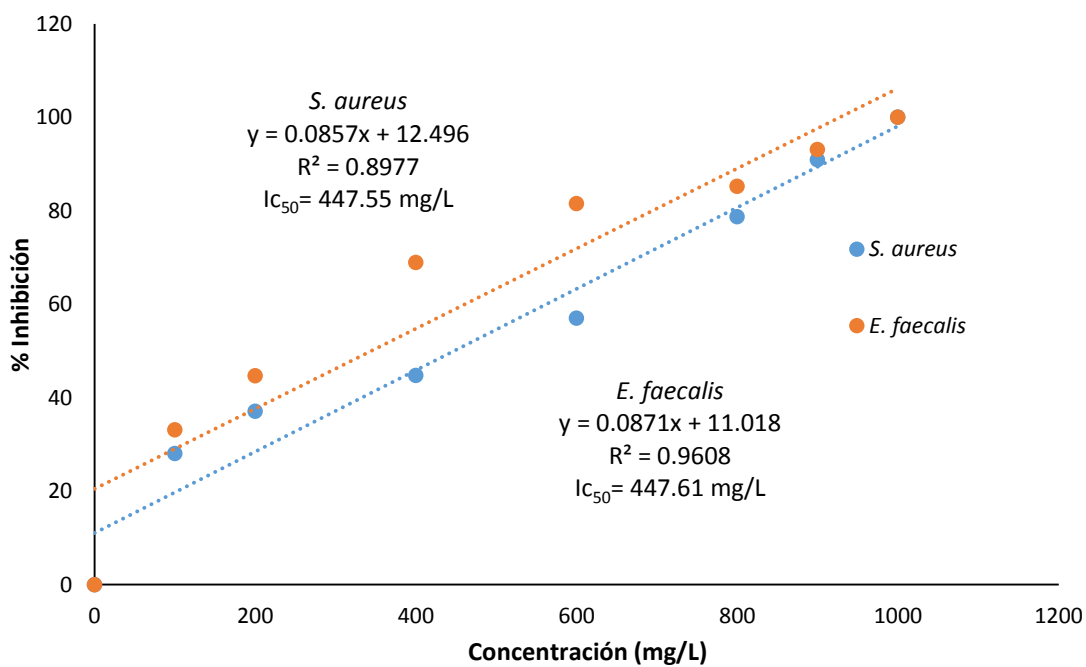


Figura F.7. Determinación IC_{50} de PGAL-LTV para *E. coli* y *P. aeruginosa*.

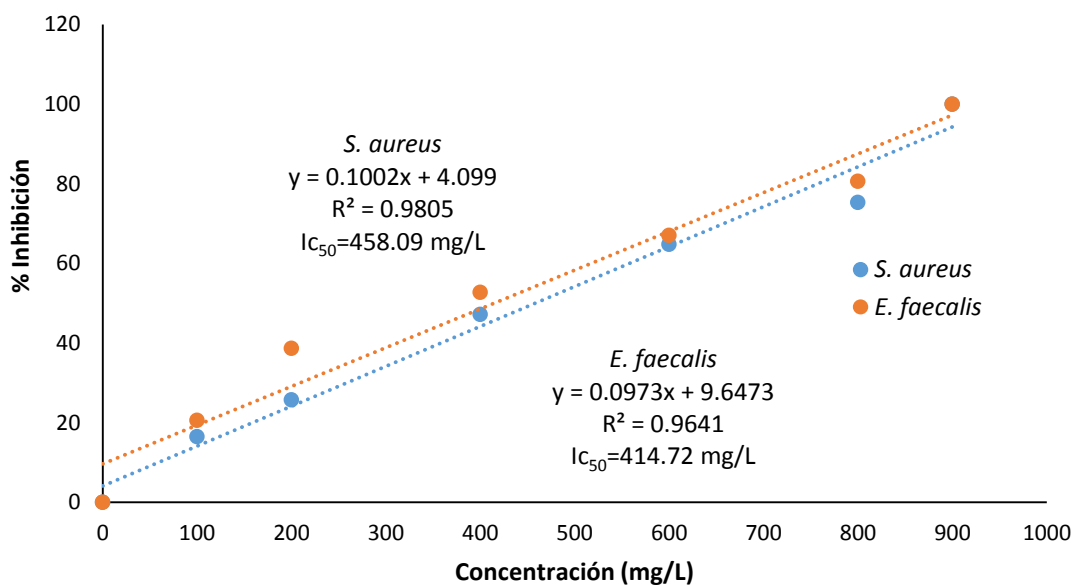


Figura F.8. Determinación IC_{50} de PGAL-HRP para *S. aureus* y *E. faecalis*.

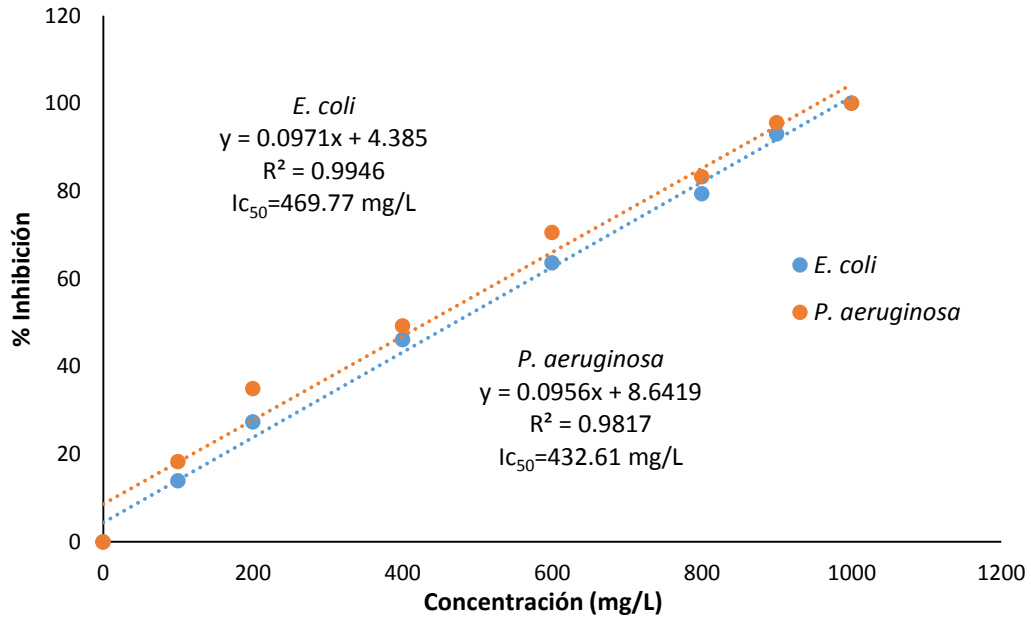


Figura F.9. Determinación IC_{50} de PGAL-HRP para *E. coli* y *P. aeruginosa*.

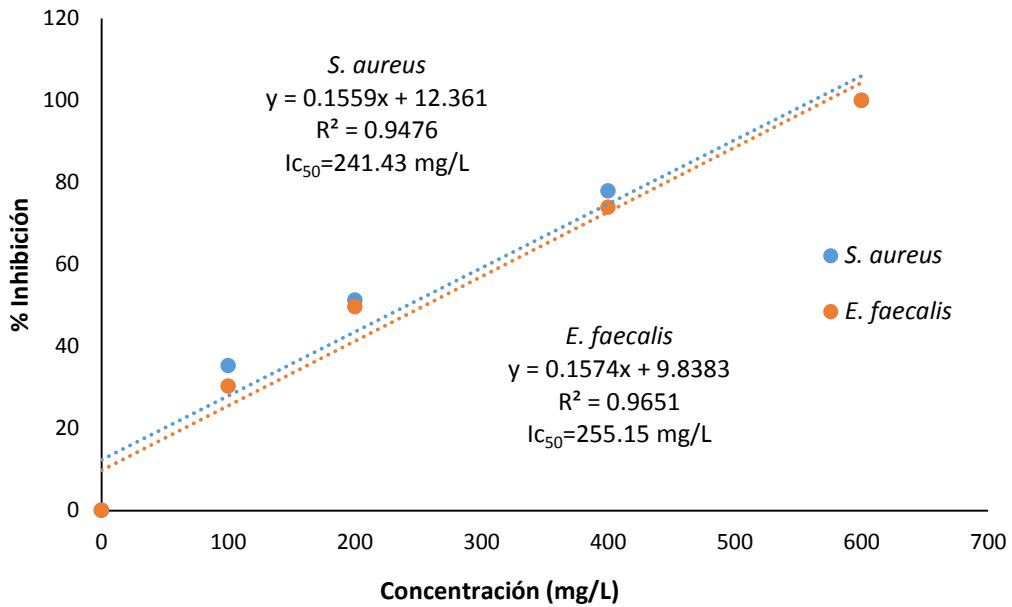


Figura F.10. Determinación IC_{50} de PGO para *S. aureus* y *E. faecalis*.

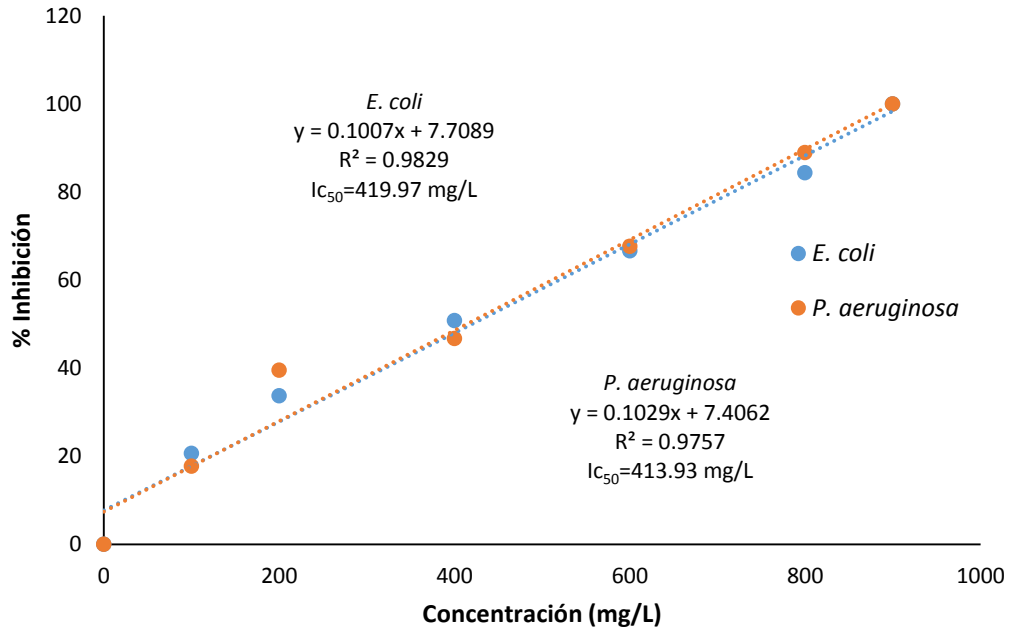


Figura F.11. Determinación IC₅₀ de PGO para *E. coli* y *P. aeruginosa*.

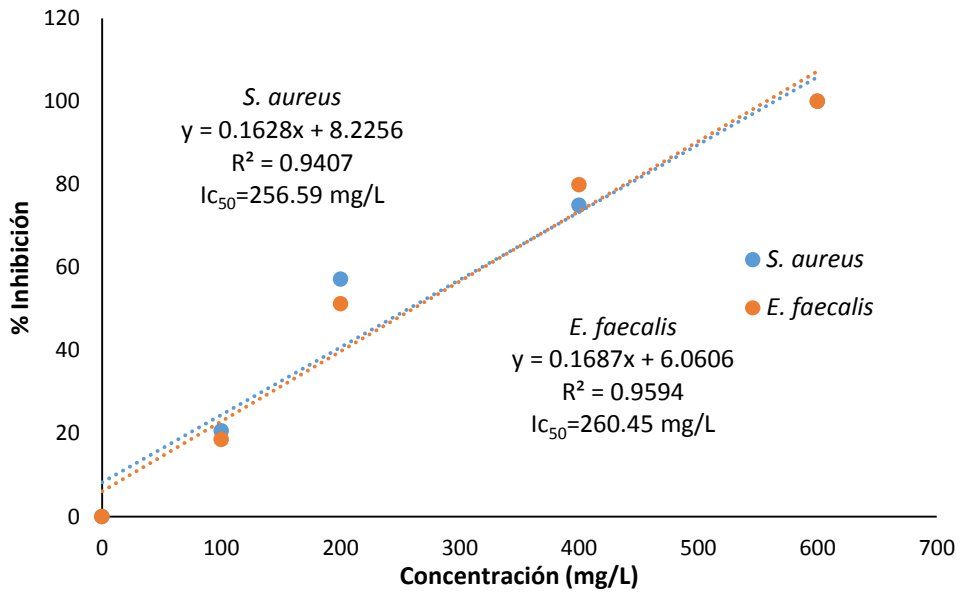


Figura F.12. Determinación IC₅₀ de Pgal-co-GO (30:70) para *S. aureus* y *E. faecalis*.

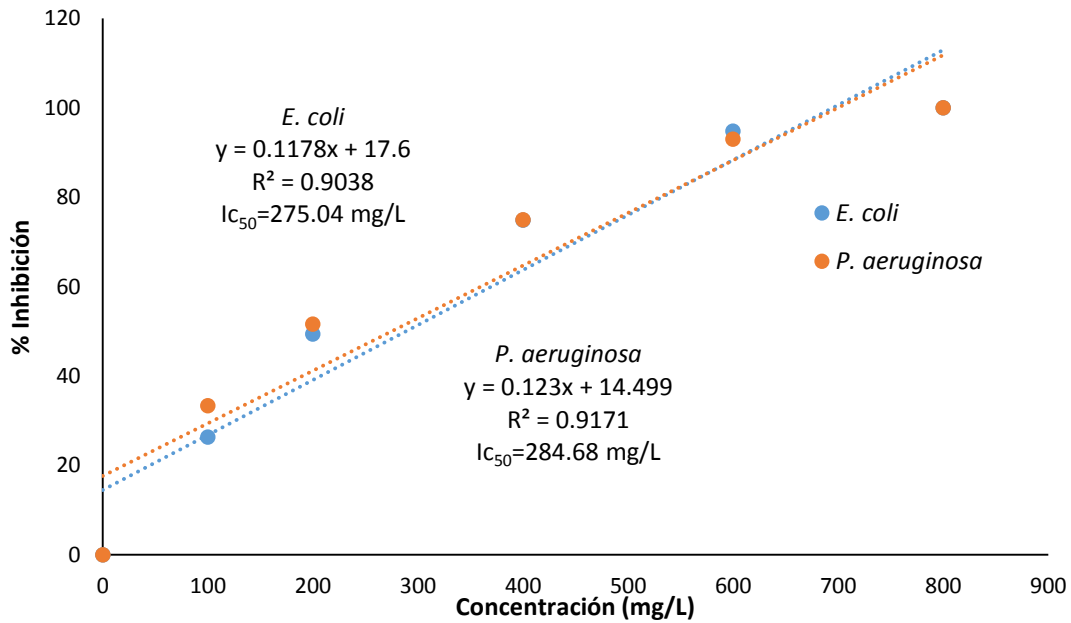


Figura F.13. Determinación IC₅₀ de Pgal-co-GO (30:70) para *E. coli* y *P. aeruginosa*.

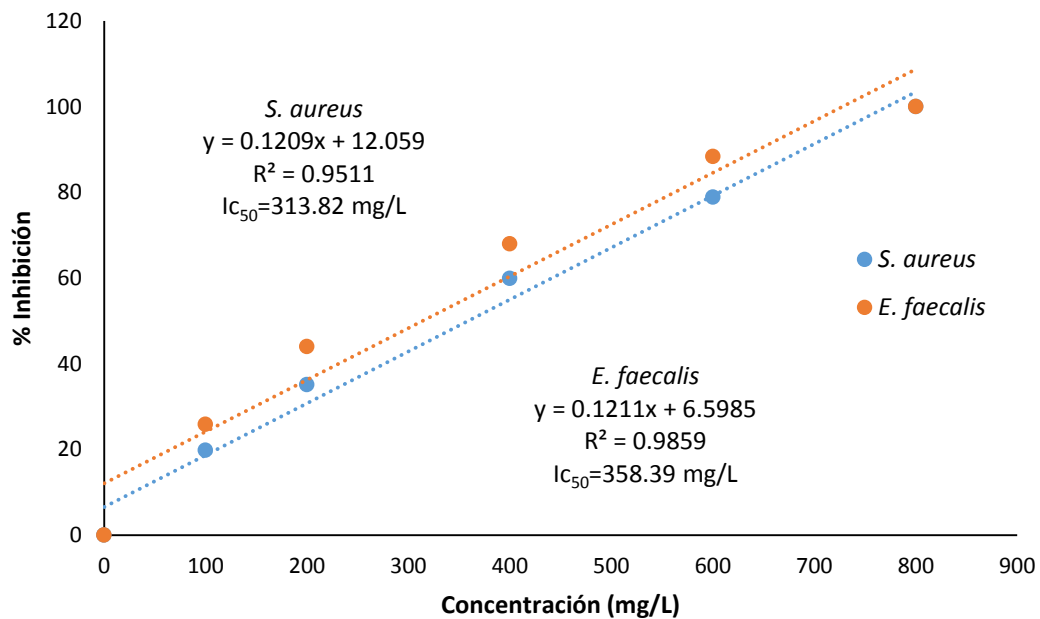


Figura F.14. Determinación IC₅₀ de Pgal-co-GO (40:60) para *S. aureus* y *E. faecalis*.

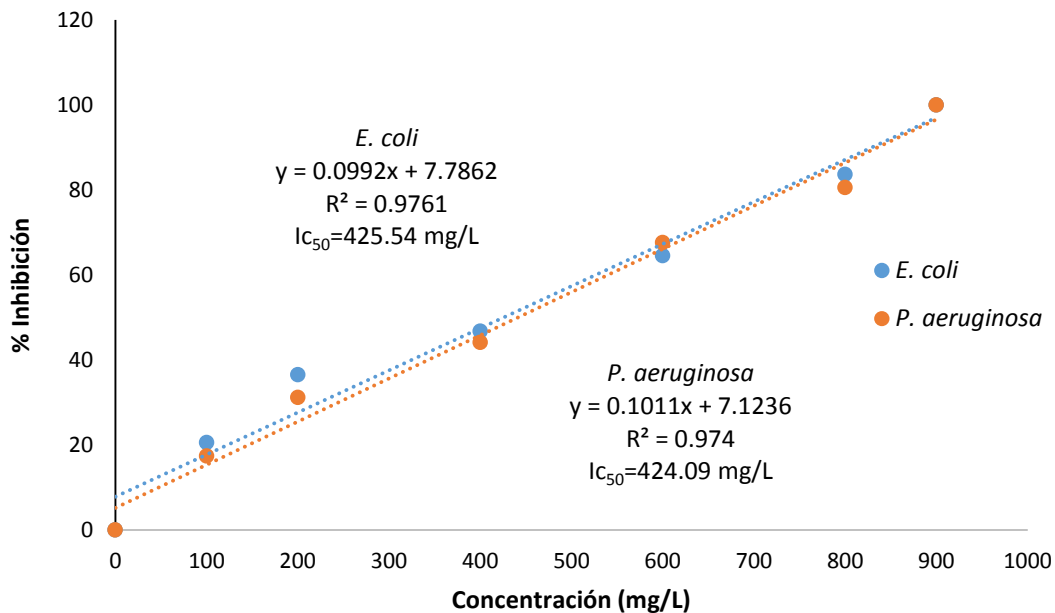


Figura F.15. Determinación IC₅₀ de Pgal-co-GO (40:60) para *E. coli* y *P. aeruginosa*.

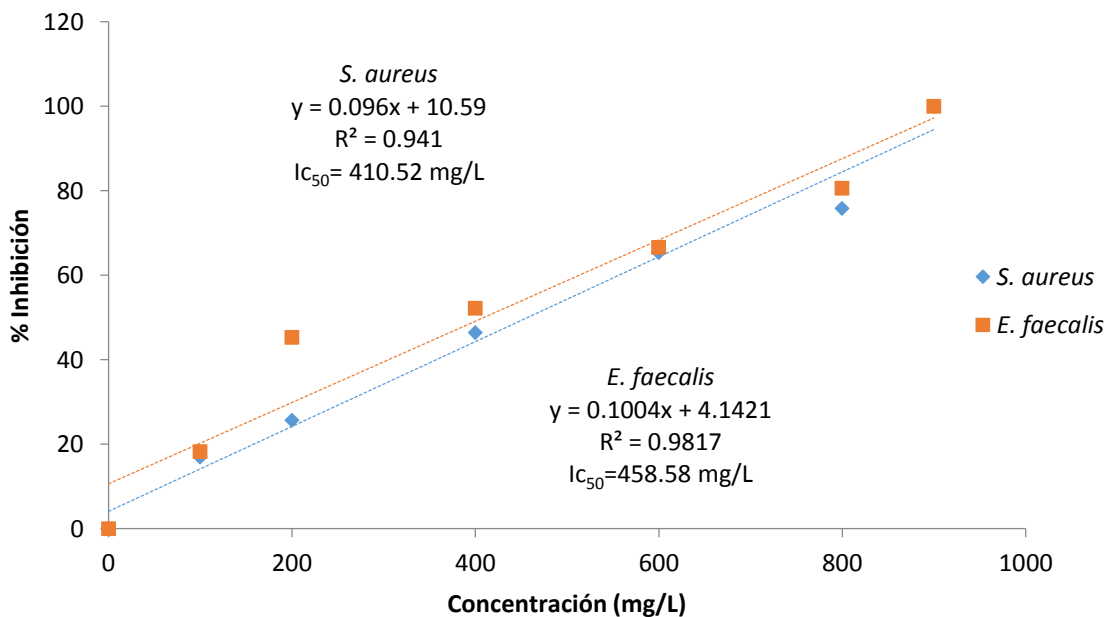


Figura F.16. Determinación IC₅₀ de Pgal-co-GO (50:50) para *S. aureus* y *E. faecalis*.

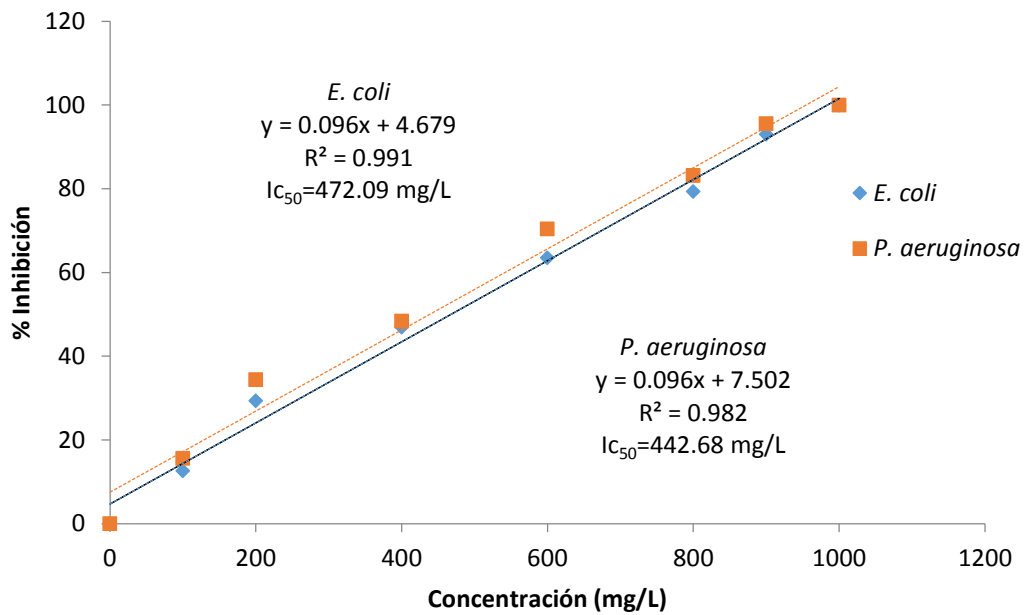


Figura F.17. Determinación IC_{50} de Pgal-co-GO (50:50) para *E. coli* y *P. aeruginosa*.

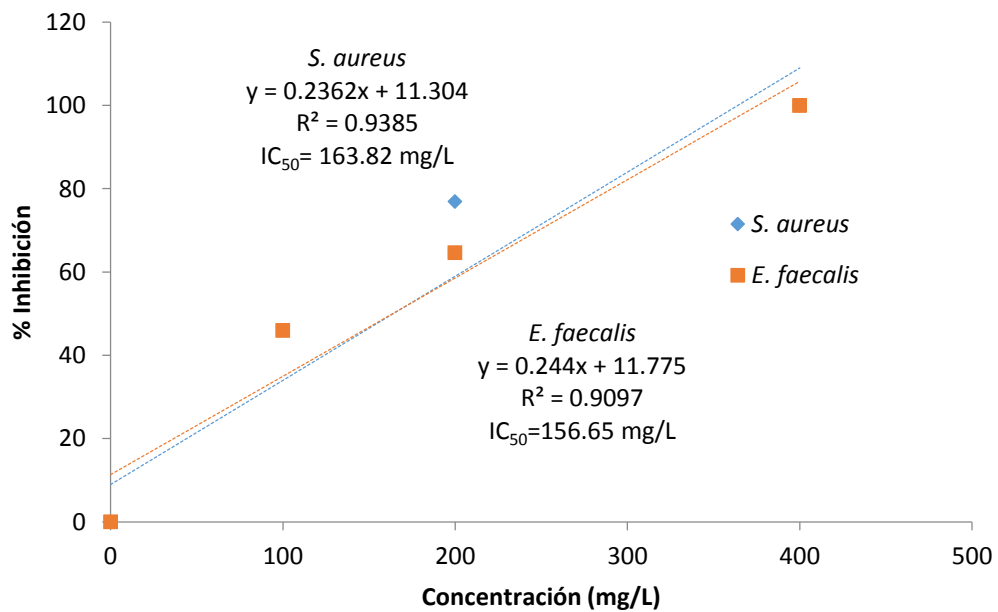


Figura F.18. Determinación IC_{50} de Pgal-co-GO (30:70) Et para *S. aureus* y *E. faecalis*.

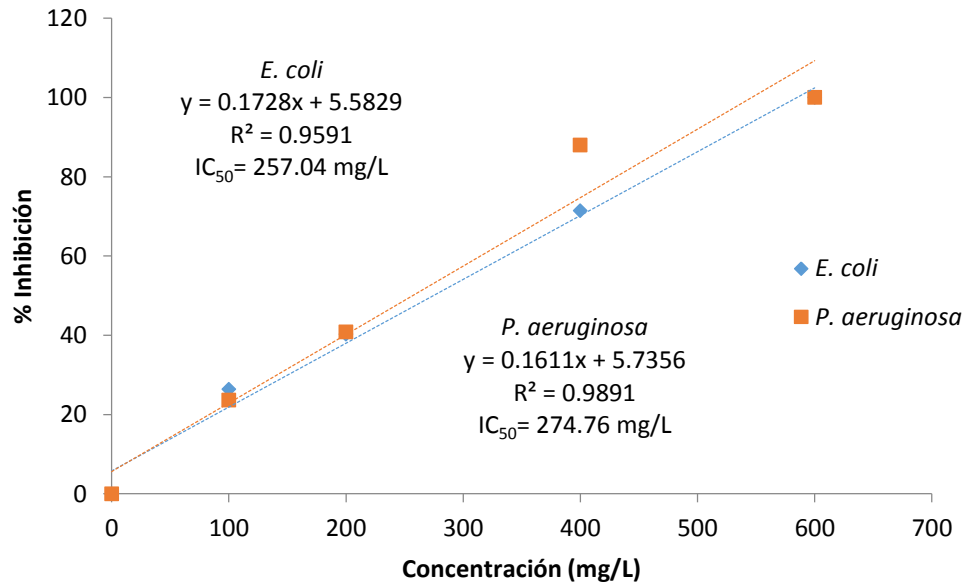


Figura F.19. Determinación IC_{50} de Pgal-co-GO (30:70) Et para *E. coli* y *P. aeruginosa*.

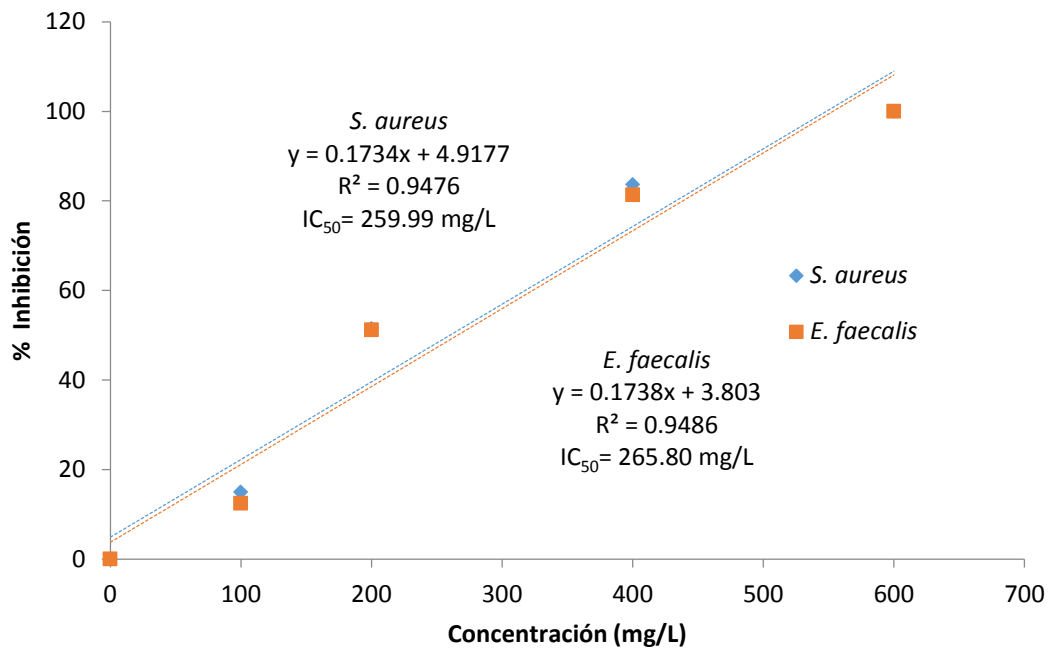


Figura F.20. Determinación IC_{50} de Pgal-co-GO (40:60) Et para *S. aureus* y *E. faecalis*.

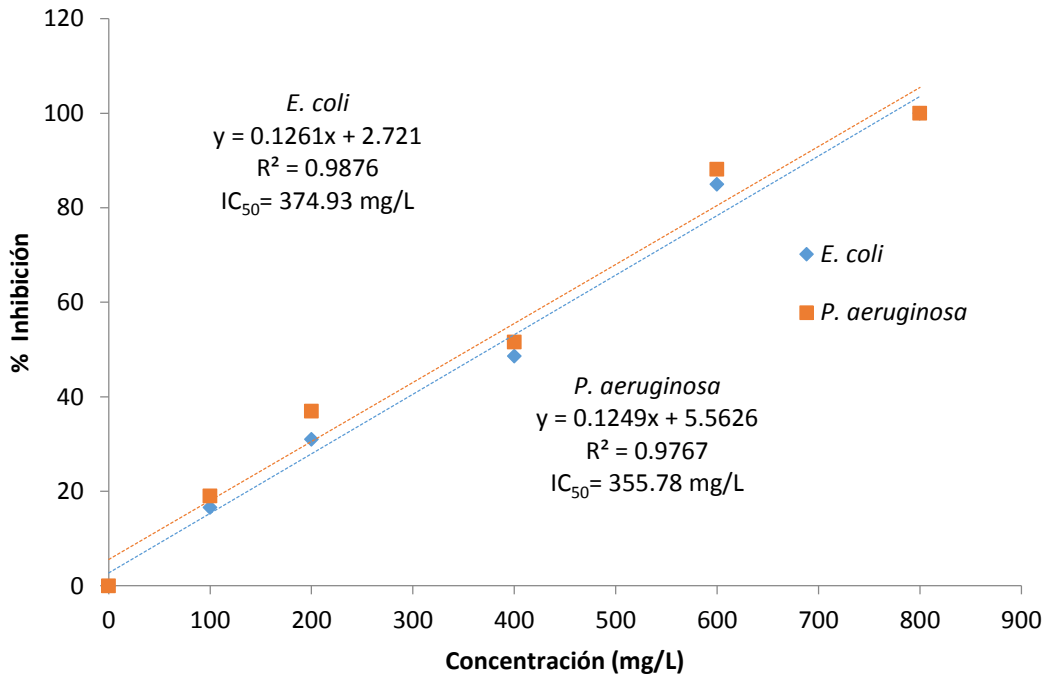


Figura F.21. Determinación IC_{50} de Pgal-co-GO (40:60) Et para *E. coli* y *P. aeruginosa*.

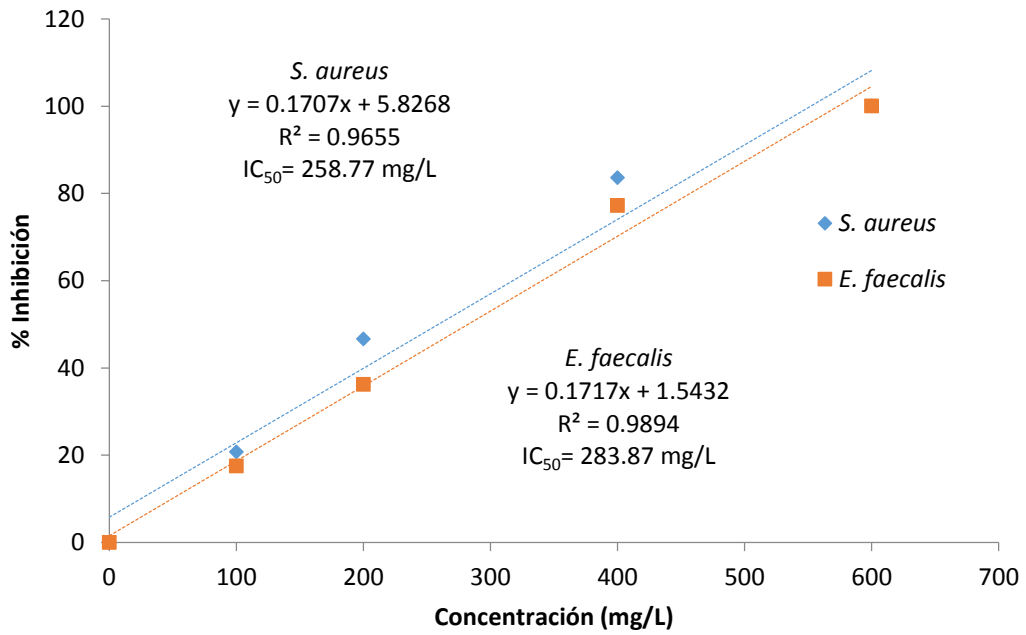


Figura F.22. Determinación IC_{50} de Pgal-co-GO (50:50) Et para *S. aureus* y *E. faecalis*.

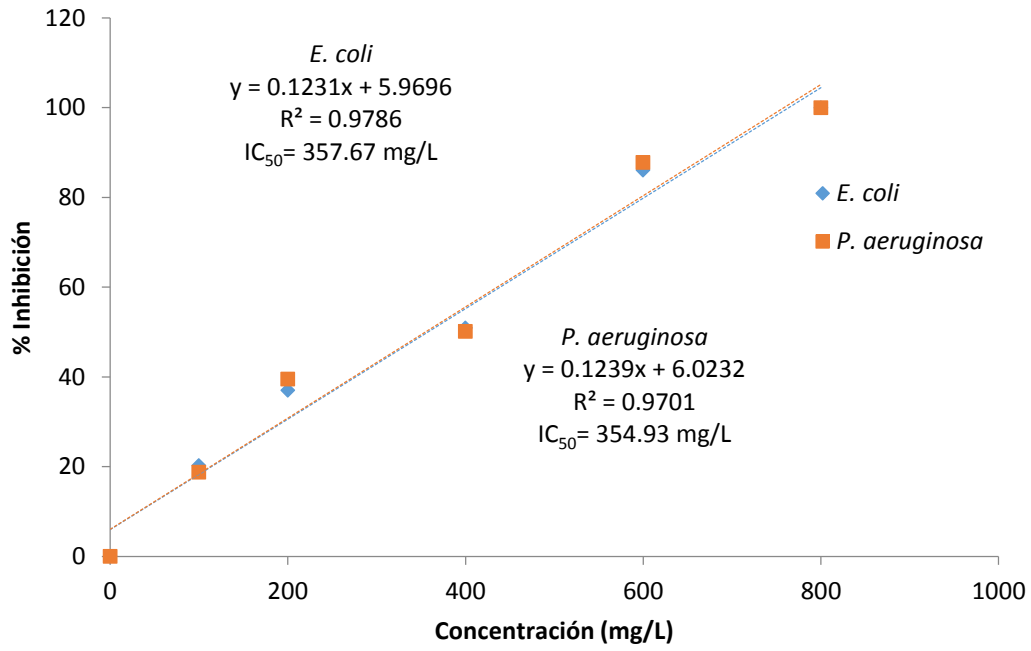


Figura F.23. Determinación IC_{50} de Pgal-co-GO (50:50) Et para *E. coli* y *P. aeruginosa*