


Evaluación de la actividad antimicrobiana de fracciones semi-purificadas aisladas de la secreción mucosa de *Achatina fulica* frente a diferentes microorganismos

Evaluation of the antimicrobial activity of semi-purified fractions isolated from the mucous secretion of *Achatina fulica* against different microorganisms

Libardo Andrés Suárez-Largo ; William Fernando Hidalgo-Bucheli ; Nelson Uribe-Delgado 

* whidalgo@uis.edu.co

Forma de citar: Suárez Largo LA, Hidalgo Bucheli WF, Uribe Delgado N. Evaluación de la actividad antimicrobiana de fracciones semi-purificadas aisladas de la secreción mucosa de *Achatina fulica* frente a diferentes microorganismos. Salud UIS. 2024; 56: e240412 doi: <https://doi.org/10.18273/saluduis.56.e:24042> 

Resumen

Achatina fulica, un molusco terrestre, es considerado una plaga que representa un riesgo para el ambiente y la salud humana. Sin embargo, su secreción mucosa contiene una fuente importante de moléculas bioactivas, con potencial en el campo biomédico. El objetivo de este estudio fue obtener fracciones proteicas semi-purificadas de la secreción mucosa y evaluar su actividad antimicrobiana. La secreción mucosa de *A. fulica* fue homogenizada con PBS que contenía inhibidores de proteasas. Se realizó una separación con Sephadex G-25 para eliminar sales e impurezas, y el crudo biológico fue liofilizado para posterior análisis y separación por cromatografía líquida en fase reversa. Las fracciones cromatográficas, al igual que la secreción mucosa, fueron evaluadas para actividad antimicrobiana frente a diferentes microorganismos mediante la técnica de microdilución en caldo. Las fracciones cromatográficas fueron adicionalmente analizadas por MALDI-TOF. Se recolectaron un total de cinco fracciones por cromatografía líquida semi-preparativa. Todas las fracciones obtenidas, al igual que la secreción mucosa homogenizada y el crudo obtenido por G-25, se determinó el porcentaje de inhibición contra las cepas de estudio. La fracción F-01 fue la que exhibió el mayor efecto antimicrobiano frente a *S. aureus* CMPUJ015, con una concentración mínima inhibitoria del 50 % de la población de 628.6 µg/mL. No obstante, no se determinó actividad biológica significativa contra los demás microorganismos evaluados. Los análisis por espectrometría de masas de la fracción F-01, permitieron identificar la presencia de un posible péptido antimicrobiano correspondiente a un valor m/z de 2145.237 [M+H⁺]. Se evaluó

¹Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

el efecto antimicrobiano de las fracciones cromatográficas derivadas de la secreción mucosa de *A. fulica* frente a diferentes microorganismos de interés, donde la fracción F-01 presentó un mayor efecto inhibitorio principalmente contra *S. aureus*.

Palabras clave: *Achatina fulica*; Secreción mucosa; Actividad antimicrobiana; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*.

Abstract

Achatina fulica, a terrestrial mollusk, is considered a pest which represents a risk to the environment and human health; however, its mucous secretion represents an important source of bioactive molecules, with potential in the biomedical field. The objective of this study was to obtain semi-purified protein fractions from mucus secretion and evaluate their antimicrobial activity. The mucus secretion of *A. fulica* was homogenized with PBS with protease inhibitors. Separation was performed with Sephadex G-25 to remove salts and impurities, and the biological crude was lyophilized for subsequent analysis and separation by reverse-phase liquid chromatography. The chromatographic fractions, as well as the mucous secretion, were evaluated for antimicrobial activity against different microorganisms using the broth microdilution technique. The chromatographic fractions were additionally analyzed by MALDI-TOF. A total of five fractions were collected by semi-preparative liquid chromatography. All the fractions obtained, as well as homogenized mucous secretion and the crude obtained by G-25 were determined for the inhibition percentage against the study strains. Fraction F-01 showed the highest antimicrobial effect against *S. aureus* CMPUJ015, with a minimum inhibitory concentration of 50% of the population of 628.6 µg/mL. However, no significant biological activity was determined against the other microorganisms tested. Mass spectrometric analysis of fraction F-01 identified the presence of a possible antimicrobial peptide corresponding to an m/z value of 2145.237 [M+H⁺]. The antimicrobial effect of chromatographic fractions derived from the mucous secretion of *A. fulica* was evaluated against different microorganisms of interest, where the F-01 fraction showed a higher inhibitory effect mainly against *S. aureus*.

Keywords: *Achatina fulica*; Mucous secretion; Antimicrobial activity; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*.

Introducción

La resistencia a los antibióticos por parte de una amplia variedad de microorganismos ha llegado a niveles críticos, y se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial^{1,2}. El aislamiento de nuevas cepas resistentes es cada vez mayor, mientras que el desarrollo de alternativas terapéuticas para enfrentarlas avanza a un ritmo más lento³. Esto trae consigo un alto riesgo para la salud humana, incluida la posibilidad de pérdida de vidas⁴, así como altos costos tanto para los sistemas de salud como para los pacientes⁵. Por ejemplo, en Estados Unidos, se estima que los gastos médicos asociados a una bacteriemia causada por *S. aureus* pueden ascender a US\$ 12 078 aproximadamente cuando el microorganismo es sensible a antimicrobianos, el costo se incrementa hasta 1,32 veces cuando se trata de cepas resistentes. Frente a esta situación, tanto la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés, *Centers for Disease Control and Prevention*) emitieron un boletín sobre los patógenos multirresistentes, entre los

que se encuentra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, microorganismos causantes de múltiples infecciones en personas y animales y, por tanto, clasificados con prioridad alta para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos^{6,7}.

S. aureus es un microorganismo ubicuo que se puede encontrar en diferentes fuentes como aire, suelo, agua, animales, así como en el microbioma de las fosas nasales en un 20 a 40 % de la población general y, en la piel en menor proporción^{8,9}. Al ocurrir una herida del tejido epitelial o mucoso, este microorganismo puede utilizar proteasas, hemolisinas y proteínas de adherencia como principales factores de virulencia para ingresar al torrente sanguíneo o los tejidos subyacentes y provocar infecciones en la piel, neumonías, endocarditis, bacteriemias; de igual forma, puede causar intoxicaciones al consumir alimentos con presencia del microorganismo o sus toxinas¹⁰. También se ha determinado que las personas con algún compromiso en el sistema inmune o por presencia de dispositivos médicos invasivos son especialmente, más susceptibles de sufrir infecciones a causa de este microorganismo⁸.

E. coli pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es común encontrarla como parte del microbioma normal de diferentes organismos; existen más de 160 serovariedades que pueden estar involucradas en infecciones en el tracto gastrointestinal, tracto urinario, meningitis y sepsis¹¹. En Colombia es el principal agente etiológico de infecciones urinarias¹², pero también se encuentra asociada a infecciones intrahospitalarias y transmitidas por alimentos^{13,14}.

Por otra parte, *P. aeruginosa* es un microorganismo ubicuo con la capacidad de sobrevivir diversos ambientes debido a su capacidad de adaptación a cambios ambientales y versatilidad metabólica¹⁵. Es un patógeno oportunista, que genera una amplia gama de infecciones, principalmente en entornos hospitalarios amiento se da principalmente en infecciones asociadas a procedimientos médico-quirúrgicos y en pacientes de unidades de cuidados intensivos¹⁶.

Por estas razones, la OMS creó el plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos, donde se busca generar concientización sobre la resistencia, fortalecer la vigilancia epidemiológica, crear medidas efectivas para la prevención de infecciones, optimizar el uso de los antimicrobianos y aumentar la inversión en la investigación y desarrollo de medicamentos, vacunas y métodos diagnósticos¹⁷. Con estas medidas se espera contribuir en solucionar el estado actual de esta problemática, por lo tanto, es necesario encontrar nuevas alternativas farmacéuticas para mitigar este desafío^{18,19}.

En consecuencia, es necesario desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para enfrentar este problema y los productos naturales se han convertido en atractivas e invaluable fuentes de compuestos bioactivos por ser explorados. En este contexto, los invertebrados, en particular el filo Mollusca han generado particular atención, ya que estos eucariotas carecen de inmunidad adquirida, y al tomar en consideración el éxito evolutivo de estos organismos, es evidente que su inmunidad innata es extremadamente efectiva²⁰. Diversos estudios han reportado compuestos aislados de moluscos marinos, con diferentes actividades biológicas entre las que destacan antitumoral, antiinflamatoria y antimicrobiana²¹. Sin embargo, en el caso de los moluscos terrestres, la información sobre este tema es limitada^{22,23}. No obstante, algunos estudios enfocados en caracterizar la secreción mucosa de *Achatina fulica*, un molusco terrestre, han demostrado que posee propiedades antimicrobianas²⁴⁻²⁹.

A. fulica, un gasterópodo terrestre de gran tamaño, se ha reportado en los cinco continentes y está enlistado dentro de las 100 especies invasoras más dañinas del mundo, debido a su resistencia a cambios ambientales, su dieta polífaga y su alta tasa de reproducción³⁰. Esta especie ha sido introducida en nuevas regiones principalmente por la intervención humana, debido a las diferentes propiedades medicinales y alimentarias que tradicionalmente se le han asociado a este organismo³¹. Sin embargo, estudios realizados con este caracol han logrado evidenciar diferentes propiedades biológicas, entre ellas, actividad antimicrobiana frente a varios microorganismos, efectos antitumorales y cicatrizantes^{26,29,32-34}. Con base en lo anterior, es clara la importancia e impacto biológico que podría derivarse del estudio de la secreción mucosa de *A. fulica*, por cuanto la presente investigación tuvo como objetivo evaluar las propiedades antimicrobianas de la secreción mucosa semipurificada y las fracciones obtenidas por cromatografía líquida frente a *S. aureus* CMPUJ 015, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Materiales y Métodos

Obtención de la secreción mucosa de *A. fulica*

La captura de especímenes de *A. fulica* se realizó en el barrio La Paz del municipio de Floridablanca, Santander, Colombia (7°03'34.9"N, 73°05'48.2"O). Los caracoles fueron identificados con base en las características morfológicas de su concha y fueron seleccionados aquellos que tenían un tamaño de concha entre 5 y 12 cm (**Figura 1**). La secreción mucosa se obtuvo siguiendo la metodología descrita por Iguchi et al.³³, mediante estimulación directa del pie del caracol con corriente eléctrica de 9 V e intervalos de 30 a 60 s. La muestra biológica se recolectó en recipientes estériles³³. Luego de la obtención de la secreción mucosa, los ejemplares capturados fueron sacrificados siguiendo los lineamientos dado por el ICA (Instituto Colombiano Agropecuario) y el INS (Instituto Nacional de Salud)^{35,36}.

Cabe aclarar que para la captura de los especímenes no se requiere permiso de recolección de especímenes de especies silvestres de diversidad biológica con fines de investigación no comercial (Decreto No. 1376 de 2013), porque *Achatina fulica* es una especie introducida, perjudicial para la biodiversidad y salud pública, y es considerada una plaga.

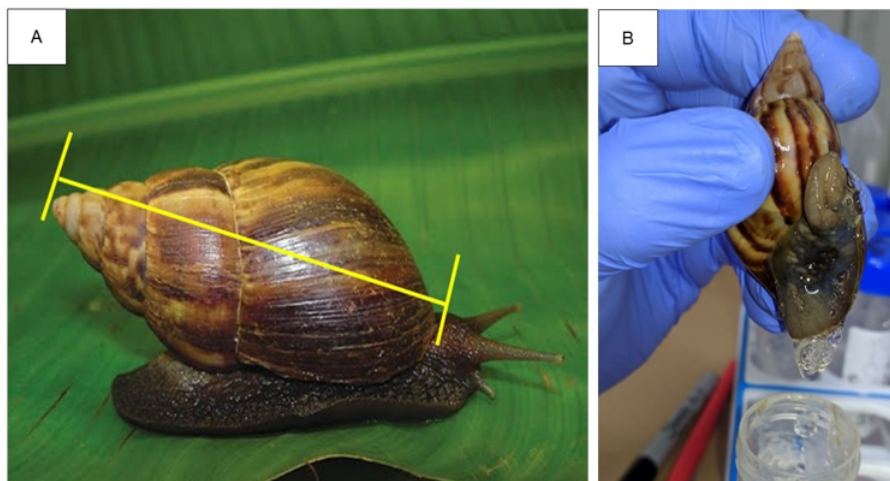


Figura 1. *Achatina fulica*; A. Se indica la forma correcta para realizar la medición de la concha del caracol; B. Obtención de la secreción mucosa de *Achatina fulica*

Preparación de la muestra

La homogenización de la secreción mucosa se realizó mediante la metodología descrita por Zhong et al.²⁹, con ligeras modificaciones. Se mezcló un volumen de solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) y un volumen de secreción mucosa, y se dejó en agitación durante 24 horas, posteriormente se centrifugó a 8000 g por 15 minutos a 4 °C. Un cóctel de inhibidores de proteasas compuesto por EDTA (por sus siglas en inglés *Ethylenediaminetetraacetic acid*) a 2 mM, ortovanadato de sodio a 1 mM y PMSF (por sus siglas en inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*) a 1mM, fue adicionado a la muestra tratada con la finalidad de disminuir la degradación del material proteico. Posteriormente, la muestra incluyó un paso de *clean-up* utilizando Sephadex G-25 (20 mm x 50 mm) para eliminar las sales e impurezas que pudiesen estar presentes en esta, para lo cual, 5 mL de secreción mucosa homogenizada fueron adicionados y la elusión se realizó con 10 mL de agua tipo I. Se recolectó la muestra, para posterior liofilización y conservación de la muestra a -20 °C para análisis adicionales.

Análisis de la secreción mucosa por cromatografía líquida (RP-HPLC)

Para el análisis por RP-HPLC, se utilizó 8 mg de la muestra liofilizada, la cual se resuspendió en 1 mL de agua tipo I, se filtró con un filtro de RC (*Regenerated Cellulose*) de 0,22 μm y, posteriormente, se inyectó 1 μL de la muestra en un cromatógrafo líquido Hitachi LaChrom Elite (Hitachi High Technologies America Inc, Schaumburg, IL, USA), equipado con una columna Hyperclone BDS C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 μm). La fase

móvil consistió de agua (tipo I) con ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 % v/v (solvente A) y acetonitrilo con TFA 0,1 % v/v (solvente B), en un gradiente lineal de 5 % a 70 % de solvente B a un flujo de 0,7 mL/min. El fraccionamiento de la muestra se llevó a cabo utilizando RP-HPLC semi-preparativa, con un volumen de inyección de 60 μL de muestra y recolección manual de las fracciones. Se utilizó una longitud de onda de 218 nm para monitorear la respuesta del detector. Todas las fracciones recolectadas fueron concentradas en un concentrador de vacío Savant™ SpeedVac SPD120 (ThermoFisher Scientific, Asheville, NC, USA) y luego liofilizadas para posterior análisis.

Análisis por Electroforesis SDS-PAGE

Las fracciones obtenidas por RP-HPLC de la secreción mucosa, fueron analizadas utilizando electroforesis SDS-PAGE en geles de acrilamida/bisacrilamida de 5 % para concentración, y de 14 % para la separación. Las muestras se mezclaron con buffer Laemmli (3,55 mL de agua tipo I, 1,25 mL de Tris-HCl 0,5 M a pH 6,8, 2,5 mL de glicerol, 2 mL de SDS al 10 % y 0,2 mg de azul de bromofenol al 0,5 %) en una proporción 1:1 y se incubaron durante 5 minutos a 95 °C. Un marcador de peso molecular (14,4 – 116 KDa) Pierce™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) fue utilizado para el análisis y se depositó 15 μL de cada muestra en los pozos del gel de electroforesis. Los geles se corrieron en un equipo de electroforesis Mini-PROTEAN (Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories, Delaware, USA) a un voltaje inicial de 30 V por 20 minutos hasta que las muestras entraron en el gel de separación³⁷. Posteriormente, un voltaje de

150 V fue aplicado durante 85 min. Luego, el gel fue coloreado con Coomassie R-250 durante 1 hora, se lavó con una solución de decoloración (solución acuosa de 50 % metanol y 10 % de ácido acético) hasta lograr la visualización de las bandas. Los geles se escanearon con un visualizador de imágenes ChemiDoc™ Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) y fueron analizados con el programa ImageLab 6.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF

Cada una de las fracciones recuperadas por RP-HPLC fueron analizadas utilizando un espectrómetro de masas MALDI-TOF (UltrafleXtreme, Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). La matriz de ionización, ácido α -ciano-4-hidroxycinámico (HCCA), fue utilizada para los análisis y se preparó en una concentración de 1 mg/mL de HCCA en una solución de acetonitrilo:agua (250:50) al 0,01 % (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA). Sobre el target se agregó 1 μ L de la matriz, seguido de 1 μ L de la fracción a evaluar y finalmente 1 μ L de matriz; como blanco se utilizó 1 μ L de la matriz sin ningún tipo de muestra. Una solución de nueve péptidos estándar (fragmento 1-7 de bradicinina, Angiotensina II, Angiotensina I, substancia P, Bombesina, Sustrato de renina, clip 1-17 de ACTH, clip 18-39 de ACTH, Somatotatina 28) (Peptide Calibration Standard II, Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) se utilizó como patrón de calibración de masas, el cual se dispuso en un spot junto a las muestras a analizar. Todas las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente, la adquisición de espectros se llevó a cabo por un método de reflectrón en modo de adquisición de iones positivo con una potencia de láser del 80 % y a una frecuencia de 500 Hz. y el rango de masas evaluado fue 1000 a 15 000 Da. Estos parámetros fueron configurados en un método preestablecido en el software del equipo como Micro Bio Tools (MBT.par), el cual fue utilizado como el método estándar para la adquisición de datos por MALDI-TOF-MS.

Microorganismos y condiciones de crecimiento

Las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922 se adquirieron de la *American Culture Collection* (ATCC; Rockville, MD, USA). La cepa *S. aureus* CMPUJ 015 fue adquirida de la Colección de Microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana, microorganismo certificado por la World Federation of Culture Collection (Utrecht, Países Bajos). Las cepas se incubaron en caldo BHI

(por sus siglas en inglés *Brain Heart Infusion*), antes de realizar los ensayos de actividad biológica antimicrobiana.

Evaluación de actividad antimicrobiana

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó mediante el método de microdilución en caldo descrito por el estándar CLSI-M07-A10-2015 y adaptado para nuevos compuestos antimicrobianos según el protocolo interno del laboratorio³⁸. Cada microorganismo se cultivó por 12 h a 37 °C con agitación constante, en los medios de cultivo Müller Hilton (MH) y Luria Bertani (LB) para bacterias Gram positivas y Gram negativas, respectivamente; cada uno de estos cultivos se ajustó a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Luego, 100 μ L del inóculo se mezclaron con 100 μ L de la muestra a evaluar, depositados en una microplaca de 96 pozos (Fondo plano, Poliestireno), y se incubó a 37 °C en un agitador orbital MaxQ™ 4450 (ThermoFisher Scientific, Marietta, OH, USA) a 200 rpm. El crecimiento microbiano se determinó midiendo la absorbancia a 595 nm, cada hora durante 8 horas, usando un espectrofotómetro Multiskan Sky (Thermo Labsystems Inc., Beverly, MA, USA) (con resolución de longitud de onda de 1 nm, rango de respuesta lineal de análisis de 0 a 2,5 Abs), el medio de cultivo sin inóculo se usó como control negativo y el inóculo sin tratamiento fue utilizado como control de crecimiento. Se determinó el porcentaje de inhibición y la concentración mínima inhibitoria 50 (CMI₅₀) para los diferentes microorganismos tratados con la secreción mucosa homogeneizada y las fracciones obtenidas por RP-HPLC en concentraciones de 1000, 500, 250, 125 μ g/mL.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental exploratorio con dos factores (secreción mucosa homogeneizada y secreción mucosa homogeneizada con pre-purificación por Sephadex G-25) y diferentes concentraciones evaluadas sobre la variable de respuesta (cuantitativa) equivalente al porcentaje de inhibición microbiana, para cada cepa bacteriana, comparada con respecto al control de crecimiento microbiano. Los resultados de actividad antimicrobiana se expresaron como la media aritmética, más o menos una desviación estándar de la media y un límite de confianza del 95 %. Se calculó la Concentración Mínima Inhibitoria del 50 % de la población (CMI₅₀) y se expresó en μ g/mL. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software Prims Graphpad versión 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Se realizó un análisis de varianza de una

vía (ANOVA) seguido de un post test de Tukey para comparaciones múltiples, el cual permitió comparar los valores medios obtenidos, teniendo en cuenta el error asociado. En todos los casos, un valor $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$), y la igualdad de varianzas con la prueba de Levene ($p > 0,05$). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Resultados

Homogenización y fraccionamiento de la secreción mucosa

Se recolectaron 100 mL de secreción mucosa con una concentración de proteínas de $1322 \pm 57,3$ $\mu\text{g/mL}$.

La secreción mucosa homogenizada se purificó usando Sephadex (G-25) con la finalidad de eliminar sales e impurezas presentes en la secreción y con el fin de conservar la mayor cantidad de proteínas y péptidos de esta, como se puede evidenciar en la [Figura 2](#).

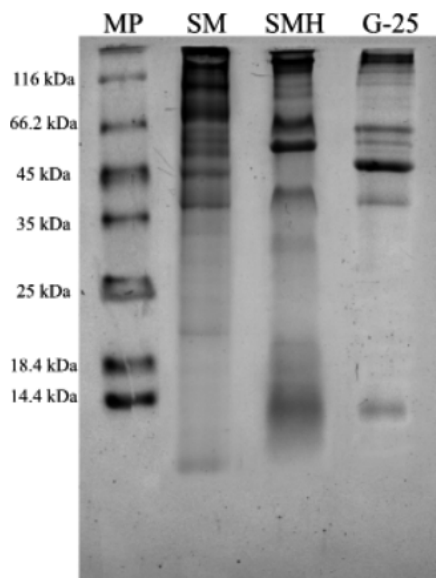


Figura 2. Evaluación comparativa por electroforesis SDS-PAGE de las proteínas/péptidos recuperados. MP: Marcador de peso molecular SM: Secreción mucosa; SMH: Secreción mucosa homogenizada; G-25: Secreción mucosa purificada con Sephadex G-25.

Las fracciones de la secreción mucosa obtenidas por HPLC (F-01 a F-05) fueron analizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF. Los resultados muestran que, en la fracción F-01, se identifica una característica de relación masa/carga (m/z) correspondiente a 2145,237 Da $[\text{M}+\text{H}]^+$; en la fracción F-02, cuatro señales (m/z) correspondieron a 1060,204 Da $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1609,496 Da $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1791,502 Da $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 2145,43 Da $[\text{M}+\text{H}]^+$; en la fracción F-03 se determinaron tres señales (m/z) de 1090,684 Da $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1741,245 Da $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 2146,388 Da $[\text{M}+\text{H}]^+$; y para las fracciones F-04 y F-05, ninguna señal fue observada.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

El efecto antimicrobiano se evaluó, inicialmente, para la secreción mucosa homogenizada (A) y la secreción mucosa semi-purificada por Sephadex G-25 (B) sobre los microorganismos de estudio. Estos resultados mostraron una mayor actividad biológica sobre *S. aureus* CMPUJ 015, con un porcentaje de inhibición del $34,11 \pm 3,76$ % y $46,25 \pm 4,56$ %, respectivamente, a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ ([Tabla 1](#)). Lo anterior permite inferir que el tratamiento de la secreción mucosa por Sephadex G-25 incrementó el efecto antimicrobiano observado.

En la última etapa, las fracciones separadas por RP-HPLC fueron evaluadas a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ ([Tabla 2](#)), evidenciando, una vez más, un mayor efecto inhibitorio sobre *S. aureus* CMPUJ 015 en comparación con los demás microorganismos. De las fracciones evaluadas, la fracción 01 (F-01) presentó el mejor efecto antimicrobiano frente a *S. aureus* CMPUJ 015 con una CMI_{50} de 628,6 $\mu\text{g/mL}$ ([Tabla 3](#)).

Con respecto a *E. coli* ATCC 25922, un mayor porcentaje de inhibición fue observado con la fracción F-03 ($30,01 \pm 2,04$ %) comparado con la secreción semi-purificada ($26,51 \pm 0,76$ %); no obstante, esta diferencia no fue significativa. Un resultado similar fue observado para el caso de *P. aeruginosa* ATCC 27853, cuyo efecto inhibitorio con las fracciones cromatográficas fue menor al obtenido con la secreción purificada ([Tablas 2 y 3](#)).

Evaluación de la actividad antimicrobiana de fracciones semi-purificadas aisladas de la secreción mucosa de *Achatina fulica* frente a diferentes microorganismos

Tabla 1. Porcentaje de inhibición de diferentes microorganismos al ser tratados con secreción mucosa homogenizada (A), secreción mucosa homogenizada purificada con Sephadex G-25 (B).

Concentración µg/ mL	<i>S. aureus</i> CMPUJ015		<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	
	A	B	A	B	A	B
1000	34,11 ± 3,76 ^c	46,25 ± 4,56 ^d	28,43 ± 3,68 ^c	26,51 ± 0,76 ^c	21,26 ± 3,77 ^c	17,47 ± 4,35 ^{bc}
500	19,94 ± 5,33 ^{ab}	24,59 ± 2,96 ^b	15,81 ± 3,49 ^b	12,41 ± 3,13 ^b	14,79 ± 4,14 ^{bc}	9,76 ± 2,23 ^b
250	14,78 ± 4,40 ^a	20,18 ± 5,67 ^{ab}	11,64 ± 2,69 ^b	5,49 ± 0,77 ^a	12,55 ± 1,44 ^b	4,82 ± 2,39 ^a

Nota: todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados corresponden a la media de tres valores ± desviación estándar. Las letras en el superíndice indican diferencias significativas para cada grupo de datos de un mismo microorganismo ($p < 0,05$).

Tabla 2. Porcentaje de inhibición de diferentes microorganismos al ser tratados con las fracciones obtenidas mediante RP-HPLC a una concentración 1000 µg/mL.

Fracción	<i>S. aureus</i> CMPUJ 015	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
F-01	62,41 ± 2,83 ^d	14,87 ± 1,60 ^b	1,70 ± 0,74 ^a
F-02	31,49 ± 2,66 ^c	21,33 ± 2,02 ^b	4,47 ± 0,81 ^a
F-03	34,87 ± 1,97 ^c	30,01 ± 2,04 ^c	14,92 ± 2,22 ^b
F-04	10,4 ± 1,06 ^b	14,52 ± 0,65 ^b	6,37 ± 1,1 ^a
F-05	11,04 ± 2,21 ^b	10,97 ± 0,51 ^b	1,12 ± 0,37 ^a

Nota: los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados son la media de tres valores ± desviación estándar. Las letras en el superíndice indican diferencias significativas entre las medias del conjunto de datos ($p < 0,05$).

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de las fracciones purificadas por RP-HPLC frente a *S. aureus* CMPUJ 015.

Concentración (µg/ mL)	F-01	F-02	F-03	F-04	F-05
1000	65,06 ± 3,07 ^a	34,57 ± 4,57 ^b	39,11 ± 3,55 ^b	13,92 ± 3,06 ^c	13,09 ± 2,38 ^c
500	40,39 ± 2,41 ^b	34,07 ± 5,60 ^b	33,46 ± 2,20 ^b	11,51 ± 2,20 ^c	10,24 ± 1,83 ^c
250	39,16 ± 4,01 ^b	30,96 ± 7,20 ^b	32,97 ± 2,52 ^b	9,42 ± 2,93 ^c	8,03 ± 2,66 ^c
125	32,61 ± 6,04 ^b	31,17 ± 6,80 ^b	25,41 ± 5,12 ^b	7,28 ± 2,50 ^c	7,01 ± 1,99 ^c

Nota: los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados son la media de tres valores ± desviación estándar. Las letras en el superíndice indican diferencias significativas entre las medias de cada grupo de datos ($p < 0,05$).

Discusión

La secreción mucosa tiene diferentes componentes biológicos, entre ellos, carbohidratos, proteínas, ácido urónico, ácidos grasos y, en menor proporción, moléculas inorgánicas²⁸. En otros estudios realizados sobre *A. fulica* se ha demostrado que la actividad biológica antimicrobiana está ligada a la presencia principalmente de proteínas³³. Por esta razón, y debido a la falta de información respecto a los métodos de homogenización en este tipo de muestras, se realizó una comparación entre las dos metodologías conocidas^{29,33}, con lo cual se logró determinar que, la metodología implementada por Zhong²⁹, con algunas modificaciones empleando inhibidores de proteasas, fue la que

mostró la mayor recuperación de péptidos/proteínas en comparación con los otros métodos evaluados. Por tal razón se seleccionó estas condiciones para la subsiguiente obtención del material proteico de la secreción mucosa. Adicionalmente, en el caso particular de este estudio no se usaron solventes orgánicos en la extracción de la secreción, ya que se buscó evitar que estos causaran interferencias en los ensayos posteriores de actividad biológica³⁹.

Los ensayos biológicos de la secreción mucosa demostraron una vez más, tener efecto inhibitorio sobre cada uno de los microorganismos seleccionados para el estudio, esto soporta los hallazgos reportados

previamente por nuestro grupo de investigación en bioquímica y microbiología (GIBIM) de la Universidad Industrial de Santander²⁸. Por tanto, una separación/fraccionamiento guiado por bioensayo fue aplicado a la secreción mucosa con el fin de identificar los posibles compuestos candidatos con actividad biológica. Por medio de cromatografía de exclusión de tamaño se llevó a cabo un proceso de purificación y desalinización, el cual se evidencia en el análisis por SDS-PAGE por la clarificación de las bandas (**Figura 2**); y con el incremento del efecto inhibitorio de la secreción mucosa semi-purificada, demostrando que este último está ligado al material proteico presente en la muestra, como ya los han evidenciado diferentes autores^{33,40}.

La secreción mucosa semipurificada se fraccionó mediante RP-HPLC, de las 5 fracciones obtenidas, la fracción F-01 mostró el mejor efecto antimicrobiano contra *S. aureus* CMPUJ 015, siendo un incremento significativo al compararla con la secreción semi-purificada. Algunos estudios, que realizan fraccionamiento mediante RP-HPLC, relacionan un mayor tiempo de retención de los picos obtenidos con una mayor actividad biológica antimicrobiana^{41,42}. Sin embargo, en este trabajo no se evidenció una relación directa entre el tiempo de retención en el fraccionamiento por RP-HPLC y el incremento del efecto antimicrobiano. Es importante destacar que, en un estudio similar que realizó fraccionamiento por RT-HPLC, se observó un patrón similar en el análisis cromatográfico obtenido⁴³; no obstante, en el presente estudio con los parámetros establecidos, se logró una mejor separación de los analitos mayoritarios presentes en la muestra.

Al correlacionar los datos de la evaluación antimicrobiana de las fracciones obtenidas por cromatografía líquida con los espectros de masas, se puede inferir que la biomolécula con una masa molecular de 2145,237 Da $[M+H]^+$ detectada en las fracciones F-01, F-02, F-03, está involucrada con la actividad biológica antimicrobiana. Sin embargo, los resultados mostraron que la fracción F-01 tuvo el mayor efecto antimicrobiano en comparación con las demás fracciones y, además, esta actividad biológica fue incluso mayor que la determinada para la secreción mucosa homogeneizada y pre-purificada por Sephadex contra *S. aureus* (**Tabla 1 y 2**). Esto sugiere que la presencia de otras moléculas biológicas en la secreción pueda interferir negativamente en la actividad biológica, o existe la posibilidad que en la fracción F-01 se encuentren otras moléculas pequeñas que no fueron detectadas por las técnicas de análisis reportadas en

este estudio y que tengan un rol importante en el efecto antimicrobiano.

La secreción mucosa de este molusco posee una gran variedad de compuestos biológicos²⁸; en el trabajo realizado por Iguchi et al.³³, quienes evaluaron las propiedades antimicrobianas de la secreción mucosa previo tratamiento con digestión enzimática tanto de los carbohidratos como de las proteínas, demostraron que la falta de estas últimas en la secreción, correlacionaba con la pérdida del efecto biológico sobre los microorganismos. Por tal razón es muy probable que las propiedades antimicrobianas de la secreción mucosa estén relacionadas con la presencia de proteínas/péptidos como lo han reportado otros autores, quienes han aislado diferentes proteínas y péptidos con este tipo de actividad biológica^{24,27,29,33,44-49}. Las proteínas Achacin^{45,46}, Achatin CRP (C-reactive protein por sus siglas en inglés)⁴⁸ y el péptido Mytimacin-AF²⁹ son las moléculas caracterizadas hasta la fecha. Además, se han encontrado otras proteínas con efecto antimicrobiano contra *Streptococcus mutans* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, con pesos moleculares de 50,81 kDa, 15 kDa, 11,45 kDa, las cuales no han sido caracterizadas en su totalidad²⁴.

En este trabajo se reporta un péptido con una masa molecular equivalente a 2145,237 Da $[M+H]^+$ que probablemente este relacionado con la actividad biológica antimicrobiana en la secreción mucosa. Al comparar nuestros hallazgos con los de E-kobon et al.⁴³, donde identificaron 20 péptidos (< 30 kDa) con efecto anticancerígeno promisorio contra células MCF-7, es probable que la característica de relación m/z encontrada en la fracción F-01 pueden estar asociada con algunos de los péptidos previamente reportados. No obstante, futuros estudios son necesarios para caracterizar esta molécula con el fin de determinar si se trata de un nuevo péptido o uno ya identificado, y adicionalmente determinar su potencial bioactivo y posible mecanismo de acción.

Conclusiones

La secreción mucosa de *A. fulica*, así como sus fracciones semi-purificadas, presentaron actividad antimicrobiana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

La secreción mucosa homogeneizada y la secreción mucosa homogeneizada tratada con Sephadex G-25 tuvieron porcentajes de inhibición de $34,11 \pm 3,76\%$ y $46,25 \pm 4,56\%$, respectivamente, contra *S. aureus*

resistente a metilicina a una concentración de 1000 µg/mL.

Mediante espectrometría de masas, se determinó la presencia de un posible péptido con una masa de 2145,237 Da [M+H] en la fracción F-01, el cual exhibió un efecto antimicrobiano frente a *S. aureus* resistente a metilicina con una CI₅₀ de 628,6 µg/mL.

Contribución de autores

LASL: diseño experimental, concepción y diseño del estudio, recogida, análisis e interpretación de los datos, redacción y revisión de manuscrito.

WH: diseño experimental, análisis e interpretación de los datos, concepción, diseño y supervisión del estudio, redacción y revisión de manuscrito, aprobación final del manuscrito.

NUD: concepción, diseño y supervisión del estudio, redacción y revisión de manuscrito, aprobación final del manuscrito.

Agradecimientos

Los autores agradecen de manera especial el apoyo financiero de Colciencias y la Universidad Industrial de Santander. Además al Grupo de Investigación de Bioquímica y Microbiología (GIBIM) por permitir la ejecución de este trabajo en sus instalaciones.

Consideraciones éticas

Los ejemplares capturados fueron sacrificados siguiendo los lineamientos dado por el ICA (Instituto Colombiano Agropecuario) y el INS (Instituto Nacional de Salud)^{35,36}.

Para la captura de los especímenes no se requiere permiso de recolección de especímenes de especies silvestres de diversidad biológica con fines de investigación no comercial (Decreto No. 1376 de 2013), porque *Achatina fulica* es una especie introducida, perjudicial para la biodiversidad y salud pública, y es considerada una plaga. No obstante, la Universidad Industrial de Santander tiene un “Permiso macro de recolección de especímenes de diversidad biológica”.

Este proyecto obtuvo aval del comité de ética en investigación científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS) mediante el Acta No. 18 del año 2018.

Conflicto de interés

Los autores declaramos no tener conflictos de interés. La entidad financiadora no tuvo ningún vínculo con el diseño del estudio, la recopilación, análisis o interpretación de los datos; ni en la redacción del manuscrito y decisión de publicar los resultados.

Financiación

Este proyecto fue financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS), Proyecto 1102-777-57410 y la Universidad Industrial de Santander (Vicerrectoría de Investigación y Extensión, Fondos 8741, proyecto VIE 2451 y 2499).

Apoyo tecnológico de IA

Para la preparación del manuscrito se utilizaron herramientas de IA tales como Mendeley, SciSpace y ResearchRabbit.

Mendeley: se utilizó para gestionar y organizar las referencias bibliográficas (biblioteca virtual y personal) que se incluyeron en el manuscrito de investigación, así como también como herramienta de búsqueda de bibliografía.

SciSpace: esta herramienta se usó como complemento a las bases de datos consultadas para la investigación (Scopus, Web of Science, google scholar entre otras), particularmente para recopilar con mayor precisión la información que se requería para la investigación.

ResearchRabbit: esta herramienta fue aplicada en la investigación como estrategia para mapear y optimizar la búsqueda de información relacionada con el estudio, complementando de esta manera, la información relacionada a través de las bases de datos anteriormente indicadas.

Referencias

1. OMS. Antimicrobial Resistance, Global Report on Surveillance. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>

2. Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, van Duin D, Clancy CJ. Infectious Diseases Society of America 2023 Guidance on the treatment of antimicrobial resistant gram-negative infections. *Clin Infect Dis*. 2023; ciad428. doi: [10.1093/cid/ciad428](https://doi.org/10.1093/cid/ciad428)
3. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the antimicrobial availability task force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2006; 42(5): 657-668. doi:[10.1086/499819](https://doi.org/10.1086/499819)
4. World Health Organization. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report. Geneva: WHO; 2020.
5. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: No ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infectious Diseases*. 2009; 48: 1-18. doi: [10.1086/595011](https://doi.org/10.1086/595011)
6. WHO. Bacterial Priority Pathogens List, 2024: Bacterial Pathogens of Public Health Importance to Guide, Development and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance. Geneva: WHO; 2024. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>
7. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Bethesda: CDC; 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>
8. Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers*. 2018; 4(1): 1-23. doi: [10.1038/nrdp.2018.33](https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33)
9. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev*. 2018; 31(4). doi: [10.1128/CMR.00020-18](https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18)
10. Ondusko DS, Nolt D. *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Rev*. 2018; 39(6): 287-298. doi: [10.1542/pir.2017-0224](https://doi.org/10.1542/pir.2017-0224)
11. Sarowska J, Futoma-Koloch B, Jama-Kmiecik A, Frej-Madrzak M, Ksiazczyk M, Bugla-Ploskonska G, et al. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: Recent reports. *Gut Pathog*. 2019; 11(1): 1-16. doi:[10.1186/S13099-019-0290-0/TABLES/5](https://doi.org/10.1186/S13099-019-0290-0/TABLES/5)
12. Orrego-Marin CP, Henao-Mejia CP, Cardona-Arias JA. Prevalencia de infección urinaria, uropatógenos y perfil de susceptibilidad antimicrobiana. *Acta Med Colomb*. 2014; 39(4): 352-358.
13. Guerrero-Ceballos DL, Burbano-Rosero EM, Mondragon EI. Characterization of antibiotic-resistant *Escherichia coli* associated with urinary tract infections in Southern Colombia. *Univ Sci*. 2020; 25(3): 463-488. doi: [10.11144/Javeriana.SC25-3.coar](https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC25-3.coar)
14. Gómez-Duarte OG. Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* enteropatógenas en Colombia. *Rev Chilena Infectol*. 2014; 31(5): 577-586. doi: [10.4067/S0716-10182014000500010](https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000500010)
15. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. 2019; 37(1): 177-192. doi: [10.1016/J.BIOTECHADV.2018.11.013](https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2018.11.013)
16. Luján Roca DA. *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta Bioqu Clin Latinoam*. 2014; 48(4): 465-474.
17. OMS. Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. Ginebra: OMS; 2016. Disponible en: <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789241509763>
18. Castañeda Casimiro J, Ortega Roque JA, Venegas Medina AM, Aquino Andrade A, Serafin López J, Estrada Parra S. et al. Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. *Alerg Asma Inmunol Pediatr*. 2009; 18(1): 16-29.
19. Suarez CJ, Kattán JN, Guzmán AM, Villegas MV. Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Infectio*. 2006; 10(2): 85-93.
20. Balandin SV, Ovchinnikova TV. Antimicrobial peptides of invertebrates. Part 1. structure, biosynthesis, and evolution. *Russ J Bioorg Chem*. 2016; 42(3): 229-248. doi: [10.1134/S1068162016030055](https://doi.org/10.1134/S1068162016030055)
21. Sperstad SV, Haug T, Blencke HM, Styrvold OB, Li C, Stensvåg K. Antimicrobial peptides from marine invertebrates: Challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. *Biotechnol Adv*. 2011; 29(5): 519-530. doi: [10.1016/j.biotechadv.2011.05.021](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.021)
22. Gauri SS, Mandal SM, Pati BR, Dey S. Purification and structural characterization of a novel antibacterial peptide from *Bellamyia bengalensis*: Activity against ampicillin and chloramphenicol resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Peptides (NY)*. 2011; 32(4): 691-696. doi: [10.1016/j.peptides.2011.01.014](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.014)

23. Okeniyi FA, Oghenochuko OM, Olawoye SO, Animashahun RA, Adeyonu AG, Akpor OB. Antimicrobial potentials of mucus mucin from different species of giant African land snails on some typed culture pathogenic bacteria. *Asian J Agric Biol.* 2022; 2022(4): 202107294. doi: [10.35495/ajab.2021.07.294](https://doi.org/10.35495/ajab.2021.07.294)
24. Mafranenda DN, Kriswandini IL, Arijani E. Antimicrobial proteins of Snail mucus (*Achatina fulica*) against *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Dent J.* 2014; 47(1): 31-36. doi: [10.20473/j.djmk.v47.11.p31-36](https://doi.org/10.20473/j.djmk.v47.11.p31-36)
25. Zodape GV. A study on presence of bioactive compounds in snail *Achatina fulica*. *J Appl Nat Science.* 2010; 2(2): 266-268. doi: [10.31018/jans.v2i2.133](https://doi.org/10.31018/jans.v2i2.133)
26. Liao NB, Chen SG, Ye XQ, Zhong J, Ye X, Yin X, et al. Structural characterization of a novel glucan from *Achatina fulica* and its antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 2014; 62(11): 2344-2352. doi: [10.1021/jf403896c](https://doi.org/10.1021/jf403896c)
27. Santana WA, Melo CM de, Cardoso JC, Pereira-Filho RN, Rabelo AS, Reis FP, et al. Assessment of Mucous Secretion of *Achatina fulica*. *Int J Morphol.* 2012; 30(2): 365-373. doi: [10.4067/S0717-95022012000200001](https://doi.org/10.4067/S0717-95022012000200001)
28. Pereira AE, Rey A, López JP, Castro JP, Uribe N. Caracterización físico-química y actividad antimicrobiana de la secreción mucosa de *Achatina fulica*. *Salud UIS.* 2016; 48(2): 188-195. doi: <https://doi.org/10.18273/revsal.v48n2-2016003>
29. Zhong J, Wang W, Yang X, Yan X, Liu R. A novel cysteine-rich antimicrobial peptide from the mucus of the snail of *Achatina fulica*. *Peptides.* 2013; 39: 1-5. doi: [10.1016/j.peptides.2012.09.001](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.09.001)
30. Raut SK, Barker GM. *Achatina fulica* Bowdich and other Achatinidae as pests in tropical agriculture. In: Barker GM, ed. *Molluscs as Crop Pests*. Wallingford: CABI Publishing; 2002. 55-114. doi: [10.1079/9780851993201.0055](https://doi.org/10.1079/9780851993201.0055)
31. Instituto Colombiano Agropecuario. Informe especial: Caracol gigante africano. Bogotá: ICA; 2015. <https://www.ica.gov.co/Periodico-Virtual/Prensa/Informe-especial-Caracol-Gigante-Africano.aspx>
32. Ghosh AK, Hirasawa N, Lee YS, Kim YS, Shin KH, Ryu N, et al. Inhibition by acharan sulphate of angiogenesis in experimental inflammation models. *Br J Pharmacol.* 2002; 137(4): 441-448. doi: [10.1038/sj.bjp.0704886](https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704886)
33. Iguchi SM, Aikawa T, Matsumoto JJ. Antibacterial activity of snail mucus mucin. *Comp Biochem Physiol.* 1982; 72(3): 571-574. doi: [10.1016/0300-9629\(82\)90123-2](https://doi.org/10.1016/0300-9629(82)90123-2)
34. Kanzawa N, Shintani S, Ohta K, Kitajima S, Ehara T, Kobayashi H, et al. Achacin induces cell death in HeLa cells through two different mechanisms. *Arch Biochem Biophys.* 2004; 422(1): 103-109. doi: [10.1016/j.abb.2003.12.007](https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.12.007)
35. Instituto Colombiano Agropecuario. Recomendaciones del ICA para prevención, manejo y control del caracol gigante africano. Bogotá: ICA; 2021. Disponible en: <https://www.ica.gov.co/noticias/recomendaciones-del-icapara-prevencion-manejo-y>
36. Instituto Nacional de Salud, Grupo de Riesgos en inocuidad de alimentos y plaguicidas. Concepto científico sobre consumo de caracol gigante africano y su implicación en salud. Bogotá: INS; 2016. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/Direcciones/Vigilancia/Publicaciones%20ERIA%20y%20Plaguicidas/CONCEPTO%20CARACOL%20AFRICANO.pdf>
37. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259): 680-685. doi: [10.1038/227680a0](https://doi.org/10.1038/227680a0)
38. Cruz J, Flórez J, Torres R, Uiriquiza M, Gutiérrez JA, Guzmán F, et al. Antimicrobial activity of a new synthetic peptide loaded in polylactic acid or poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli O157:H7* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Nanotechnology.* 2017; 28(13): 135102. doi: [10.1088/1361-6528/aa5f63](https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa5f63)
39. Das PPG, Bhattacharyya B, Bhagawati S, Nath DJ, Sarmah K. Methods of extraction of mucin from giant african snail *Achatina fulica* BOWDICH. *Indian J Entomology.* 2022; 84(2): 296-300. doi: [10.55446/IJE.2021.274](https://doi.org/10.55446/IJE.2021.274)
40. Suárez L, Pereira A, Hidalgo W, Uribe N. Antibacterial, antibiofilm and anti-virulence activity of bioactive fractions from mucus secretion of giant African snail *Achatina fulica* against *Staphylococcus aureus* strains. *Antibiotics.* 2021; 10(12). doi: [10.3390/antibiotics10121548](https://doi.org/10.3390/antibiotics10121548)
41. Tang W, Zhang H, Wang L, Qian H. New cationic antimicrobial peptide screened from boiled-dried anchovies by immobilized bacterial membrane liposome chromatography. *J Agric Food Chem.* 2014; 62: 1564-1571. doi: [10.1021/jf4052286](https://doi.org/10.1021/jf4052286)

42. Ma B, Guo Y, Fu X, Jin Y. Identification and antimicrobial mechanisms of a novel peptide derived from egg white ovotransferrin hydrolysates. *LWT*. 2020; 131. doi: [10.1016/J.LWT.2020.109720](https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.109720)
43. E-Kobon T, Thongararm P, Roytrakul S, Meesuk L, Chumnanpuen P. Prediction of anticancer peptides against MCF-7 breast cancer cells from the peptidomes of *Achatina fulica* mucus fractions. *Comput Struct Biotechnol J*. 2016; 14: 49-57. doi: [10.1016/j.csbj.2015.11.005](https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.11.005)
44. Kubota Y, Watanabe Y, Tamiya T, Tsuchiya T, Matsumoto JJ. Purification and characterization of an antibacterial factor from snail mucus. *Comp Biochem Physiol*. 1985; 82(2): 345-348.
45. Ogawa M, Nakamura S, Atsuchi T, Tamiya T, Tsuchiya T, Nakai S. Macromolecular antimicrobial glycoprotein, achacin, expressed in a methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEBS Lett*. 1999; 448(1): 41-44. doi: [10.1016/S0014-5793\(99\)00327-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00327-0)
46. Ehara T, Kitajima S, Kanzawa N, Tamiya T, Tsuchiya T. Antimicrobial action of achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity. *FEBS Lett*. 2002; 531(3): 509-512. doi: [10.1016/S0014-5793\(02\)03608-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03608-6)
47. Obara K, Otsuka-Fuchino H, Sattayasai N, Nonomura Y, Tsuchiya T, Tamiya T. Molecular cloning of the antibacterial protein of the giant African snail, *Achatina fulica* Férussac. *Eur J Biochem*. 1992; 209(1): 1-6. doi: [10.1111/j.1432-1033.1992.tb17254.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17254.x)
48. Mukherjee S, Barman S, Sarkar S, Mandal NC, Bhattacharya S. Antibacterial activity of *Achatina* CRP and its mechanism of action. *Indian J Exp Biol*. 2014; 52(7): 692-704.
49. Berniyanti T, Waskito EB, Suwarno S. Biochemical characterization of an antibacterial glycoprotein from *Achatina fulica* ferussac snail mucus local isolate and their implication on bacterial dental infection. *Indones J Biotechnol*. 2007; 12(1): 943-951. doi: [10.22146/ijbiotech.7765](https://doi.org/10.22146/ijbiotech.7765)