

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



SÍNTESIS Y ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y  
ANTIBIOPELÍCULA DE MATERIALES BIOPOLIMERO-PLATA

Por

LBG JESÚS AUGUSTO VÁZQUEZ RODRÍGUEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con  
Orientación en Microbiología Aplicada

Octubre, 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



SÍNTESIS Y ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y  
ANTIBIOPELÍCULA DE MATERIALES BIOPOLIMERO-PLATA

Por

LBG JESÚS AUGUSTO VÁZQUEZ RODRÍGUEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con  
Orientación en Microbiología Aplicada

Octubre, 2016

**SÍNTESIS Y ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y  
ANTIBIOPELÍCULA DE MATERIALES BIOPOLIMERO-PLATA**

Revisión de la tesis:

---

Dr. José Rubén Morones Ramírez

Director de Tesis

---

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez

Comité Tutorial

---

Dra. María Teresa Garza González

Comité Tutorial

---

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos

Comité Tutorial

**SÍNTESIS Y ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y  
ANTIBIOPELÍCULA DE MATERIALES BIOPOLIMERO-PLATA**

Aprobación de la tesis:

---

Dr. José Rubén Morones Ramírez

Director de Tesis

---

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez

Comité Tutorial

---

Dra. María Teresa Garza González

Comité Tutorial

---

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos

Comité Tutorial

---

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez

Subdirectora de Estudios de Posgrado

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a todas las personas que estuvieron implicadas en mi formación como maestro en ciencias durante estos 2 años, gracias a ustedes he crecido como persona y profesionalista.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme la beca y los medios necesarios para la realización de mis estudios.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y en especial a la Facultad de Ciencias Químicas por otorgar los recursos académicos pertinentes y facilitar el uso de las instalaciones y laboratorios para la realización del trabajo de investigación

Al Dr. Rubén Morones, por creer en mí y darme la oportunidad de desarrollarme personal e intelectualmente en su laboratorio. Por tenerme paciencia en mi camino de aprendizaje científico, sin duda un gran ejemplo a seguir en el mundo de la investigación.

A mi comité tutorial: La Dra. María Teresa Garza González, el Dr. Edgar Allan Blanco Gámez y el Dr. Xristo Zárate Kalfópulos, gracias por sus valiosos comentarios y contribuciones para poder sacar adelante este trabajo.

A mis compañeros de generación: Ceci, Anaíl, Julio y Dani, por permitirme conocerlos y hacer más divertidas las horas de clase.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Javi, Albert, Mario, Paco, Pepi, Dago, Meza, Chuy, Ivan por ayudarme con su opinión, sugerencias y hacer más ameno

el trabajo de laboratorio. A Ximena por apoyarme en los numerosos experimentos realizados y por compartir horas de trabajo y diversión en la campana de flujo.

A mi amiga Elda, por su gran apoyo, enorme comprensión y compañía durante estos 2 años intensos de tesis.

Y por último a mi Familia que siempre ha sido parte crucial de esta historia de crecimiento, gracias por todo su apoyo y por creer en mí en cada paso de mi vida.

## DEDICATORIA

*Este trabajo está dedicado a mi Familia*

*A mis padres: Luz María Rodríguez Arrellano y José Jesús Vázquez Silva.*

*Siempre serán mi modelo a seguir. Por ustedes he logrado salir adelante a lo largo de mi vida. Mis logros y éxitos siempre serán dedicados a ustedes.*

*A mis hermanos: Kathia Melissa Vázquez Rodríguez y Diego Ivan Vázquez Rodríguez*

*En mi camino siempre contarán con mi apoyo condicional.*

*Con todo mi amor su hijo y hermano Jesús Augusto Vázquez Rodríguez*

## NOMENCLATURA

%	Porcentaje
°C	Grados Centígrados
µL	Microlitro
Ag	Plata
ANOVA	Análisis de varianza
ATCC	American Type Culture Collection
Cm <sup>1</sup>	Centímetros a la menos uno
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
mg/mL	miligramosramos por mililitro
<i>E. coli,</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>P. aeruginosa,</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae,</i>
<i>S. aureus,</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermis</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
LB	Luria-Bertani
YM	Yeast and Mold
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
nM	nanomolar
TSB	Trypticase soy broth
ppm	Partes por millón
EPS	Exopolisacárido



EPS-AgNPS	Complejo exopolisacarido-nanoparticulas de plata
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
<i>R.glutinis</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
<i>R.mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
HAV	Hepatitis A Virus
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ATP	Adenosine Triphosphate
μL	microlitros
μg	microgramos
μM	micromolar
μg/mL	microgramos por mililitro
HCl	Ácido Clorhídrico
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
KCl	Cloruro de potasio
dNTPS	Deoxynucleotide
PCR	Polymerase Chain Reaction
SEM	Scanning Electron Microscope
OD	Optical Density
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy

## RESUMEN

Jesús Augusto Vázquez Rodríguez  
2016

**Fecha de graduación:** Diciembre,

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología  
Aplicada**

**Título del estudio:** Síntesis y análisis de las propiedades antimicrobianas y antibiopelícula de materiales biopolímero-plata.

**Área de estudio:** Desarrollo de agentes antimicrobianos

**Número de páginas:** 76

El desarrollo de antibióticos se ha enfocado en inhibir el crecimiento de bacterias a nivel individual, sin tomar en cuenta los mecanismos de resistencia emergentes a nivel de biopelículas. Aproximadamente el 80 % de las infecciones microbianas en humanos son causadas por biopelículas bacterianas, por lo cual es necesario identificar moléculas que sean capaces de inhibir el crecimiento bacteriano en forma platótica como en forma de biopelícula.

En el presente trabajo de investigación se realizó una caracterización parcial del exopolisacárido producido por la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* UANL -001L

así como la evaluación antimicrobiana del mismo. Específicamente, se analizó la actividad antibacteriana y antibiopelícula contra las cepas bacterianas *E. coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Una vez determinadas las concentraciones efectivas contra estos microorganismos, se prosiguió a funcionalizar el polímero con nanopartículas de plata. Una vez sintetizadas y caracterizadas las nanopartículas de plata se encontró que la actividad antimicrobiana del híbrido polímero/nanopartículas de plata fue potenciada de forma significativa.

Por último se puede concluir que los productos obtenidos en este trabajo de investigación presentan propiedades potenciales para desarrollar nuevos agentes antimicrobianos.

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Problemática de la resistencia antimicrobiana .....	5
1.2 Biopelículas y mecanismos de resistencia antimicrobiana .....	6
2. ANTECEDENTES .....	8
2.1 Búsqueda de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana .....	8
2.2 Exopolisacáridos y su actividad antimicrobiana .....	9
2.3 Producción de exopolisacáridos por <i>Rhodotorula sp.</i> .....	15
2.4 Síntesis de nanopartículas de plata .....	17
2.5 Funcionalización de exopolisacáridos con nanopartículas de plata. ....	19
3. Hipótesis y objetivos.....	22
4. METODOLOGÍA.....	23
4.1 Material, reactivos y equipo utilizado. ....	23
4.2 Microorganismos y condiciones de cultivo. ....	24
4.3 Caracterización molecular de la cepa <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UANL 001L .....	25
4.4 Cinética de Crecimiento de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UANL-001L .....	28
4.5 Cinética de producción de exopolisacárido producido por <i>Rhodotorula mucilaginosa.</i> ....	29
4.6 Extracción y cuantificación de exopolisacárido .....	29
4.7 Producción de stocks de EPS para las diferentes pruebas y determinaciones.....	30
4.8 Caracterización del exopolisacárido por espectroscopia Infrarroja FT-IR ...	31
4.9 Caracterización morfológica del EPS por microscopia electrónica de barrido .....	31
4.10 Biosíntesis de nanopartículas de plata.....	31
4.11 Análisis de espectroscopia UV-Visible .....	32
4.12 Calculo teórico de la concentración molar de nanopartículas de plata .....	33
4.13 Recubrimiento del exopolisacárido con nanopartículas de plata.....	34
4.14 Caracterización del composito EPS-AgNPS por espectroscopia Infrarroja FT-IR.....	34
4.15 Pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano con el exopolisacárido o el composito Ag-NPS.....	35

4.16 Pruebas de inhibición de biopelícula con exopolisacárido y el complejo EPS-AgNPS .....	36
4.16 Análisis estadístico.....	38
4.17 Manejo y disposición de residuos .....	38
5. RESULTADOS .....	39
5.1 Curva de crecimiento y cinética de producción del exopolisacárido .....	39
5.2 Caracterización molecular de la cepa <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UANL 001L .....	41
5.3 Microscopia electrónica de barrido.....	43
5.4 Caracterización del EPS por espectroscopia infrarroja FT-IR.....	43
5.5 Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata .....	44
5.6 Calculo de la concentración teórica de nanopartículas de plata .....	45
5.7 Análisis de espectroscopia infrarroja FT-IR del complejo EPS-AgNPS .....	46
5.8 Pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano con exopolisacárido .....	47
5.9 Pruebas de inhibición de la formación de biopelícula utilizando exopolisacárido. ....	49
5.10 Pruebas de inhibición bacteriana con EPS-AgNPS .....	51
5.11 Pruebas de inhibición de formación de biopelícula con el composito EPS-AgNPS .....	52
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	54
6.1 Cinética de crecimiento y producción de Exopolisacárido de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UANL-001L .....	54
6.2 Identificación molecular de <i>R. mucilaginosa</i> UANL-001L.....	55
6.3 Caracterización del Exopolisacárido por SEM y FT-IR.....	56
6.4 Síntesis y caracterización de las nanopartículas de plata.....	57
6.5 Análisis de la actividad antibacteriana y antibiopelícula del exopolisacárido producido por <i>R. mucilaginosa</i> UANL-001L.....	58
6.6 Análisis de la actividad antibacteriana y antibiopelícula de EPS-AgNPS .....	63
7. CONCLUSIONES.....	66
8. PERSPECTIVAS.....	67
9. MATERIAL SUPLEMENTARIO .....	68
10. BIBLIOGRAFIA .....	69

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de resistencia. a) Nivel comunidad b) nivel celular[6].....	8
Figura 2. Mecanismos de regulación antibiopelícula. A) Propiedad antiadhesiva B) Bloqueo de receptores C) Inhibición génica .....	13
Figura 3. Estructura del manano extracelular producido por <i>R.mucilaginosa</i> YR-2 [32] .....	16
Figura 4. Ejemplo de síntesis de nanoparticulas de plata (41). .....	18
Figura 5.Principales mecanismos de acción antimicrobianosde AgNPS (43) .....	19
Figura 6. Principales estrategias para la síntesis de híbridos polímero/AgNPS con actividad antimicrobiana (46).....	20
Figura 7. Cinética de crecimiento de <i>R. mucilaginosa</i> en medio mineral. A) UFC/mL B) OD 600 nm .....	39
Figura 8. Cinética de producción de exopolisacárido en medio mineral.....	40
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Amplicón de la región ITS1-ITS2.....	41
Figura 10.Árbol filogenético de máxima similitud. Representa la relación genética entre diversos miembros del género <i>Rhodotorula sp.</i> .....	42
Figura 11.Microscopía Electrónica de Barrido del exopolisacárido producido por <i>R.mucilaginosa</i> .....	43
Figura 12. Espectroscopia FT-IR del exopolisacárido producido por <i>R.mucilaginosa</i> UANL-001L.....	44
Figura 13. Espectro UV-visible de AgNPS sintetizadas con EPS.....	45
Figura 14. Espectroscopía FT-IR del composito EPS-AgNPS .....	46
Figura 15. Efecto antibacteriano del EPS de <i>R. mucilaginosa</i> UANL-001L. A) <i>E. coli</i> ATCC 11229 B) <i>S. aureus</i> ATCC 63538 C) <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 .....	48
Figura 16. Efecto inhibitorio del EPS sobre la formación de biopelícula. A) <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853 B) <i>S.aureus</i> ATCC 6538 C) <i>E.coli</i> ATCC 11229 .....	50
Figura 17. Efecto inhibitorio de EPS-AgNPS sobre el crecimiento bacteriano. A) <i>E. coli</i> ATCC11229 B) <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 C) <i>S.aureus</i> ATCC 6538 ....	51
Figura 18. Imhibición de formación de biopelícula utilizando EPS-AgNPS. A) <i>E. coli</i> ATCC11229 B) <i>S.aureus</i> ATCC6538 C) <i>P.aeruginosa</i> ATCC27853.....	53

## LISTA DE TABLAS Y ECUACIONES

Tabla 1. Exopolisacáridos con actividad antimicrobiana.....	12
Ecuación 1. Número de átomos de plata por nanopartícula esférica.....	32
Ecuación 2.Cálculo de la concentración molar de nanopartículas de plata.....	33

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Problemática de la resistencia antimicrobiana

Los antibióticos son unos de los descubrimientos más importantes en la historia de la humanidad, ya que fueron vitales para el incremento de la esperanza de vida en el siglo XX. Estos compuestos han salvado millones de vidas desde el descubrimiento de la penicilina en el año 1928 por Alexander Fleming. Aproximadamente 12 años después se presentaron los primeros casos de resistencia bacteriana para este antibiótico[1, 2].

Lo anterior ilustra como el introducir una presión selectiva (antibiótico) sobre una comunidad bacteriana, ocasiona que las bacterias con mayor adaptación (resistencia) sobrevivan heredando sus caracteres. Por lo tanto el uso indiscriminado de antibióticos y antimicrobianos ha incrementado de forma acelerada la resistencia antimicrobiana.

La resistencia antimicrobiana es una de las mayores amenazas para la salud y la economía a nivel mundial. Esta reduce dramáticamente la probabilidad de tratar efectivamente las infecciones, aumentando la morbilidad y mortalidad asociada con enfermedades bacterianas. En estudios recientes se calcula que aproximadamente 700,000 personas mueren cada año a nivel mundial debido a infecciones por bacterias resistentes. Aunado a las pérdidas humanas, estudios realizados por el Sistema de Salud de los Estados Unidos calculan que los costos anuales provocados por las bacterias resistentes oscilan entre 21000-34000 millones de dólares[3].



## **1.2 Biopelículas y mecanismos de resistencia antimicrobiana**

Del total de infecciones bacterianas en humanos, se estima que aproximadamente el 80% se deben a biopelículas bacterianas y el resto a bacterias en forma plantónica [4]. Adicionalmente, el 50% de las infecciones nosocomiales, se deben a dispositivos médicos infectados con biopelículas bacterianas[4]. Cabe resaltar, que la resistencia a los antibióticos aumenta en un orden de 100-1000 veces en las biopelículas, lo cual dificulta el tratamiento de estas infecciones[5]. Generalmente, cuando las bacterias se encuentran en grandes comunidades son capaces de soportar mayor cantidad de estrés ambiental que sus contrapartes individuales, denominándose a este efecto como resistencia a nivel comunidad[6].

Considerando lo anterior, es importante destacar que los estudios desarrollados para el descubrimiento de nuevos antibióticos han sido realizados únicamente en cultivos plantónicos bacterianos sin tomar en cuenta la resistencia en las biopelículas. Las investigaciones se han enfocado principalmente en desarrollar tratamientos que puedan nulificar los siguientes mecanismos de resistencia a nivel celular[7] (Figura 1):

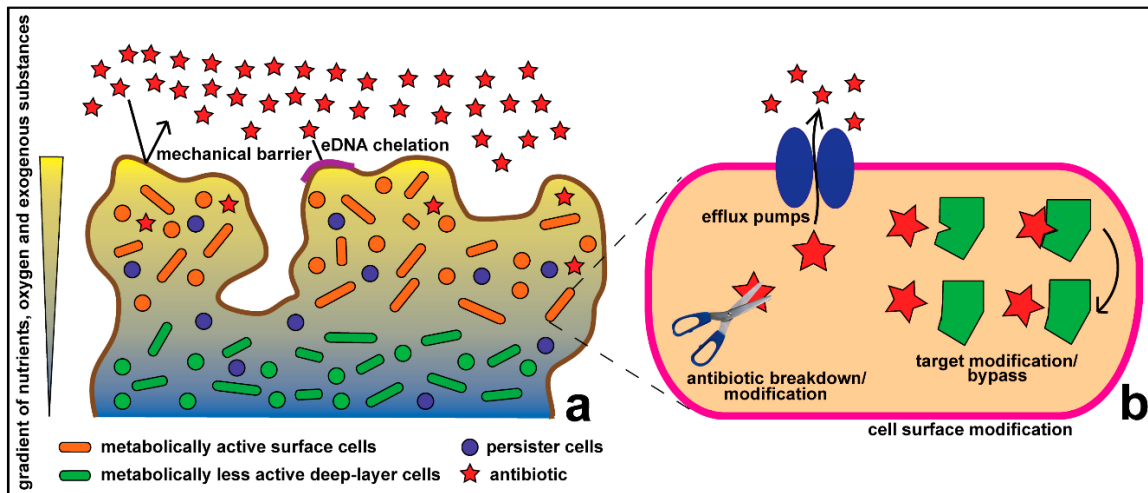
- Inactivación del antibiótico vía hidrólisis.
- Modificación de grupos funcionales del antibiótico
- Expulsión del antibiótico por transportadores transmembranales

Cabe destacar, que los mecanismos de resistencia propios de una biopelícula actúan de forma sinérgica con los mecanismos a nivel celular, provocando un mayor nivel de persistencia bacteriana.

Las biopelículas son comunidades bacterianas embebidas en una matriz polimérica, en la cual se forman microambientes y existe un intercambio dinámico de moléculas. Al estar en presencia de antibióticos, las células responden de la siguiente forma[6]:

- Existe una población fenotípicamente heterogénea por lo tanto responden metabólicamente diferente a los antibióticos.
- Presencia de células persistentes con metabolismo basal, la mayoría de los antibióticos solo funciona en células en división.
- La matriz polimérica actúa como una barrera de difusión, ocasionando que los antibióticos no se distribuyan homogéneamente (Figura 1).

Por lo tanto es necesario establecer estrategias de investigación encaminadas al desarrollo de antimicrobianos que sean capaces de atacar y contrarrestar el crecimiento bacteriano forma plantónica, como en forma de biopelícula.



**Figura 1. Mecanismos de resistencia. a) Nivel comunidad b) nivel celular[6]**

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Búsqueda de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana

Una de las estrategias con mayor potencial para el descubrimiento de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana es la obtención de compuestos naturales. Debido al desarrollo de nuevas técnicas de cribado, extracción y purificación, el número de compuestos naturales descubiertos hasta la fecha sobrepasa el millón. Del total de compuestos naturales reportados, un 20-25 % presenta actividad biológica y de estos el 10 % ha sido obtenido de fuentes microbianas[8-10].

Generalmente, los microorganismos forman parte de comunidades heterogéneas, donde diferentes especies convergen, exhibiendo entre sus miembros diversos arreglos de interacciones (antagonistas o cooperativas). Debido a la competencia por espacio así como por nutrientes, los microorganismos han desarrollado un complejo arsenal de metabolitos destinados a impedir el crecimiento de sus competidores. Por esta razón los microorganismos representan una fuente

atractiva para para el descubrimientos de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana[11].

Los hongos son capaces de habitar la mayoría de los ecosistemas, presentando adaptaciones para sobrevivir en los mismos y por lo tanto cuentan con características fisiológicas únicas. Al encontrarse extensamente distribuidos, los hongos comparten estrechamente su hábitat con diferentes especies microbianas, por consiguiente han evolucionado para desarrollar metabolitos que sean capaces de modificar su entorno así como controlar el crecimiento de sus vecinos bacterianos. Particularmente las levaduras son capaces de inhibir el crecimiento bacteriano mediante los siguientes mecanismos[12, 13]:

- Competencia por nutrientes
- Cambio de pH bajo la producción de ácidos orgánicos
- Secreción de compuestos antibacterianos (péptidos, moléculas pequeñas y descritos recientemente, los exopolisacáridos).

Para efecto de este proyecto de tesis, se abordará el estudio y caracterización de los exopolisacáridos producidos por la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L. En el apartado siguiente se describirá de forma detallada el potencial de los exopolisacáridos como antimicrobiano.

## **2.2 Exopolisacáridos y su actividad antimicrobiana**

Los exopolisacáridos son polímeros conformados por subunidades de monosacáridos. Estos polímeros presentan una gran diversidad de funciones biológicas las cuales están estrechamente relacionadas a la estructura del

polisacárido. Los EPS son secretados y se pueden encontrar en 2 conformaciones principales: en forma de cápsula (interaccionando fuertemente con la superficie celular) o en forma soluble, siendo liberados al medio externo[14, 15].

Los exopolisacáridos son producidos principalmente cuando las células microbianas se encuentran bajo un estrés ambiental. Debido a lo anterior, se considera a los EPS como un mecanismo de protección contra condiciones ambientales adversas[16].

Recientemente, se han descrito diversos EPS con actividad inhibitoria contra el crecimiento bacteriano y la formación de biopelículas[17-19]. El primer polisacárido microbiano con actividad antimicrobiana fue identificado mientras se estudiaban las interacciones entre cepas uropatógenicas y comensales de *E. coli* en biopelículas in vitro[20]. Valle y colaboradores (2006) encontraron que la biomasa de las biopelículas de la cepa comensal MG1655 era reducida en la presencia de la cepa uropatógena CFT073. El agente inhibitorio fue identificado en el sobrenadante del cultivo, correspondiendo éste al polisacárido de la cápsula extracelular grupo II de la cepa uropatógena CFT073. Además en estudios posteriores, se encontró que el mismo polisacárido era capaz de inhibir la formación de biopelículas de las siguientes bacterias: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *Enterococcus faecalis*[21]. Esta investigación dio pauta para que científicos de otras instituciones se encaminaran en la búsqueda de exopolisacáridos con actividad antimicrobiana, cabe destacar que este tipo de biomolécula cuenta con una potencial aplicación en la industria de

la salud, de alimentos y de energía principalmente, donde el crecimiento bacteriano causa estragos económicos continuamente.

En la siguiente tabla se ilustra de manera resumida, exopolisacáridos antimicrobianos que han sido identificados exitosamente:

EPS	Especie y cepa	Bacteria inhibida	Referencia
r-EPS	<i>Lactobacillus acidophilus</i> A4	<i>S.aureus</i>	Kavita et al., 2014
B4-EPS1	<i>Arthrobacter</i> sp. B4	<i>S.aureus</i> , <i>E.coli</i>	Wang et al., 2015
EPS1-T14	<i>Bacillus licheniformis</i> T14	<i>S.aureus</i>	Kanmani et al., 2011
EPS A101	<i>Vibrio</i> SP QY101	<i>E.coli</i> , <i>P.aeruginosa</i>	Kim et al., 2009
EPS273	<i>Pseudomonas Stutzeri</i> 273	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Li et al., 2015
K2	<i>E. coli</i> CFT073	<i>E.coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>S.aureus</i>	Spanò et al., 2016
-	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	<i>S.aureus</i> , <i>P.aeruginosa</i>	Kanmani et al., 2013
-	<i>Lactobacillus plantarum</i> YW32	<i>P.aeruginosa</i> , <i>S.aureus</i>	Jiang et al., 2011
-	<i>Streptococcus phocae</i> PI80	<i>P.aeruginosa</i>	Wu et al., 2016
-	<i>E.faecium</i> MC13	<i>P.aeruginosa</i> , <i>S.aureus</i>	Valle et al., 2006

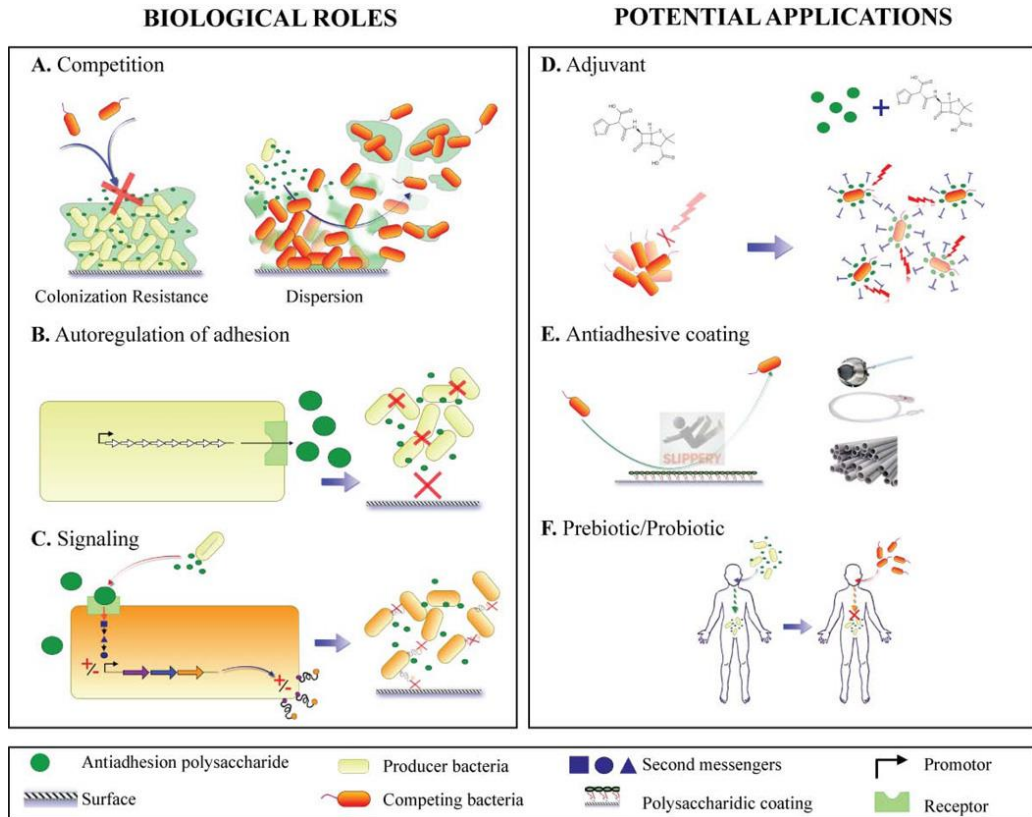
**Tabla 1. Exopolisacáridos con actividad antimicrobiana contra bacterias de interés.**

La mayoría de los EPS que han sido descritos son capaces de inhibir la formación de biopelículas pero no cuentan con actividad biocida. Cabe destacar que regularmente la actividad inhibitoria es efectiva contra un amplio espectro de especies bacterianas, lo cual sugiere que estas moléculas juegan un papel regulatorio en las comunidades microbianas heterogéneas y en la exclusión de nicho[22-27]

Actualmente no se conoce de manera exacta el mecanismo de acción por el cual los exopolisacáridos evitan la formación de biopelículas bacterianas, no obstante diversos autores han sugerido los siguientes mecanismos [18, 19] (Figura 2):

- Modificación de superficies abióticas y bióticas. Diversos autores han reportado que los EPS pueden modificar las propiedades de las superficies, ya sea aumentando la hidrofobicidad o cambiando la carga neta. Esto evitaría que las bacterias sean capaces de interactuar y adherirse a las superficies.
- Inhibición de expresión génica. Algunos estudios sugieren que los EPS actúan como moléculas reguladoras pudiendo modificar negativamente la expresión génica de genes fundamentales involucrados en la formación de biopelículas.
- Inhibición competitiva de interacción proteína-carbohidrato. Las lectinas son proteínas capaces de reconocer carbohidratos. En las bacterias, la principal función de las lectinas es facilitar la adhesión a superficies bióticas, por lo tanto estas proteínas juegan un papel importante en la formación de

biopelícula y son esenciales para la colonización e infección de hospederos. Los exopolisacáridos pueden unirse a las lectinas bacterianas, por ende inhibirían la formación de biopelícula-lectina dependiente.



**Figura 2. Mecanismos de regulación antibiopelícula. A) Propiedad antiadhesiva B) Bloqueo de receptores C) Inhibición génica [18]**

Recientemente, se han descrito EPS capaces de inhibir el crecimiento bacteriano. Wu y colaboradores reportan que el exopolisacárido producido por *Bifidobacterium longum* presenta actividad antibacteriana contra *E.coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Bacillus cereus*. Observaron que el EPS inhibía el crecimiento celular pero las células



permanecieron viables al ser subcultivadas, esto indica que el tratamiento con EPS no lisa las células pero afecta su división.

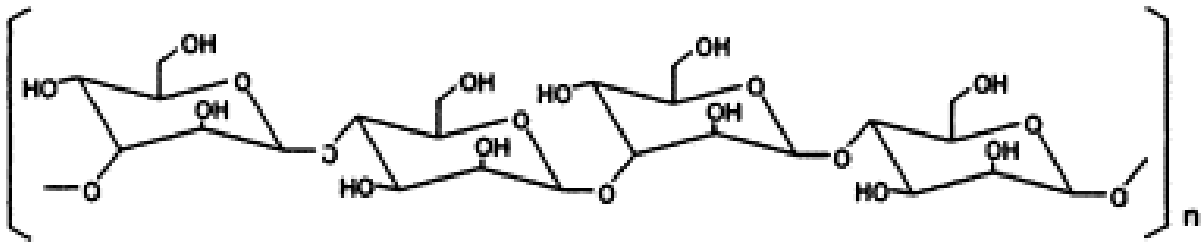
Igualmente se tiene evidencia de que los exopolisacáridos de *Streptomyces virginia* muestran actividad antimicrobiana contra los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listenia monocitogenes*, *E. coli*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Candida utilis*[17]. En este caso el EPS presentó actividad biocida los cual se comprobó examinando la permeabilidad de la membrana y analizando la fuga de proteínas al medio. Esto, podría indicar que posiblemente los exopolisacáridos puedan modificar la pared celular y la membrana citoplasmática, ocasionando lisis celular y distorsión de la división celular.

Cabe resaltar que hasta la fecha no se han reportado exopolisacáridos que presenten tanto la capacidad de inhibir la formación de biopelículas como la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. La búsqueda de EPS con estas capacidades representa un área de oportunidad para la generación de nuevos antimicrobianos.

### 2.3 Producción de exopolisacáridos por *Rhodotorula sp.*

El género *Rhodotorula* corresponde a levaduras unicelulares del phylum *Basidiomycota*. Son organismos saprofitos por lo cual se han aislado de diversos ambientes tales como: aire, suelo, lagos, océanos, frutas etc. Las levaduras de este género se caracterizan por ser organismos aerobios estrictos. Las colonias de estas levaduras presentan una coloración rosada, con una morfología suave, lisas y mucosas. Las células son de forma elipsoide, producen pseudohifa y se reproducen sexualmente. No son organismos nutricionalmente fastidiosos, crecen en la mayoría de los medios y son de rápido crecimiento[28]. Las especies del género *Rhodotorula* se caracterizan por contar con características metabólicas peculiares, tales como la capacidad de producir glicógeno durante la fase exponencial y producir gran cantidad de lípidos, carotenoides y exopolisacáridos durante la fase estacionaria[29].

La levadura *Rhodotorula mucilaginosa* secreta al medio mananos lineales. Elinov y colaboradores reportan que estos exopolisacáridos exhiben una estructura con enlaces alternados  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,4, siendo esto corroborado por Takita con la técnica de 2-D NMR, con lo cual estos autores propusieron una estructura para este manano extracelular[30-32] (Figura 3). Actualmente no se conoce con exactitud la composición de estos polisacáridos pero diversos estudios han caracterizado diferentes EPS provenientes de *R. glutinis*, encontrado que están conformados en su mayoría por D-manosa, D-glucosa, D-galactosa, siendo la manosa el monosacárido más abundante[32].



**Figura 3. Estructura del manano extracelular producido por *R.mucilaginosa* YR-2 [32]**

A continuación se enlistan las actividades biológicas que han sido reportadas para estos exopolisacáridos:

- Reducción de los niveles de colinesterasa en suero e inhibición de crecimiento tumoral en ratas alimentadas con EPS.
- Disminución de los niveles de colesterol en estudios realizados en ratas.
- Estimulación de células formadoras de anticuerpos.
- Capacidad de inhibir el crecimiento de líneas celulares cancerígenas e inhibir la infección por el virus HAV.
- Actividad antioxidante[32-38].

En estudios realizados en la Universidad Autónoma de Nuevo León por el grupo de investigación de la Dra. Garza González y el Dr. Rubén Morones se aisló una cepa de *Rhodotorula mucilaginosa* proveniente del Rio Pesquería en el estado de Nuevo León México. Se extrajo y cuantificó el EPS producido por esta cepa, encontrándose que los niveles de producción aumentaban al exponer a la

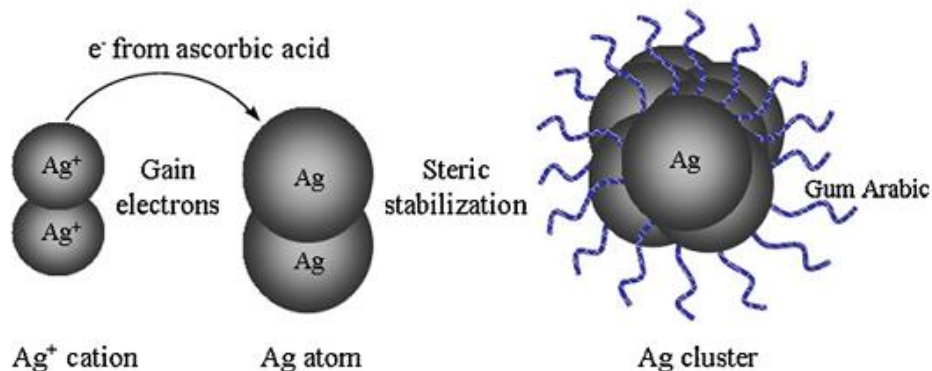
levadura a concentraciones elevadas de metales pesados. Por último se caracterizó parcialmente el EPS encontrándose que poseía la capacidad de adsorber colorantes, por lo cual se sugirió su uso como un tratamiento de bioremediación[39].

Siguiendo la misma línea de investigación, Barbosa en el año 2013 como parte de sus estudios de posgrado, caracterizó parcialmente la capacidad antimicrobiana de los EPS contra cepas de *E. coli*, dando pauta a futuras investigaciones[40].

Cabe resaltar que a pesar de la existencia de múltiples investigaciones enfocadas a caracterizar las funciones de los EPS producidos por *Rhodotorula sp.*, no existe evidencia en la literatura de las funciones antimicrobiana de los mismos.

#### **2.4 Síntesis de nanopartículas de plata**

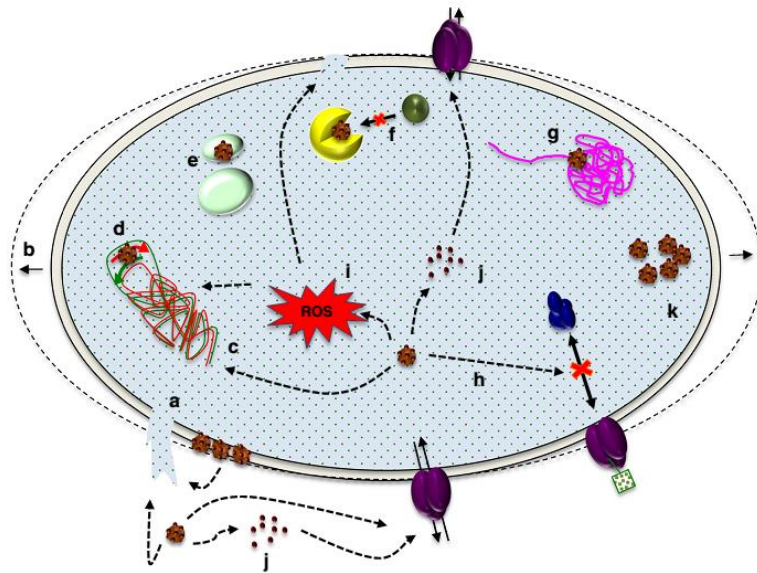
Uno de los métodos más simples para la preparación de nanopartículas de plata es la reducción química. La formación de las nanopartículas se da principalmente cuando una sal de plata es reducida en presencia de un agente químico, por consiguiente se forman átomos cerivalentes, estos actúan como centro de nucleación dando lugar a un agrupamiento de átomos que tomaran un mayor tamaño y formas poliédricas más complejas. Para evitar el aglomeramiento es necesario la adición de un agente estabilizante (usualmente polímeros) los cuales se absorben en la superficie de las nanopartículas[41, 42].



**Figura 4. Ejemplo de síntesis de nanopartículas de plata (41).**

El uso del método de reducción química permite obtener coloides monodispersos con una distribución homogénea en el tamaño de partícula. En este tipo de reacciones se utilizan agentes reductores tales como: ácidos orgánicos, alcoholes, polioles, aldehídos y azúcares[43].

Las nanopartículas de plata cuentan con propiedades antimicrobianas de amplio espectro. Debido a esto han sido utilizadas en diferentes aplicaciones tales como vendajes para heridas, catéteres urinarios, ropa, pasta dental y como recubrimiento de equipos[41]. De forma general las nanopartículas actúan de forma sistemática dañando a las células bacterianas mediante los diferentes mecanismos tales como disrupción de la membrana celular, inactivación de enzimas y proteínas, condensación del ADN, pérdida de replicación del ADN, depleción del ATP, desnaturalización proteica, inhibición de la interacción entre ribosomas, acumulación en la célula, generación de especies reactivas, estrés oxidativo y modulación de señales celulares[44].

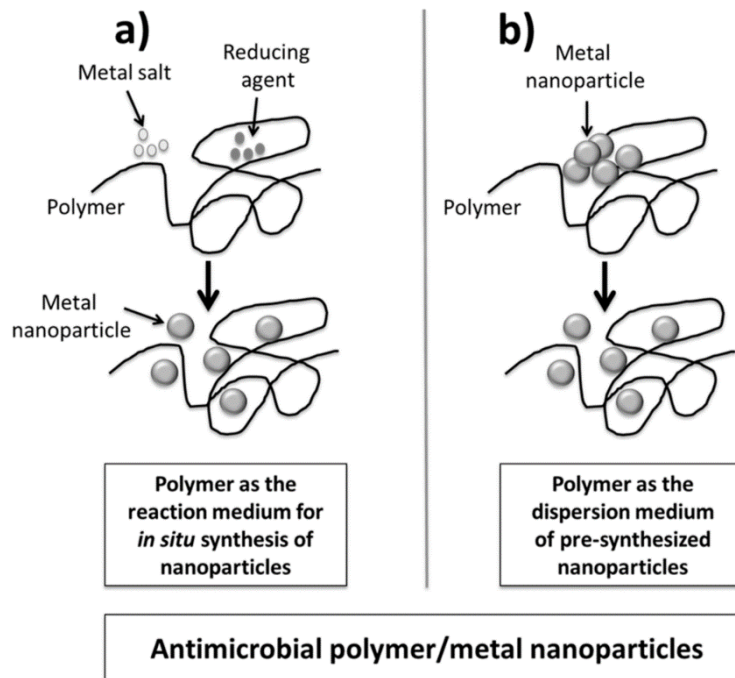


**Figura 5. Principales mecanismos de acción antimicrobianos de AgNPS (43)**

## **2.5 Funcionalización de exopolisacáridos con nanopartículas de plata.**

Debido a sus propiedades, las nanopartículas regularmente presentan toxicidad hacia células eucariotas, por lo cual diversos autores han sugerido recubrir o acomplejar las mismas con polímeros biocompatibles. Para lograr materiales híbridos polímero-nanopartícula diversas estrategias han sido utilizadas tales como mezclar nanopartículas de plata con soluciones poliméricas, reducir iones de plata en presencia de polímeros, reducir iones de plata y simultáneamente polimerizar un monómero y el uso del electrohilado. Por medio de estos métodos las nanopartículas de plata son embebidas y estabilizadas en una matriz polimérica[45].

Actualmente las nanopartículas de plata conjugadas con biomoléculas cuentan con una potencial aplicación en diversas áreas tales como: entrega de fármacos, transferencia de genes, ingeniería celular y primordialmente en antimicrobianos.



**Figura 6. Principales estrategias para la síntesis de híbridos polímero/AgNPS con actividad antimicrobiana (46)**

La síntesis química de nanopartículas de plata está siendo actualmente desplazada por métodos verdes. Uno de los abordajes más utilizados para dicho propósito es la utilización de microorganismos (bacterias hongos y levaduras), sus biomoléculas y extractos de plantas como agentes reductores y estabilizadores de nanopartículas[46].

Una clase de biomoléculas que ha acaparado la atención para la producción de nanopartículas metálicas son los biopolímeros. Los exopolisacáridos tienen grupos hidroxilo, terminaciones hemiacetal y otros grupos funcionales que permiten llevar a cabo funciones de estabilización y/o de reducción[45].

Los EPS permiten obtener nanopartículas homogéneas en tamaño, forma, y distribución así como estabilización a lo largo del tiempo. Generalmente los exopolisacáridos son moléculas estables, hidrofílicas, biodegradables y no presentan toxicidad elevada en células de mamíferos [46]. Estas propiedades se pueden transferir al recubrir o crear matrices de nanopartícula-EPS. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos polímeros biocompatibles y su estabilización con AgNPS[47] representa una oportunidad para generar materiales biocompatibles con actividad antimicrobiana.

Tomando como base lo anteriormente descrito, en este proyecto se analizará la actividad antibacteriana y antibiopelícula del exopolisacárido producido por la cepa de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L. Adicionalmente, se utilizarán los exopolisacáridos para la biosíntesis y funcionalización de nanopartículas de plata.

En este trabajo de investigación se buscará analizar el potencial de los EPS producidos por *Rhodotorula mucilaginosa* como un agente antimicrobiano novedoso.



### 3. Hipótesis y objetivos

#### Hipótesis:

Los exopolisacáridos producidos por *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L nativa del Estado de Nuevo León presentan capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano y/o la formación de biopelículas bacterianas.

#### Objetivos:

##### General:

- Identificar las propiedades antimicrobianas de los EPS producidos por *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L.

##### Específicos:

- Analizar la capacidad de inhibición de los EPS sobre el crecimiento bacteriano.
- Caracterizar la capacidad de inhibición de los EPS sobre la formación de biopelículas.
- Sintetizar un compuesto híbrido biopolímero-nanopartículas de plata.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del compuesto EPS-nanopartículas de plata contra bacterias de interés.

#### Metas:

- Publicar resultados en revista indexada, así como exposiciones en congresos.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Material, reactivos y equipo utilizado.

#### Material

- Micropipetas con la siguiente capacidad 2-20, 20-200 y 100-1000  $\mu\text{L}$
- Puntillas para micropipeta marca Eppendorf
- Tubos para microcentrífuga de 1.5 mL marca Neptune.
- Filtros de celulosa de diámetro de poro 0.45  $\mu\text{m}$
- Cajas Petri de vidrio marca KIMAX,
- Matraces Erlenmeyer 125, 250 y 500 mL marca Pyrex
- Tubos para cultivo marca HACH,
- Tubos para centrífuga 15 y 50 mL marca Corning,
- Placas de 96 pocillos marca Corning,
- Celdillas para espectrofotómetro marca Brand,

#### Reactivos

- Medios de cultivo LB, Miller (Difco), TSB (BD, Bioxon), YM (Difco) agar bacteriológico (BD, Bioxon).
- Solución acuosa de cristal violeta 1 % Marca CTR
- Etanol al 96 % marca CTR
- Sales minerales: Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) Baker. Sulfato de magnesio hepta-hidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) Baker. Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) DEQ. Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}$ ) Baker. Cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) Merck. Sulfato de zinc heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) Dextrosa DEQ.
- Gel de agarosa de 1.5 %

## **Equipos**

- Incubadora SHELL-LAB modelo 1575
- Incubadora SHELL-LAB modelo SI-6
- Centrífuga ThermoElectron modelo Centrac-034
- Vortex Lab-Line modelo 1195
- Liofilizadora Labconco modelo Freezone-6
- Espectrofotómetro IR Shimadzu modelo Affinity-1
- espectrofotómetro Optizen 2120 UV Plus
- lector de placas Multiskan GO (Thermo Scientific),
- cámara de electroforesis y fuente de poder Labnet.
- Termomixer Eppendorf

### **4.2 Microorganismos y condiciones de cultivo.**

En este proyecto se utilizaron las siguientes cepas bacterianas: *E. coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Los cultivos overnight de las cepas bacterianas fueron obtenidos al inocular *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en medio LB (Difco) y *S. aureus* en medio TSB (Difco). Las condiciones de crecimiento se fijaron en 37 °C, con agitación de 150 rpm por 12 horas.

Todos los cultivos experimentales de *R. mucilaginosa* UANL 001L fueron realizados en medio mineral (g/L:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1; NaCl, 0.10;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5;  $\text{CaCl}_2$ , 0.10;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05; glucosa, 20.).

#### **4.3 Caracterización molecular de la cepa *Rhodotorula mucilaginosa* UANL 001L**

En proyectos anteriores en los grupos de investigación de la Dra. Teresa Garza y el Dr. Rubén Morones, se aisló una levadura del Río pesquería en el estado de Nuevo León, México. En el estudio antes mencionado se realizaron una serie de pruebas bioquímicas donde se catalogó a esta levadura, como un organismo perteneciente a la especie *Rhodotorula mucilaginosa*, denominándose esta cepa como *Rhodotorula mucilaginosa* UANL 001L. Sin embargo la identidad molecular de este microorganismo no fue validada[39]. Por esta razón en el presente trabajo se prosiguió a identificar molecularmente la cepa de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL 001L por medio de la secuenciación de la región del RNA ribosomal ITS1-5.8S-ITS2. Primeramente, a partir de un cultivo de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL 001L preservado en medio YM-agar (25 g/L YM Broth, Difco y 20 g/L agar bacteriológico, BD Bioxon) se inoculó un matraz con 100 ml de Caldo YM (Difco), incubándose a 25 °C por 24 h y con agitación de 250 rpm. De ahora en adelante para efectos de este trabajo, cuando se haga referencia a un cultivo overnight de *R. mucilaginosa*, será obtenido bajo las condiciones aquí descritas.

Utilizando el cultivo antes descrito, se realizó la extracción del ADN genómico utilizando el kit comercial one-4-ALL Genomic DNA Miniprep Kit de la marca BIOBASIC, utilizando el protocolo descrito en su instructivo.

A continuación se amplificó la secuencia de interés por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa utilizando los siguientes primers universales[48]:

- ITS2 (5'—TCCGTAGGTGAACCTGCGG—3')
- ITS4 (5'—TCCTCCGCTTATTGATATGC—3')

El protocolo utilizado para la reacción de PCR así como las condiciones de amplificación del mismo se enlistan a continuación[48]:

Reacción de PCR (volumen final 50 $\mu$ L)

- 10 mM Tris HCl (pH8.3)
- 20 mM KCl,
- 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0.2mM de cada dNTP
- 1.25 unidades de polimerasa Taq DNA,
- 0.2 $\mu$ M de ambos primers (ITS1 e ITS4)
- 10 ng de DNA genómico

Programa de amplificación

- Desnaturalización inicial: 5 min a 94°C
- Desnaturalización: 30 s a 95°C

- Alineamiento: 45 s a 60°C
- Extensión: 2 min a 72 °C
- Extensión final: 7 min a 72 °C

Para cerciorarse de una correcta amplificación, el producto obtenido se corrió en un gel de agarosa al 1.5 % usando solución TAE 1X. Inmediatamente se cargó en el gel una mezcla de 1.5µL de jugo azul, 1.5 µL de GelRed y 3 µL de la reacción de PCR. Una vez visualizado el tamaño del fragmento esperado, el amplicón obtenido fue enviado a la compañía MacroGen Inc. (Maryland,USA) para la secuenciación del mismo.

Para identificar molecularmente a nuestra cepa, se prosiguió a realizar un árbol filogenético. Accediendo a la base de datos del GenBank, se descargaron secuencias de la región 5.8-ITS rRNA reportadas para diferentes especies del genero *Rhodotorula sp.* con los siguientes números de acceso: JX512682, JX512672, JX512671, JX512705, JX512677, JX494371, JX272795, JX272796, JX494370, JX494372, JX494375, JX512703 y JX512694.

Utilizando la secuencia de nuestro producto obtenido y las secuencias anteriormente descritas, se construyó un árbol filogenético en el programa TOPALi v2 software[49], usando un algoritmo de Máxima Similitud y seleccionando el modelo evolutivo GTR+G con un análisis bootstrap de 1000 réplicas. La secuencia

con número de acceso KP131664 perteneciente a *Candida albicans* se utilizó como grupo externo.

#### **4.4 Cinética de Crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L**

Para conocer el comportamiento de la cepa en el medio de producción mineral, se realizó una cinética de crecimiento. Por consiguiente, se preparó un cultivo overnight de *Rhodotorula mucilaginosa* (procedimiento previamente descrito) ajustándose la OD 600 nm a 1. Enseguida, se inoculó 2 ml de esta suspensión en 200 ml de medio mineral y se incubó el cultivo a 28 °C, agitando a 200 rpm por 96 horas. Cada cierto tiempo (0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 h) se tomaron diferentes muestras y se realizó conteo celular. La determinación de las Unidades Formadoras de Colonia fue mediante la técnica de recuento en placa, para esto se prepararon diluciones decimales (1:100, 1:1000, 1:10000 y 1:100000) de la muestra original, se tomaron 10 µL de cada dilución y se colocaron 3 gotas sobre una placa de agar-YM seccionada de acuerdo a cada dilución. Se incubaron las placas a 25 °C por 48 horas y una vez finalizado el tiempo de incubación se calcularon las UFC/ml mediante la siguiente fórmula:

UFC/ml = # de colonias contabilizadas X 100 X Factor de dilución.

#### **4.5 Cinética de producción de exopolisacárido producido por *Rhodotorula mucilaginosa*.**

A continuación se determinó el perfil de producción del exopolisacárido de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL 001L. Para esto, se creció un cultivo overnight de *Rhodotorula mucilaginosa* (procedimiento previamente descrito) y se ajustó la OD 600 nm a 1. Después se inoculó 2 ml de esta suspensión celular en 200 ml de medio mineral, incubándose el cultivo a 28 °C, por 96 horas a 200 rpm. La toma de muestra se realizó en los siguientes tiempos: 0, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h. La extracción y cuantificación del exopolisacárido se realizó como se describe en el apartado siguiente.

#### **4.6 Extracción y cuantificación de exopolisacárido**

El siguiente punto describe como se llevó a cabo la extracción del polisacárido extracelular[39]. Primeramente, se separó la biomasa del medio de cultivo, por ende se colocó la suspensión celular en tubos de centrifuga de 50 ml centrifugándose a 4 °C, 9,500 rpm por 20 min. Enseguida, el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de celulosa con un diámetro de poro de 0.45 µM (Milipore). A continuación el exopolisacárido fue precipitado con la adición de 2 volúmenes de etanol al 96 % por cada volumen de sobrenadante filtrado. Esta mezcla se incubó a -20 °C por 12 h en condiciones estáticas. Una vez precipitado el EPS, se recuperó centrifugándose en tubos de 50 ml a 4 °C a una velocidad



9,500 rpm por 20 min. Para disminuir trazas de medio de cultivo en el polisacárido obtenido, se desechó el sobrenadante y el pellet de EPS se lavó 2 veces con etanol al 70 %, centrifugándose a 4 °C, 9 500 rpm por 20 min. Después de esto, se decantó el sobrenadante, dejando evaporar el alcohol remanente por 10 minutos a temperatura ambiente. Por último se congeló el EPS obtenido a – 70 °C por 25 min y enseguida se liofilizó la muestra por 12 horas. Una vez liofilizado el EPS, se prosiguió a determinar el peso constante del producto en una balanza analítica.

#### **4.7 Producción de stocks de EPS para las diferentes pruebas y determinaciones.**

Una vez determinada la cinética de crecimiento y conociendo el perfil de producción de EPS se prosiguió a preparar un cultivo overnight de *Rhodotorula mucilaginosa*, ajustándose la OD 600 nm a 1. Se adicionó 2 ml de esta suspensión celular en 200 ml de medio mineral, dejándose incubar a 28 °C, 200 rpm por 96 horas. Transcurrido el tiempo señalado, se realizó la extracción y cuantificación del EPS de acuerdo al procedimiento antes descrito. El producto liofilizado se resguardo a -21 °C en tubos estériles de centrifuga de 50 ml. Los stocks de EPS fueron resuspendidos en agua bidestilada estéril de las pruebas a realizar.

#### **4.8 Caracterización del exopolisacárido por espectroscopia Infrarroja FT-IR**

Para determinar los grupos funcionales del polímero, se analizó una muestra de EPS liofilizado por medio de la técnica de FT-IR. Para esto, se procesó una muestra de EPS en el espectrómetro Tensor 27 (Bruker, Germany), leyendo en la región de 400–4000  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **4.9 Caracterización morfológica del EPS por microscopia electrónica de barrido**

Para determinar la morfología superficial y porosidad de EPS. Se utilizaron muestras liofilizadas de EPS, capturándose micrografías en un microscopio electrónico de barrido con emisión de campo modelo NanoSEM 200 FEI.

#### **4.10 Biosíntesis de nanopartículas de plata.**

En estudios realizados en el grupo de investigación del Dr. Rubén Morones por el M.C. Daniel Barbosa se exploró la síntesis de nanopartículas de plata utilizando EPS, encontrándose que este no es un buen reductor, sin embargo este podía estabilizar y funcionalizarse con nanopartículas de plata[40]. Para efectos del presente trabajo de investigación, se sintetizaron nanopartículas de plata utilizando como agente reductor el extracto de la planta *Acacia rigidula*. La materia prima para la realización del extracto fue proporcionada por el Dr. Ezequiel Viveros del Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, donde actualmente se explora el uso de este extracto para la síntesis verde de nanopartículas metálicas (datos aún no publicados).

Para la biosíntesis de nanopartículas primeramente se preparó extracto de Acacia al 10 % (peso/volumen) para esto se pesaron 3 g de corteza de *Acacia rigidula* y se hirvieron en 30 mL de agua bidestilada por 20 min. A continuación se filtró el material por un filtro de celulosa de diámetro de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  y el filtrado se almacenó a 4 °C para su posterior uso.

La biosíntesis de nanopartículas de plata se realizó en tubos de centrifuga de 1.6 ml de la siguiente forma:

- 380  $\mu\text{l}$  de una solución de EPS 1000 ppm
- 20  $\mu\text{l}$  de extracto acuoso de acacia
- 600  $\mu\text{l}$  de una solución 10 mM de Nitrato de plata

Se colocaron los tubos con la reacción en un equipo Thermomixer (eppendorf) y se incubaron a 60 °C por una hora con una agitación de 300 rpm

#### **4.11 Análisis de espectroscopia UV-Visible**

Para confirmar la obtención de nanopartículas de plata se realizó un análisis de absorción en el espectro UV-VIS. Para esto se colocaron 100  $\mu\text{l}$  de la reacción y 100  $\mu\text{l}$  de agua destilada en un pocillo de una placa de 96 pocillos leyéndose la muestra en un lector de placas en un rango de longitud de onda de 200-800 nm.

#### 4.12 Cálculo teórico de la concentración molar de nanopartículas de plata

A continuación se calculó de forma teórica la concentración de nanopartículas obtenidas utilizando el siguiente método descrito por Paramelle y colaboradores [50]:

Primeramente se determina el número de átomos de plata por nanopartícula

$$N = \frac{\pi \rho D^3}{6M} N_A$$

***Ecuación 1. Número de átomos de plata por nanopartícula esférica***

Donde N es el número de átomos por nanopartícula de plata,  $\pi=3.1416$ ,  $\rho= 10.5$  g/cm<sup>3</sup>, D es el diámetro promedio de las nanopartículas,  $N_A = 6.023 \times 10^{23}$ .

Enseguida se calcula la concentración molar, utilizando el valor antes calculado

$$C = \frac{N_T}{NVN_A}$$

***Ecuación 2. Cálculo de la concentración molar de nanopartículas de plata***

Donde C es la concentración molar de nanopartículas,  $N_T$  es el número total de átomos de plata agregados como  $\text{AgNO}_3$ , N es el número de átomos por nanopartícula, V es el volumen de reacción en L,  $N_A$  es el número de Avogadro[50].

#### **4.13 Recubrimiento del exopolisacárido con nanopartículas de plata**

Para recubrir el polímero y formar una matriz con las nanopartículas de plata, se precipitó el exopolisacárido con 2 volúmenes de etanol absoluto por cada volumen de reacción de síntesis, dejándose incubando a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 12 horas. Transcurrido el tiempo se centrifugó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 9,500 rpm por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante, se evaporó el etanol remanente a temperatura ambiente y se congeló el complejo de EPS-nanopartículas obtenido a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 25 min, enseguida se liofilizó la muestra por 12 horas. Al utilizar la muestra para la preparación de nuestra solución de trabajo se consideró la concentración inicial antes de la solución de nanopartículas de plata, por consiguiente la concentración final de trabajo se ajustó al agregar agua estéril.

#### **4.14 Caracterización del composito EPS-AgNPS por espectroscopia Infrarroja FT-IR**

Para determinar los grupos funcionales que participan en la síntesis y estabilización de las nanopartículas de plata, se procesó una muestra de Ag-NPS en el espectrómetro Tensor 27 (Bruker, Germany), leyendo en la región de  $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ .

#### **4.15 Pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano con el exopolisacárido o el compuesto Ag-NPS**

Las pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano se realizaron tomando como base la metodología reportada por utilizando el método de microdilución en placa[51].

Primeramente se preparó una solución de EPS a 5000 ppm, enseguida se llevaron cabo diluciones en una placa de 96 pocillos utilizando medio (LB o TSB según corresponda) como diluyente, obteniendo las siguientes concentraciones en un volumen de 100  $\mu$ L por pocillo: 5000 ppm, 4000 ppm, 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm.

De forma paralela se preparó otro ensayo utilizando una solución de EPS-nanopartículas, para esto se realizaron diluciones seriadas en una placa de 96 pocillos obteniendo el doble de las concentraciones deseadas obteniendo un volumen de 100  $\mu$ L de tratamiento por pocillo.

A continuación los tratamientos (EPS o EPS-nanopartículas) se inocularon con suspensiones bacterianas. Para esto se tomaron 100  $\mu$ L de un cultivo overnight bacteriano y se inoculó 20 mL de medio (LB o TSB según corresponda), incubándose a 37 °C, 150 rpm hasta alcanzar una OD 600 nm de 0.2, lo cual equivale a  $10^7$  células/ml en fase exponencial. Posteriormente se realizó una dilución 1:100 del cultivo anterior en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, después se inocularon 100  $\mu$ L de esta dilución en los pocillos que contienen

nuestros tratamientos (EPS o EPS-nanopartículas). Obteniendo en cada pocillo un volumen final de 200 µL con una concentración de  $\sim 10^5$  células/mL y obteniendo concentraciones finales de EPS (2500 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62.5 ppm) y de nanopartículas de plata (0.22, 0.45, 0.91, 1.82, 3.65, 7.31, 14.62, 29.25, 58.5, 117 nM). Las placas con los ensayos se incubaron a 37 °C, 150 rpm por 20 horas. Cada ensayo se realizó por triplicado con sus correspondientes controles de crecimiento y esterilidad.

#### **4.16 Pruebas de inhibición de biopelícula con exopolisacárido y el complejo EPS-AgNPS**

Para el ensayo de formación de biofilm [52] se inoculó con 20 µL de un cultivo overnight bacteriano 4 ml de medio (TSB para *S. aureus*, LB para *E. coli* y *P. aeruginosa*), incubándose a 37 °C, 150 rpm por 15 horas. Transcurrido este tiempo, se ajustó la OD (600nm) a 1. Enseguida se realizaron diluciones 1:1000 utilizando como diluyente caldo LB para *E. coli* y TSB + 0.5 % glucosa para *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, esta será considerada como dilución de trabajo.

A continuación se ajustaron nuestros tratamientos (EPS o EPS-AgNPS) al doble de las concentraciones deseadas, obteniendo un volumen de 100 microlitros de tratamiento por pocillo. Enseguida se agregó 100 microlitros de nuestras

diluciones de trabajo, incubando sin agitación a 37 °C (para *S. aureus*) y 30 °C (*P. aeruginosa* y *E. coli*) por 48 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de formación de biopelícula. Se prosiguió a teñir y cuantificar la formación del mismo. Primeramente se retiró el sobrenadante (para descartar células plantónicas), se realizaron 3 lavados con agua bidestilada y después se secó la placa con aire caliente a 75 °C por 30 min. Una vez acabado el ciclo de secado y fijado, se enfrió la placa de 96 pocillos a temperatura ambiente.

Inmediatamente, se prosiguió a teñir la biopelícula añadiendo 240 µL de CV al 0.1 % a cada pocillo, incubando por 20 minutos sin agitación y estáticamente. Después se lavaron los pocillos 3 veces con agua bidestilada y se secó la placa con corrientes de aire caliente. Para desteñir el biofilm, se añadió 250 µL de etanol absoluto por pocillo incubándose de 25-30 min. Por último se cuantificó la formación de biopelícula transfiriendo 100 µL de la mezcla CV/etanol a otra placa y leyendo en un lector de placas a 590 nM.



#### **4.16 Análisis estadístico**

Los tratamientos y el control se realizaron por triplicado. En las pruebas antimicrobianas se realizó una prueba ANOVA de un factor, seguido por un análisis post hoc de Dunnet con un intervalo de confianza del 95 %. Se utilizó el programa GraphPad[53] para la realización de las pruebas estadísticas.

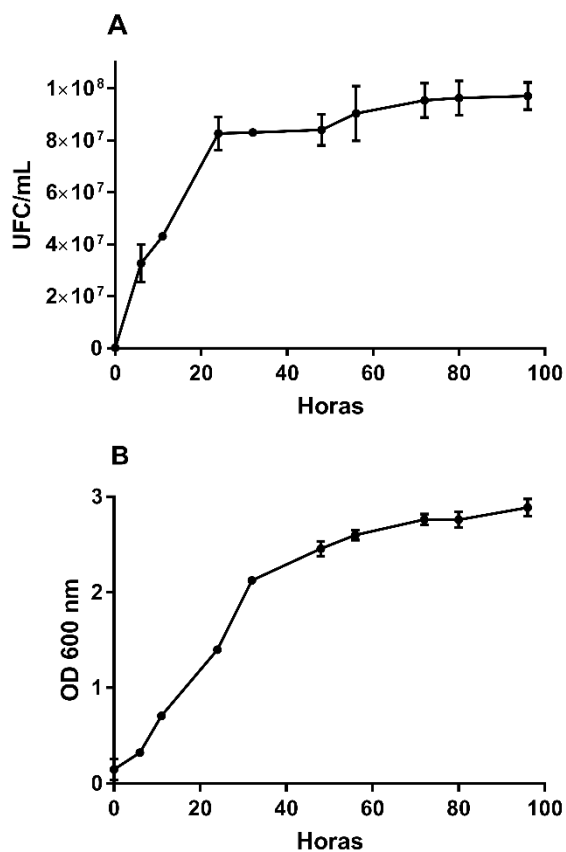
#### **4.17 Manejo y disposición de residuos**

Los residuos generados durante la realización de este proyecto de investigación fueron gestionados de acuerdo a las características de los mismos, siguiendo los lineamientos establecidos por el Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas utilizando los recipientes proporcionados por este departamento, en base a la Norma PR-CLB-SRR-000.

## 5. RESULTADOS

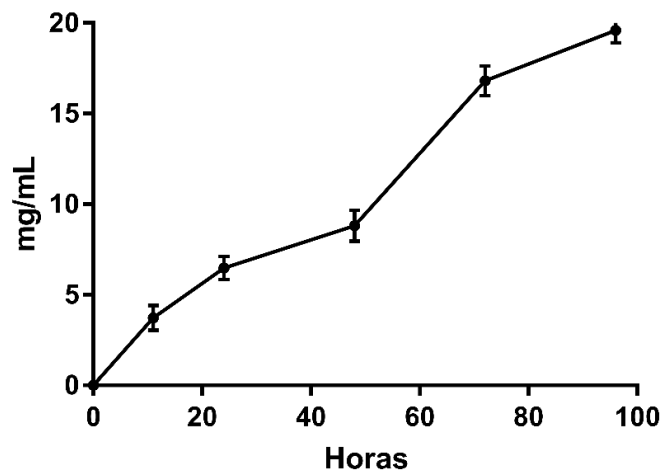
### 5.1 Curva de crecimiento de *R. mucilaginosa* UANL-001L y cinética de producción del exopolisacárido

Con el objetivo de determinar la curva de crecimiento de la cepa *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-O1L en medio mineral y bajo las condiciones antes descritas ( sección 4.4 ), se leyó la OD (600 nm) en distintos puntos a través del tiempo y se enumeraron las UFC en placas de agar YM (Fig. 7).



**Figura 7. Cinética de crecimiento de *R. mucilaginosa* en medio mineral. A) UFC/mL B) OD 600 nm**

Como se puede observar en la figura 7, nuestro cultivo entró a la fase media exponencial entre las 12 y 24 horas. Igualmente se alcanzó la fase estacionaria alrededor de las 36 horas, registrándose una absorbancia (600 nm) igual a 2.1, esto equivale a una concentración celular de aproximadamente  $8.3 \times 10^7$  UFC/mL.

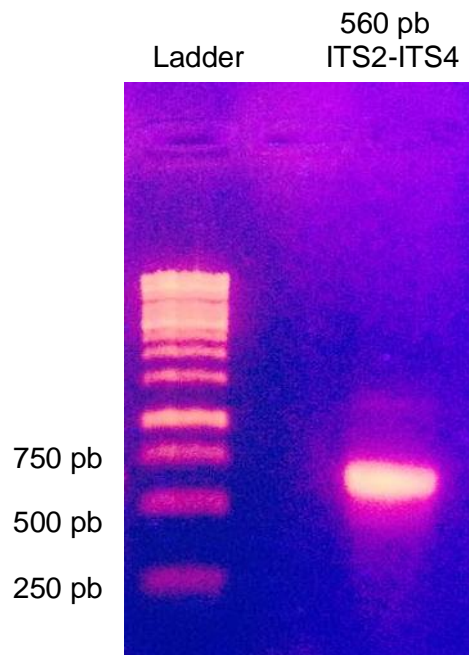


**Figura 8. Cinética de producción de exopolisacárido en medio mineral**

En la figura 8 se muestra la cinética de producción de nuestro polímero de interés, es evidente que la cepa *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L incrementa la síntesis del exopolímero a partir de las 48 horas, durante la fase estacionaria de crecimiento.

## 5.2 Caracterización molecular de la cepa *Rhodotorula mucilaginosa* UANL 001L

El amplicón obtenido de la reacción de PCR utilizando los primers universales ITS2 e ITS4 presentó un tamaño aproximado de 550 pb, esto pudo observarse en un gel de electroforesis de agarosa al comparar nuestro amplicón contra un marcador de peso molecular (Figura 9).

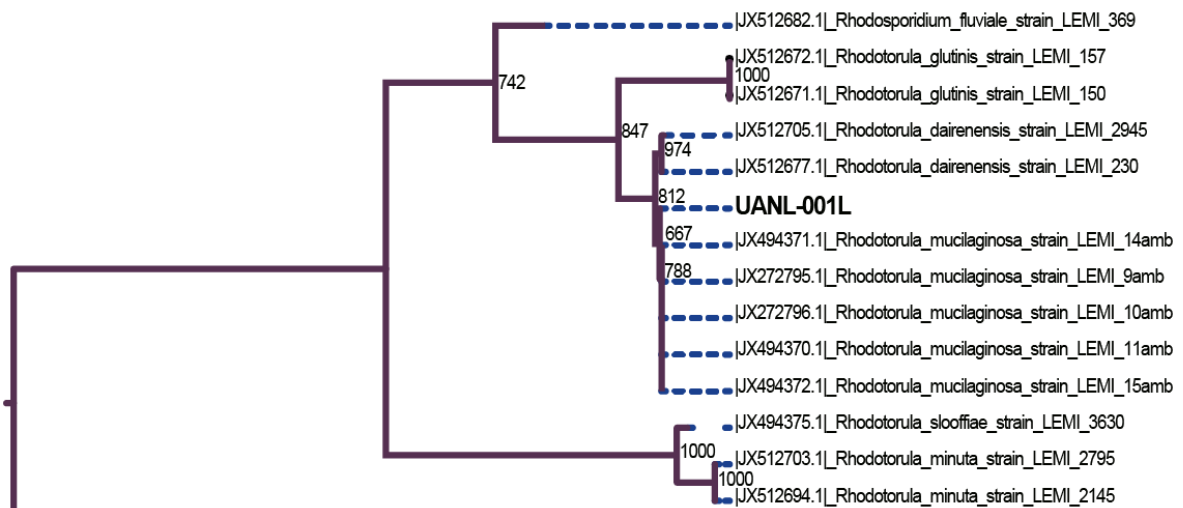


**Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Amplicón de la región ITS1-ITS2**

Este resultado fue corroborado al obtener la secuencia de nuestro amplicón, el cual cuenta con una longitud de 562 pb. A continuación proseguimos a construir un árbol filogenético, eligiendo la secuencia ITS1-ITS2 del ARN ribosomal 18 S de diversas especies del Genero *Rhodotorula* sp. así como nuestra secuencia de interés.

De misma forma elegimos la secuencia perteneciente a *Candida albicans* como grupo externo.

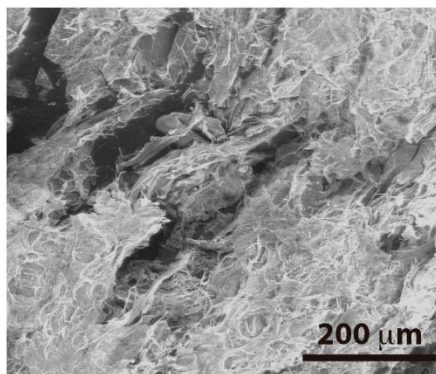
Al analizar el árbol filogenético conformado por las diferentes especies, claramente se forman diferentes clados entre los miembros con mayor similitud en la secuencia ITS1-ITS2, permaneciendo la secuencia control de *Candida albicans* externa a los mismos. La cepa de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L forma un clado monofilético con la especie de *Rhodotorula mucilaginosa* (Figura 10).



**Figura 10. Árbol filogenético de máxima similitud. Representa la relación genética entre diversos miembros del género *Rhodotorula* sp.**

### 5.3 Microscopia electrónica de barrido

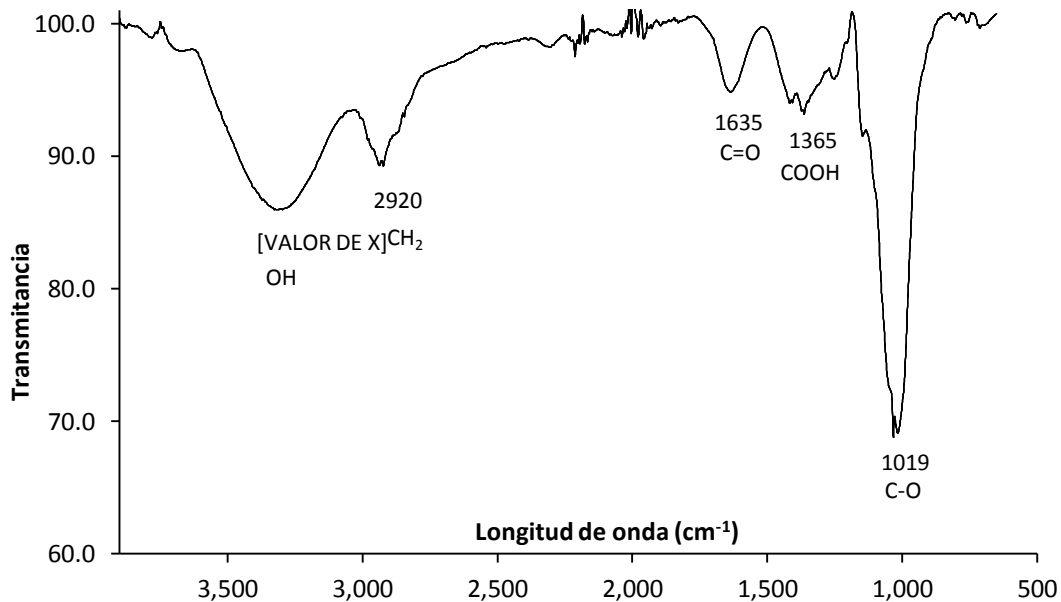
El SEM es una herramienta poderosa para estudiar la estructura tridimensional y la morfología superficial de macromoléculas lo cual ayuda a identificar propiedades físicas [54]. La visualización del EPS por medio de microscopia electrónica nos permitió dilucidar la superficie del exopolisacárido, el cual presenta una estructura porosa, compacta, granular e irregular (Figura 11).



**Figura 11. Microscopía Electrónica de Barrido del exopolisacárido producido por *R. mucilaginosa***

### 5.4 Caracterización del EPS por espectroscopia infrarroja FT-IR

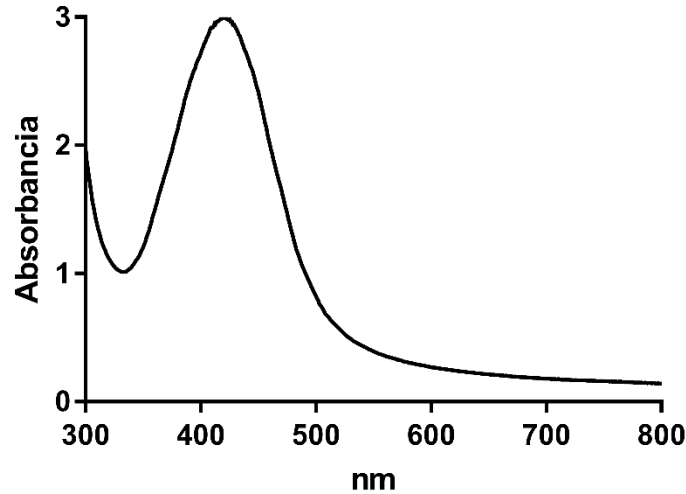
Se caracterizó parcialmente el exopolisacárido producido por *Rhodotorula mucilaginosa* UANL 001L. Para esto se analizó una muestra por espectroscopia infrarroja con el fin de conocer los grupos funcionales del polímero (figura 12).



**Figura 12. Espectroscopia FT-IR del exopolisacárido producido por *R.mucilaginosa* UANL-001L**

### 5.5 Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata fueron sintetizadas reduciendo  $Ag^1$  a  $Ag^0$  con la adición de un agente reductor (extracto acuoso de acacia), estabilizante (exopolisacárido) y una solución de plata (10 mM). La solución incolora se tornó de color café-amarillo, lo cual es un claro indicativo de la formación de nanopartículas. Lo anterior fue corroborado al observar el espectro UV-VIS de nuestra muestra, en el mismo se presenta un pico máximo de absorción a los 420 nM característico de las nanopartículas de plata (Figura 13).



*Figura 13. Espectro UV-visible de AgNPS sintetizadas con EPS*

### 5.6 Cálculo de la concentración teórica de nanopartículas de plata

Utilizando los datos del rango de absorción de las nanopartículas y considerando que el pico máximo corresponde a 420 nm, se asume que la distribución de tamaño de las nanopartículas cuenta en promedio con 40 nm de diámetro. Basados en datos experimentales y teóricos realizados Paramelle y colaboradores [50].

Por lo tanto asumiendo que el 100 % de los átomos de plata se convirtieron en nanopartículas, aplicamos la ecuación 1:

$$N = \frac{3.14(10.5)(50 \times 10^{-7})^3}{6(107.868 \text{ g})} 6.023 \times 10^{23}$$

$$N = 3837233.003$$



Enseguida se calculó la molaridad de las nanopartículas de plata utilizando la ecuación 2:

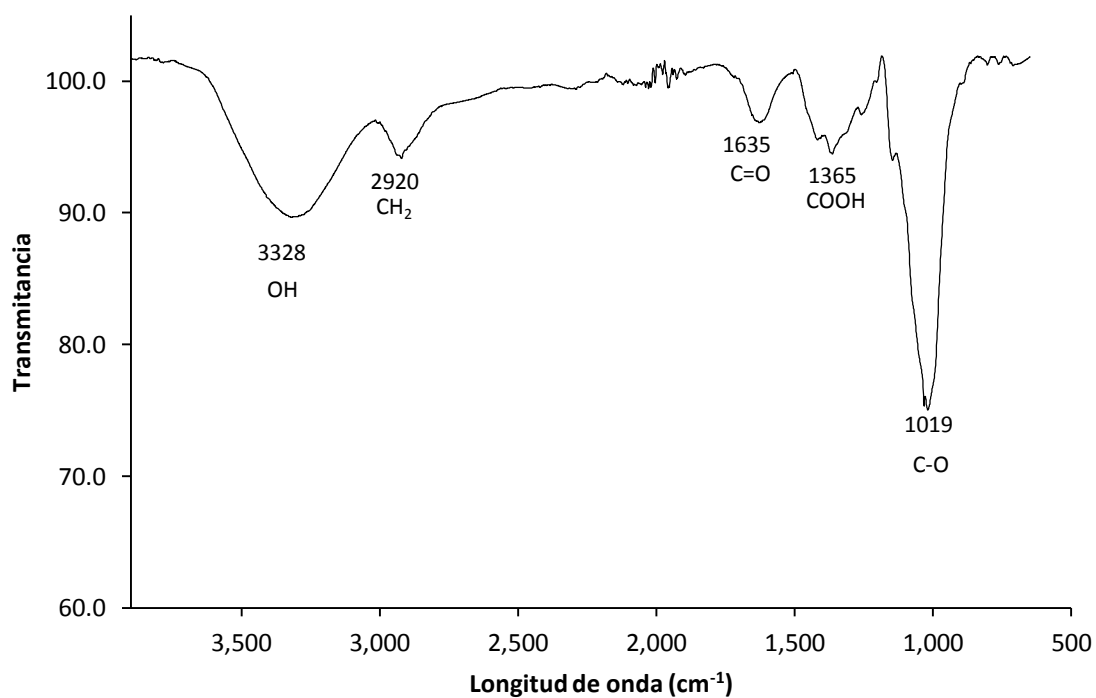
$$C = \frac{.001(6.023 \times 10^{23})}{38372338(.001)(6.023 \times 10^{23})}$$

$$C = 2.606 \times 10^{-7} \text{ M/L} = 260 \text{ nM}$$

Las concentraciones siguientes fueron realizadas a partir de esta solución.

### 5.7 Análisis de espectroscopia infrarroja FT-IR del complejo EPS-AgNPS

A continuación se realizó un análisis de espectroscopia infrarroja al complejo de EPS-AgNPS para conocer los posibles grupos funcionales que participan en la estabilización y formación de nanopartículas (figura 14).



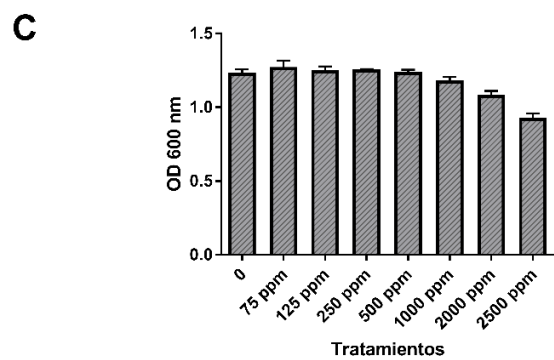
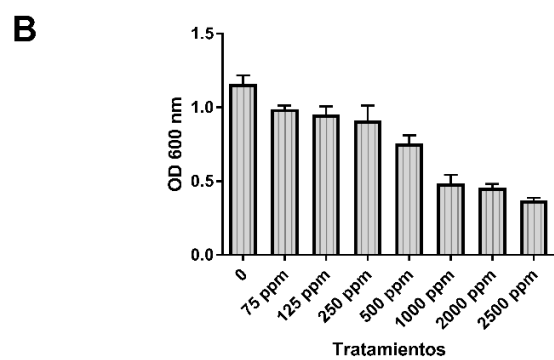
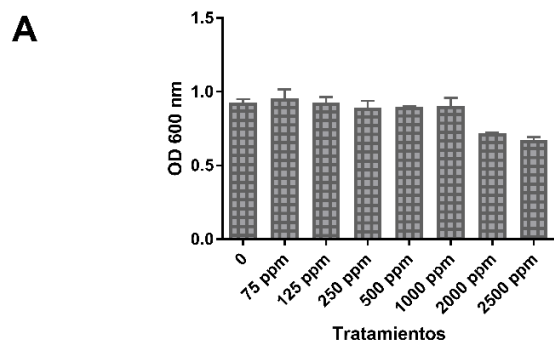
**Figura 14. Espectroscopía FT-IR del complejo EPS-AgNPS**

## 5.8 Pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano con exopolisacárido

Actualmente no se tiene evidencia experimental de la actividad antimicrobiana por parte de los exopolisacáridos producidos por *Rhodotorula mucilaginosa*, a continuación se describirán los resultados obtenidos al estudiar los polímeros extracelulares producidos por la cepa *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L.

Al analizar los efectos inhibitorios del EPS sobre el crecimiento de diversas cepas bacterianas se observa que los tratamientos con mayor concentración (2500 ppm) son los más eficaces en inhibir el crecimiento entre las cepas utilizadas.

Igualmente, al utilizar como tratamiento el EPS a una concentración de 2500 ppm, se logró inhibir el 27 %, 24 % y el 60 % respectivamente para *E. coli* ATCC 11229, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC6538 (Figura 15).

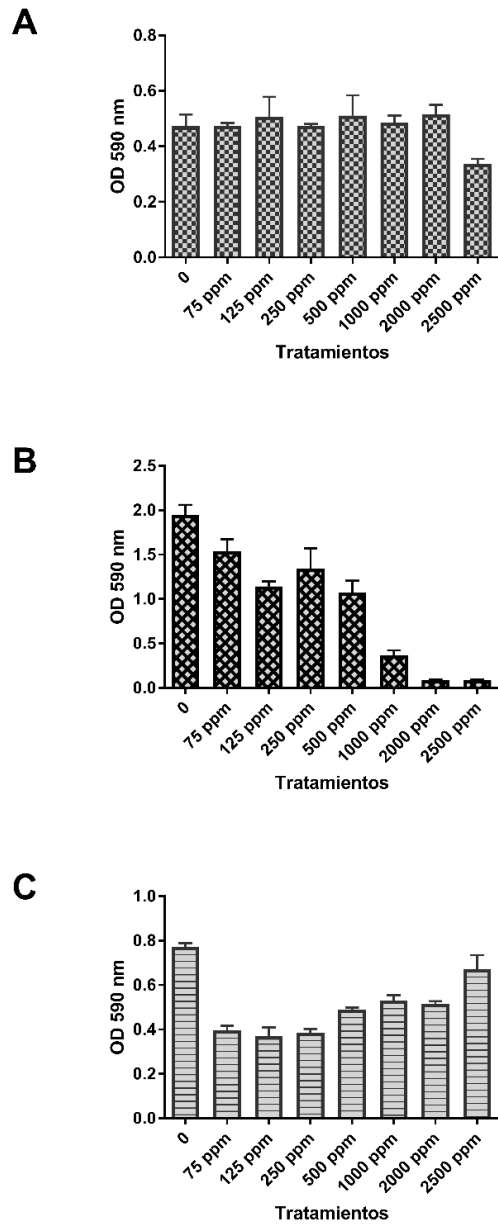


**Figura 15. Efecto antibacteriano del EPS de *R. mucilaginosa* UANL-001L. A) *E. coli* ATCC 11229 B) *S. aureus* ATCC 63538 C) *P. aeruginosa* ATCC 27853**

### **5.9 Pruebas de inhibición de la formación de biopelícula utilizando exopolisacárido.**

Dentro de la gama de diferentes investigaciones realizadas para caracterizar las propiedades de los exopolisacáridos producidos por *Rhodotorula mucilaginosa* no se ha descrito la capacidad de inhibición de biopelículas bacterianas. A continuación se describirán los resultados experimentales obtenidos al analizar los EPS producidos por *Rhodotorula mucilaginosa* UANL 001L (Figura 16).

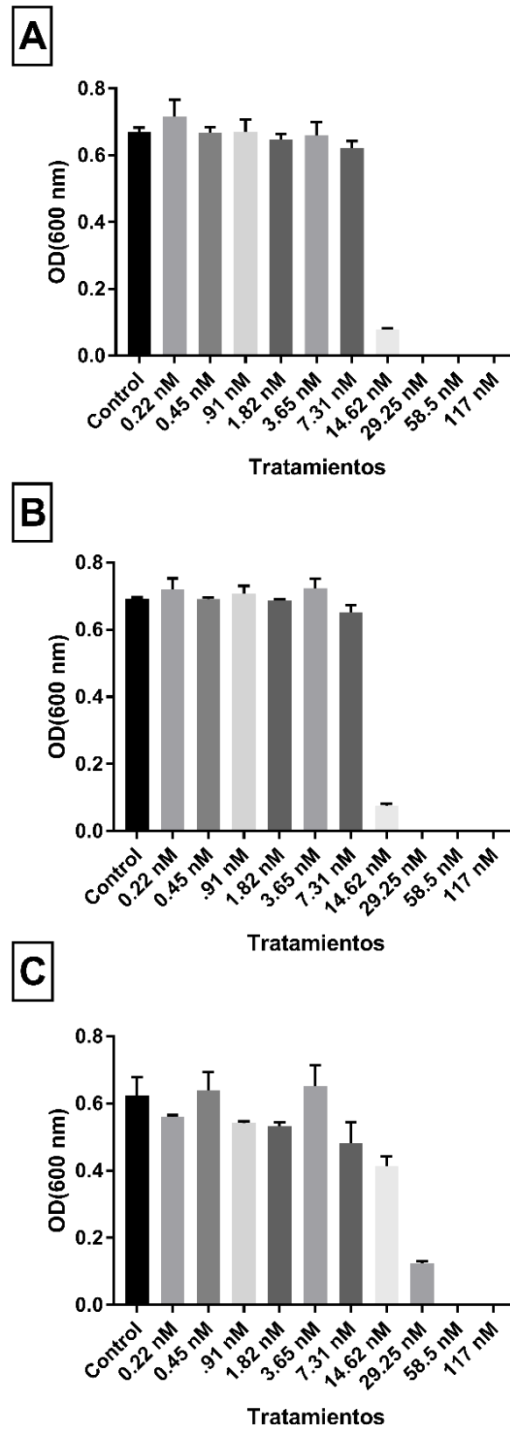
El tratamiento con 2500 ppm de EPS inhibe el 96% y el 30% de la formación de biopelícula, respectivamente para *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Sin embargo se presenta un patrón irregular al examinar el efecto del EPS sobre la formación de biopelícula de *E. coli*. Los tratamientos con EPS promovieron la formación de biopelícula en *E. coli*.



**Figura 16. Efecto inhibitorio del EPS sobre la formación de biopelícula.**  
**A) *P.aeruginosa* ATCC 27853 B) *S.aureus* ATCC 6538 C) *E.coli* ATCC 11229**

## 5.10 Pruebas de inhibición bacteriana con EPS-AgNPS

A continuación se determinó la actividad antibacterianas de AgNPS sintetizadas:



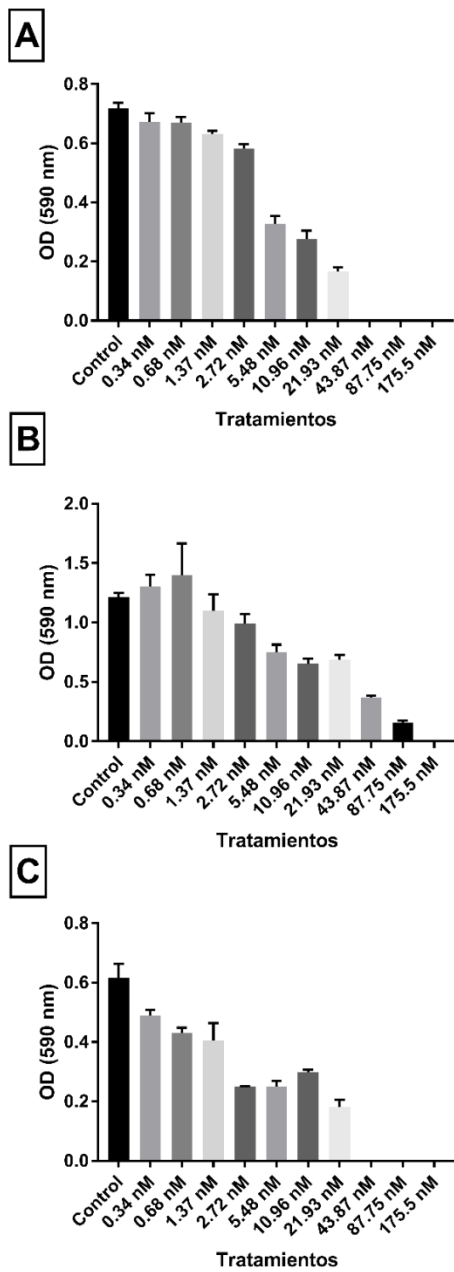
**Figura 17. Efecto inhibitorio de EPS-AgNPS sobre el crecimiento bacteriano.**  
A) *E. coli* ATCC11229 B) *P. aeruginosa* ATCC 27853 C) *S. aureus* ATCC 6538

El complejo EPS-AgNPS presenta una actividad inhibitoria elevada ya que la concentración mínima inhibitoria encontrada para *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli* fue de 29.25 nM. Por el contrario, la concentración mínima inhibitoria registrada para *S.aureus* fue de 58.5 nM (Figura 17). Es evidente que la inhibición bacteriana responde de una forma dosis dependiente entre las cepas analizadas.

### **5.11 Pruebas de inhibición de formación de biopelícula con el composito EPS-AgNPS**

El composito EPS-AgNPs presenta una actividad antibiopelícula considerable ya que la concentración mínima inhibitoria de biopelícula encontrada para *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli* fue de 43.5 nM. Por el contrario, la concentración mínima inhibitoria registrada para *S.aureus* fue de 175 nM (Figura 13).

Se observa que las nanopartículas biosintetizadas inhiben el crecimiento bacteriano de forma dosis dependiente. Las concentraciones inhibitorias para la formación de biopelícula presentan mayores valores que los necesitados para inhibir solamente el crecimiento microbiano.



**Figura 18. Inhibición de formación de biopelícula utilizando EPS-AgNPs. A) *E. coli* ATCC11229 B) *S.aureus* ATCC6538 C) *P.aeruginosa* ATCC27853**



## 6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 6.1 Cinética de crecimiento y producción de Exopolisacárido de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L

Se realizó una cinética de crecimiento de la levadura *R. mucilaginosa* UANL-001L para conocer la dinámica de la misma en medio mineral. Se observó, que la cepa inicia la fase media exponencial a las 12 horas con una concentración de  $3 \times 10^7$  células y una OD 600 nm de 0.7. De misma forma, se llega a la fase estacionaria a las 36 horas, alcanzando una densidad celular de  $3 \times 10^7$  UFC/mL con una absorbancia de 2. Estos resultados son similares a los reportados por Cho y colaboradores los cuales reportaron que una cepa de *Rhodotorula glutinis* alcanza la fase exponencial a las 24 horas llegando a la fase estacionaria a las 72 horas[32]. Cho y colaboradores reportaron que la cepa de *Rhodotorula glutinis* alcanzo la fase estacionaria a las 54 horas. González y colaboradores en el 2013 encontraron que la cepa de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L iniciaba la fase logarítmica a las 12 horas, comenzando la fase estacionaria a las 30 horas aproximadamente[39]. Las diferencias en las curvas de crecimiento pueden deberse a que los microorganismos utilizados son diferentes, la composición de los medios es distinta y que las condiciones de cultivo varían, por lo tanto las cepas de levadura tienden a tener un metabolismo específico para cada condición.

La cinética de producción de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L se realizó a intervalos regulares de tiempo. Se observó que la producción se incrementa a partir de las 48 horas de cultivo alcanzando una producción máxima de 19 mg/ml a las 96 horas[39]. El incremento en la producción del polímero se asocia estrechamente con la fase estacionaria de crecimiento, por ende podemos deducir que la síntesis del polisacárido extracelular se lleva cabo principalmente cuando no existe una división celular constante. Este comportamiento ha sido observado anteriormente en otras cepas de *Rhodotorula sp.* los autores proponen que posiblemente al terminarse la fuente de nitrógeno y no poder sintetizarse más biomasa hay un cambio en el metabolismo, priorizando la célula la síntesis de carbohidratos, tales como trehalosa, glicógeno y exopolisacáridos [37, 55].

## **6.2 Identificación molecular de *R. mucilaginosa* UANL-001L**

Como punto siguiente, se prosiguió a determinar la identidad de la levadura por métodos moleculares. Para esto se amplificó la región ITS1-ITS2 del ARN ribosomal, obteniendo una secuencia de 550 pb, la cual concuerda con otras secuencias anteriormente reportadas [56]. Enseguida se construyó un árbol filogenético utilizando nuestra secuencia y regiones homólogas de diferentes miembros del género *Rhodotorula sp.* El resultado de este análisis nos demuestra que la levadura pertenece a la especie de *Rhodotorula mucilaginosa*.

### 6.3 Caracterización del Exopolisacárido por SEM y FT-IR

Se llevó a cabo la caracterización parcial del polímero por medio de espectroscopia infrarroja para examinar sus grupos funcionales. Primeramente la microestructura del exopolisacárido presenta diversas capas de filamentos compactos y presenta porosidad. Al contar con poca porosidad y estructuras laminares este polisacárido cuenta con potencial para el desarrollo de películas plásticas así como propiedades gelificantes y emulsificantes[57].

A continuación se realizó un análisis en el espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier FTIR (figura 12), con el objetivo de identificar los grupos funcionales representativos en el exopolisacárido. El análisis FTIR reveló un estiramiento amplio en la zona de absorción de  $3328\text{ cm}^{-1}$ , el cual corresponde al grupo hidroxilo del polisacárido, se ha reportado que este grupo es responsable de la solubilidad del EPS en agua[58]. La absorción débil a  $2920\text{ cm}^{-1}$  se asigna a la vibración del estiramiento C-H del grupo alifático  $\text{CH}_2$ , el cual otorga características hidrofóbicas al exopolímero, al contar también con grupos funcionales que otorgan una solubilidad parcial en agua el EPS analizado puede presentar propiedades emulsificantes[59]. El pico de absorción en  $1645\text{ cm}^{-1}$  puede representar el estiramiento del anillo de manosa o grupos carbonilo. De misma forma la absorción a  $1365\text{ cm}^{-1}$  puede indicar la presencia de grupos carboxilo. Los picos de absorción encontrados entre la región de  $1200$  a  $1000\text{ cm}^{-1}$

son característicos de las bandas glicosídicas, el amplio pico a  $1019\text{ cm}^{-1}$  indica la presencia de polisacáridos[60].

#### **6.4 Síntesis y caracterización de las nanopartículas de plata**

La formación de nanopartículas puede ser observada cualitativamente por un cambio en la coloración de la solución, tornándose amarillo-café al reducirse los átomos de plata, esto concuerda con el pico de absorción a 420 nm de las nanopartículas, ocasionando que la solución sea visible en la coloración antes descrita [50]. La espectroscopia de absorción UV-visible nos permite cuantificar la resonancia del plasmón superficial típica de las AgNPS[61]. Al analizar por espectroscopia UV-VIS las nanopartículas sintetizadas, se presentó un pico pronunciado de absorción a los 420 nm, éste es característico de partículas con un tamaño promedio de diámetro de 50 nm [50]. Basándonos en la morfología del espectro de absorción, se puede deducir que las nanopartículas sintetizadas son esféricas, son estables y presentan una distribución de tamaño uniforme. Estas características sugieren que las AgNPS fueron estabilizadas por el exopolisacárido[50].

Enseguida se realizó un análisis FT-IR para conocer los posibles grupos funcionales implicados en la estabilización de las AgNPS. Generalmente los polisacáridos extracelulares contienen grupos funcionales con carga negativa (amidas, carboxilos e hidroxilos) los cuales pueden interaccionar con cationes

metálicos[62]. En este caso al analizar por FT-IR el complejo EPS-AgNPS se observan diferencias respecto al EPS puro. La intensidad de los picos encontrados en  $3328\text{ cm}^{-1}$  (OH) ,  $1365\text{ cm}^{-1}$  (COOH) y  $1019\text{ cm}^{-1}$  (C-O) se encontró disminuida al compararlos con el EPS puro. Esto sugiere que los grupos carboxilos e hidroxilos identificados (figura 14) del EPS interaccionan con los cationes de plata Ag(I) disminuyendo la intensidad de los picos de presentes en el EPS, estabilizándose los átomos de plata para una posterior reducción y nucleación. [58, 63].

### **6.5 Análisis de la actividad antibacteriana y antibiopelícula del exopolisacárido producido por *R. mucilaginosa* UANL-001L**

Para conocer si el exopolímero producido cuenta con la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano, se realizó un ensayo de microdilución utilizando las cepas: *E. coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Las especies antes mencionadas son representativas del grupo de patógenos causantes de la mayoría de los padecimientos asociados a biopelículas; ocasionando principalmente infecciones urinarias, infecciones asociadas a catéteres, infecciones del tracto biliar, infecciones en heridas, rinosinusitis, otitis, queratitis y endocarditis.

En los ensayos de inhibición se utilizaron tratamientos de EPS a diferentes concentraciones para elucidar si existe un efecto dosis dependiente. Al analizar los resultados se observó un efecto inhibitorio dosis dependiente del EPS en el

crecimiento de *S. aureus*, exhibiendo una reducción del 96 % al utilizarse un tratamiento de 2500 ppm EPS. Por el contrario en *E. coli* y *P. aeruginosa* la mayoría de los resultados no mostraron una diferencia significativa ( $p < .005$ ) al compararlos con el control, los tratamientos con 2500 ppm exhibieron un 27 % y un 24 % de inhibición respectivamente para *E. coli* y *P. aeruginosa*. Por esta razón la actividad antibacteriana del EPS se presenta en el siguiente orden *S.aureus*>*E.coli*>*P.aeruginosa*.

El exopolisacárido afecta en mayor grado a *S.aureus* entre las cepas ensayadas, diversos autores han reportado el mismo fenómeno, donde las bacterias Gram positivas son más susceptibles que las Gram negativas al efecto antibacteriano de diversos exopolisacáridos. Se ha sugerido que las diferencias estructurales en la pared celular de las bacterias afectan la acción antimicrobiana de los exopolisacáridos[64].

Actualmente el mecanismo exacto de inhibición no se conoce, pero se sugiere que las interacciones electrostáticas entre el EPS y la superficie celular juegan un papel importante en la actividad antibacteriana[65]. Rafaat y colaboradores proponen que para las bacterias Gram positivas, el ácido teicoico podría funcionar como punto de anclaje para la interacción entre el EPS y la superficie celular, permitiendo la posterior alteración de la membrana celular [62]. De misma forma Zhang y colaboradores, sugieren que los EPS serían capaces de modificar la estructuras de los lipopolisacáridos presentes en la pared celular ocasionando una desestabilización de la misma[66].

La desestabilización de la superficie celular ocasionaría un cambio en la permeabilidad y por lo tanto el contenido intracelular podría fugarse al medio externo. Esto fue confirmado He Feng y colaboradores los cuales cuantificaron el contenido de proteínas extracelulares por la exposición a EPS, observaron que la fuga de proteínas al medio iba aumentando con el tiempo, además al visualizar las células en TEM encontraron un cambio en la morfología en la superficie, lo cual sugiere una lisis celular[17].

Para determinar el espectro de la actividad antibiopelícula del exopolisacárido, se realizó un ensayo de biopelícula en microplaca utilizando las cepas bacterianas anteriormente descritas. Como se observa en la figura 16, el EPS fue capaz de reducir el establecimiento de biopelícula de las cepas utilizadas, sin embargo la actividad del mismo varió entre las mismas. El EPS presenta un efecto inhibitorio dosis dependiente sobre la formación de biopelícula de *S. aureus*, presentándose una reducción del 96 % al utilizar un tratamiento de 2500 ppm. Al comparar este resultado con otros anteriormente descritos, se encontró que el exopolisacárido producido por *R. mucilaginosa* UANL-001L exhibe mayor inhibición a una menor concentración que los EPS producidos por *Lactobacillus plantarum* YW32 (5000 ppm) y *Streptococcus phocae* PI80 (5000 ppm) los cuales inhibieron un 45 % y 51 % la formación de biopelícula respectivamente[23, 26].

Al examinar los efectos del EPS sobre la biopelícula de *P. aeruginosa*, encontramos que el tratamiento con 2500 ppm inhibió un 30 %. Kim y

colaboradores reportaron que el r-EPS de *Lactobacillus acidophilus* A4 a una concentración de 1000 ppm reducía el 40 % de la formación de biopelícula[67], igualmente Kanmani y colaboradores describieron que el EPS de *E. faecium* MC13 reducía el biofilm de *P.aeruginosa* en un 15 %[24]. Por último se observó que los tratamientos con EPS promovieron la formación de biopelícula de *E. coli*. Este efecto ha sido reportado anteriormente, el polisacárido capsular A101 producido por la bacteria *Vibrio sp.QY101* estimuló la formación de biopelícula de *P. aeruginosa* ATCC27853 y CS1, *S. aureus* Col y *E. faecalis* OG1RF hasta en un 33 % al comparar con el control[68].

Estos datos demuestran que el espectro de acción antibiopelícula del EPS de *R. mucilaginosa* es amplio, ya que afecta tanto a bacterias Gram positivas como a Gram negativas. Al comprobar que el EPS puede inhibir el crecimiento de las bacterias utilizadas, pero al no encontrar una CMI en el rango utilizado de concentraciones se puede deducir que no toda la actividad antibiopelícula del EPS es debida al efecto citotóxico del mismo, el efecto antibiopelícula de los exopolisacáridos tiende a ser multifactorial por lo cual es difícil que se genere resistencia, en este caso el EPS actuaría como surfactante modificando las propiedades de las superficies impidiendo la adhesión bacteriana, inhibiendo la agregación celular, modificando la expresión de genes esenciales para la formación de biopelículas o disminuyendo el número de células bacterianas[18, 19]. Adicionalmente, Rubinstein y colaboradores [69], describen que la presión osmótica generada por la acumulación de exopolisacáridos (hasta el 90 % en peso seco de la biopelícula) en las biopelículas de *Bacillus subtilis*, puede



desencadenar la inhibición de genes esenciales para la formación de la matriz extracelular y por lo tanto la formación de biopelícula. Por lo anterior concluyeron que probablemente los cambios físicos como la presión osmótica puedan regular negativamente el crecimiento de las biopelículas.

Por las características antes descritas, los polisacáridos antibiopelícula presentan características interesantes para ser aplicados en la industria y en área médica. Debido a la gran problemática de infección bacteriana en dispositivos médicos (principalmente en válvulas de corazón, prótesis e instrumentos médicos) y en infecciones crónicas (ulceras diabéticas o fibrosis quística) diversos autores han sugerido el desarrollo de recubrimientos basados en exopolisacáridos para evitar la adhesión bacteriana y posterior formación de biopelícula[18, 19].

Para efectos de esta investigación encontramos que el EPS de *R. mucilaginosa* UANL-001L presento mayor actividad antimicrobiana contra *S. aureus* inhibiendo en un 96 % la formación de biopelícula, este patógeno es de gran importancia médica ya que la mayoría de las infecciones nosocomiales e infecciones en dispositivos médicos son causados por esta especie en particular. Por lo cual el desarrollo de recubrimientos antimicrobianos con EPS representa una oportunidad promisorio para evitar la colonización e infección por *S. aureus*.

## 6.6 Análisis de la actividad antibacteriana y antibiopelícula de EPS-AgNPS

La actividad antibacteriana del composito EPS-AgNPS fue analizada por el método de microdilución (figura 17). Los resultados indican que las bacterias utilizadas fueron inhibidas en una forma dosis dependiente. Entre las cepas utilizadas, *S. aureus* ATCC 6538 presentó mayor resistencia a las nanopartículas metálicas al ser inhibida completamente por una concentración de 58.5 nM, por otro parte la CMI para *E. coli* y *P. aeruginosa*, fue de 29.25 nM. Este resultado nos indica que las nanopartículas de plata sintetizadas cuentan con un amplio espectro de inhibición bacteriana, ya que son efectivas contra bacterias Gram positivas y negativas. De forma general las bacterias Gram positivas presentan mayor resistencia debido al grosor de su pared celular (20-80 nm) comparada con la pared de las Gram negativas (7-9 nm)[70].

Rasulov y colaboradores reportan que la CMI de nanopartículas de plata para *E. coli* ATCC11229 y *S. aureus* ATCC 6538 fue de 30 µg/mL y 50 µg/mL respectivamente[71]. Por otra parte Monhanty y colaboradores determinaron la CMI para *S. aureus* y *P. aeruginosa* en 2 µM[72]. Por ultimo Morones y colaboradores, reportan que la CMI de AgNPS para *Pseudomona aeruginosa* y *E. coli* fue de 75 µg/mL[73]. Al comparar nuestros resultados con la literatura nos percatamos que las concentraciones inhibitorias fueron menores que las

reportadas. Con esto podemos deducir que la susceptibilidad de las bacterias frente a las AgNPS varía de cepa en cepa.

La actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata es de origen multifactorial. Morones y colaboradores por medio de microscopia electrónica, encontraron que las AgNPS interaccionaban con la superficie celular, ocasionando su desestabilización y un cambio de permeabilidad[73]. Esto en consecuencia se reflejaría en una lisis celular, daño a enzimas y proteínas estructuras, inhibición de la cadena respiratoria a nivel celular[70].

La actividad antibiopelícula del composito EPS-AgNPS fue determinada con diferentes patógenos en un ensayo de microplaca. La figura 18 muestra el efecto de las AgNPS sobre la formación de biopelícula de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Se observó un efecto inhibitorio dosis dependiente para todas las cepas bacterianas. Para *S. aureus* se alcanzó una inhibición del 100 % al utilizar un tratamiento de 175.5 nM de AgNPS, por el contrario para *E. coli* y *P. aeruginosa* se obtuvo el mismo efecto con una concentración menor (43.87 nM). Cabe destacar que al utilizar estas concentraciones no se presentó crecimiento bacteriano aparente. Por lo tanto las nanopartículas sintetizadas no solo exhiben actividad antibiopelícula sino también bactericida.

Monhanty y colaboradores reportaron que las AgNPS estabilizadas con almidón podían inhibir el 80 % la formación de biopelícula para *P. aeruginosa* y *S. aureus*[72]. Igualmente Kanmani y colaboradores encontraron que una

concentración de 100 nM inhibía las biopelículas de *S. epidermis* y *P. aeruginosa*[74]. Por ultimo Sanyasi y colaboradores encontraron que una concentración de 50  $\mu$ M fue necesaria para reducir [75]de acción antibiopelícula corresponde al mismo de la actividad antibacteriana antes descrito.

Debido a las propiedades mostradas por las nanopartículas sintetizadas en este proyecto de investigación, se vislumbra su uso potencial como biocida contra patógenos de importancia médica. Optimizando las condiciones de síntesis y de funcionalización con el exopolisacárido, se podrían formular recubrimientos híbridos metal/poliméricos para dispositivos médicos o superficies industriales donde sea crítico disminuir la colonización e infección bacteriana.

## 7. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de investigación se confirmó la identidad molecular de la cepa de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L por medio de la secuenciación del RNA ribosomal. Posteriormente se determinaron las cinéticas de crecimiento y producción de exopolisacárido para la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L en medio mineral, encontrándose que la cepa investigada alcanza la fase estacionaria alrededor de las 35 horas, obteniendo una tasa máxima de producción de 19 mg/ml de EPS a las 96 horas. La caracterización del EPS por FT-IR reveló los siguientes grupos funcionales: hidroxilo, metil, carboxilo y carbonilo. De misma forma por su morfología y microestructura se sugiere su capacidad para formar películas plásticas.

El exopolisacárido producido por *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L presenta capacidad para inhibir de forma significativa el crecimiento plantónico y biopelícula de las siguientes cepas: *E. coli* ATCC 11229, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC6538.

Adicionalmente el EPS presenta propiedades estabilizantes en la síntesis de nanopartículas, lo cual se reflejó al obtener nanopartículas de plata estables y con una probable morfología esférica. Por último, El complejo EPS-nanopartículas presenta propiedades antimicrobianas contra las cepas de *E. coli* ATCC 11229, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC6538.

## 8. PERSPECTIVAS

El exopolisacárido analizado en este trabajo exhibió actividad antibacteriana y antibiopelícula contra *E. coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Es evidente que el EPS es altamente efectivo contra *S. aureus* al inhibir en un 96% la formación de biopelícula. Predominantemente, las cepas de *S. aureus* son las principales causantes de la mayoría de las infecciones por biopelículas en ambientes hospitalarios, por lo cual el desarrollo y uso de recubrimientos formulados con el exopolisacárido de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L resulta altamente promisorio.

Para poder evaluar de forma más extensa la aplicación biomédica del exopolisacárido aquí estudiado, sería de gran impacto el caracterizar la composición y la estructura del mismo, de igual manera analizar la citotoxicidad del EPS en diferentes líneas celulares de humano así como en modelos animales. Estos estudios nos darían bases para realizar optimizaciones en la funcionalidad del mismo, por ejemplo agregando grupos químicos que potencien la actividad antimicrobiana o amplíen el rango de potenciales aplicaciones.

La síntesis de nanopartículas desarrollada en este trabajo sirve como base para optimizar las condiciones de producción de nanopartículas de plata así como su potencial funcionalización con otro tipo de biomoléculas. De misma forma el método desarrollado da pauta para explorar la síntesis de nanopartículas metálicas con múltiples aplicaciones.

## 9. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Región ITS1-ITS2 del ARN ribosomal de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L

5'-GGAGTCCGAACTCTCACTTTCTAACCCCTGTGCACTTGTTTGGGATAGTAA  
CTCTCGCAAGAGAGCGAACTCCTATTCACCTATAAACACAAAGTCTATGA  
ATGTATTAATTTTATAACAAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGG  
CTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG  
CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCATGGT  
ATTCCGTGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGAATACTTCAACCCTCCTC  
TTTCTTAATGATTGAAGAGGTGTTTGGTTTCTGAGCGCTGCTGGCCTTTA  
CGGTCTAGCTCGTTCGTAATGCATTAGCATCCGCAATCGAACTTCGGATT  
GACTTGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGAATTCTAGTCTTCGGATTAGA  
GCCGGGTTGGGTTAAAGGAAGCTTCTAATCAGAATGTCTACATTTTAAGA  
TTAGATCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCA-3'

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Walsh, C. and G. Wright, *Introduction: antibiotic resistance*. Chemical reviews, 2005. **105**(2): p. 391-394.
2. Tan, Y.-T., D.J. Tillett, and I.A. McKay, *Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria*. Molecular medicine today, 2000. **6**(8): p. 309-314.
3. Control, C.f.D. and Prevention, *Antibiotic resistance threats in the United States, 2013*. Atlanta: CDC; 2013. 2015.
4. Patel, R., *Biofilms and antimicrobial resistance*. Clinical orthopaedics and related research, 2005. **437**: p. 41-47.
5. Mandal, S.M., et al., *Challenges and future prospects of antibiotic therapy: from peptides to phages utilization*. Frontiers in pharmacology, 2014. **5**: p. 105.
6. Penesyan, A., M. Gillings, and I.T. Paulsen, *Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities*. Molecules, 2015. **20**(4): p. 5286-5298.
7. Cassir, N., J.-M. Rolain, and P. Brouqui, *A new strategy to fight antimicrobial resistance: the revival of old antibiotics*. Frontiers in microbiology, 2014. **5**: p. 551.
8. Faulkner, D.J., *Marine natural products*. Natural product reports, 2001. **18**(1): p. 1R-49R.
9. Fenical, W. and P.R. Jensen, *Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria*. Nature chemical biology, 2006. **2**(12): p. 666-673.
10. Williams, P.G., *Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics*. Trends in biotechnology, 2009. **27**(1): p. 45-52.
11. Bertrand, S., et al., *Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery*. Biotechnology advances, 2014. **32**(6): p. 1180-1204.
12. Hatoum, R., S. Labrie, and I. Fliss, *Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications*. Frontiers in microbiology, 2012. **3**.
13. Karwehl, S. and M. Stadler, *Exploitation of fungal biodiversity for discovery of novel antibiotics*. 2016.
14. Mahapatra, S. and D. Banerjee, *Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications*. Microbiology insights, 2013. **6**: p. 1.



15. Pavlova, K.I., *Production of Polymers and Other Compounds of Industrial Importance by Cold-Adapted Yeasts*, in *Cold-adapted Yeasts*. 2014, Springer. p. 397-415.
16. Van Bogaert, I.N., S.L. De Maeseneire, and E.J. Vandamme, *Extracellular polysaccharides produced by yeasts and yeast-like fungi*, in *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. 2009, Springer. p. 651-671.
17. He, F., et al., *Studies on antibacterial activity and antibacterial mechanism of a novel polysaccharide from Streptomyces virginia H03*. Food Control, 2010. **21**(9): p. 1257-1262.
18. Rendueles, O., J.B. Kaplan, and J.M. Ghigo, *Antibiofilm polysaccharides*. Environmental microbiology, 2013. **15**(2): p. 334-346.
19. Bernal, P. and M.A. Llamas, *Promising biotechnological applications of antibiofilm exopolysaccharides*. Microbial biotechnology, 2012. **5**(6): p. 670-673.
20. Valle, J., et al., *Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(33): p. 12558-12563.
21. Rendueles, O., et al., *Screening of Escherichia coli species biodiversity reveals new biofilm-associated antiadhesion polysaccharides*. MBio, 2011. **2**(3): p. e00043-11.
22. Wu, S., et al., *Antibiofilm and Anti-Infection of a Marine Bacterial Exopolysaccharide Against Pseudomonas aeruginosa*. Frontiers in microbiology, 2016. **7**.
23. Wang, J., et al., *Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by Lactobacillus plantarum YW32*. International journal of biological macromolecules, 2015. **74**: p. 119-126.
24. Kanmani, P., et al., *Synthesis and functional characterization of antibiofilm exopolysaccharide produced by Enterococcus faecium MC13 isolated from the gut of fish*. Applied biochemistry and biotechnology, 2013. **169**(3): p. 1001-1015.
25. Kavita, K., et al., *Characterisation and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances from Oceanobacillus iheyensis*. Carbohydrate polymers, 2014. **101**: p. 29-35.
26. Kanmani, P., et al., *Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium Streptococcus phocae PI80 and its functional characteristics activity in vitro*. Bioresource Technology, 2011. **102**(7): p. 4827-4833.

27. Li, Y., et al., *Production, purification, and antibiofilm activity of a novel exopolysaccharide from Arthrobacter sp. B4*. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2015. **45**(2): p. 192-204.
28. Wirth, F. and L.Z. Goldani, *Epidemiology of Rhodotorula: an emerging pathogen*. Interdisciplinary perspectives on infectious diseases, 2012. **2012**.
29. Hernández-Almanza, A., et al., *Rhodotorula glutinis as source of pigments and metabolites for food industry*. Food Bioscience, 2014. **5**: p. 64-72.
30. Elinov, N.P., et al., *Mannan produced by Rhodotorula rubra strain 14*. Carbohydrate Research, 1979. **75**: p. 185-190.
31. Takita, J., S. Katohda, and H. Sugiyama, *Structural determination of an exocellular mannan from Rhodotorula mucilaginosa YR-2 using ab initio assignment of proton and carbon NMR spectra*. Carbohydrate research, 2001. **335**(2): p. 133-139.
32. Cho, D.H., H.J. Chae, and E.Y. Kim, *Synthesis and characterization of a novel extracellular polysaccharide by Rhodotorula glutinis*. Applied biochemistry and biotechnology, 2001. **95**(3): p. 183-193.
33. WANG, H., et al., *Extraction, chemical components analysis and identification of antioxidation of polysaccharide from Rhodotorula*. China Brewing, 2009. **11**: p. 011.
34. Crich, D., W. Li, and H. Li, *Direct Chemical Synthesis of the  $\beta$ -Mannans: Linear and Block Syntheses of the Alternating  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Mannan Common to Rhodotorula glutinis, Rhodotorula mucilaginosa, and Leptospira biflexa*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(46): p. 15081-15086.
35. Ramirez, M.A.J.R., *Characterization and Safety Evaluation of Exopolysaccharide Produced by Rhodotorula minuta BIOTECH 2178*. International Journal of Food Engineering, 2016. **2**(1).
36. Matsuo, K., E. Isogai, and Y. Araki, *Utilization of exocellular mannan from Rhodotorula glutinis as an immunoreactive antigen in diagnosis of leptospirosis*. Journal of clinical microbiology, 2000. **38**(10): p. 3750-3754.
37. Kim, J.H., E.Y. Kim, and K.H. Chu. *Biopolymer Production by the Yeast Rhodotorula glutinis*. in *Advanced Materials Research*. 2012. Trans Tech Publ.
38. ZHANG, R., et al., *Effects of Different Amount of Rhodotorula benthicain Diet on the Feeding and Growth of Scopthalmus*

- maximus* L. Journal of Hebei Normal University (Natural Science Edition), 2013. **6**: p. 016.
39. Garza, M.T.G., et al., *Metal-Induced Production of a Novel Bioadsorbent Exopolysaccharide in a Native Rhodotorula mucilaginosa from the Mexican Northeastern Region*. PloS one, 2016. **11**(2): p. e0148430.
  40. Pérez, D.B., *Bioproducción de materiales híbridos polímerometálicos con actividad antimicrobiana mediante competencia microbiana*, in *Facultad de Ciencias Químicas*. 2013, Universidad Autónoma de Nuevo León: Monterrey, México. p. 54.
  41. Shukla, A.K. and S. Iravani, *Green Synthesis and Spectroscopic Characterization of Nanoparticles*, in *Nanoscience in Food and Agriculture 1*. 2016, Springer. p. 65-99.
  42. Medina-Ramirez, I., et al., *Green synthesis and characterization of polymer-stabilized silver nanoparticles*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2009. **73**(2): p. 185-191.
  43. Rai, M., A. Yadav, and A. Gade, *Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials*. Biotechnology advances, 2009. **27**(1): p. 76-83.
  44. Durán, N., et al., *Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several Fusarium oxysporum strains*. Journal of nanobiotechnology, 2005. **3**(1): p. 1.
  45. Ravindran, A., P. Chandran, and S.S. Khan, *Biofunctionalized silver nanoparticles: advances and prospects*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013. **105**: p. 342-352.
  46. Sharma, V.K., R.A. Yngard, and Y. Lin, *Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities*. Advances in colloid and interface science, 2009. **145**(1): p. 83-96.
  47. Palza, H., *Antimicrobial polymers with metal nanoparticles*. International journal of molecular sciences, 2015. **16**(1): p. 2099-2116.
  48. White, T.J., et al., *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. PCR protocols: a guide to methods and applications, 1990. **18**(1): p. 315-322.
  49. McGuire, G. and F. Wright, *TOPAL 2.0: improved detection of mosaic sequences within multiple alignments*. Bioinformatics, 2000. **16**(2): p. 130-134.

50. Paramelle, D., et al., *A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra*. Analyst, 2014. **139**(19): p. 4855-4861.
51. Andrews, J.M., *Determination of minimum inhibitory concentrations*. Journal of antimicrobial Chemotherapy, 2001. **48**(suppl 1): p. 5-16.
52. O'Toole, G.A., *Microtiter dish biofilm formation assay*. JoVE (Journal of Visualized Experiments), 2011(47): p. e2437-e2437.
53. Motulsky, H., *Analyzing data with GraphPad prism*. 1999: GraphPad Software Incorporated.
54. Costa N, W.M.A., Hannon J., Beresford, T., *Rheological, microscopic and primary chemical characterization of the exopolysaccharide produced by Lactococcus lactis*. Dairy Science and Technology, 2012. **92**(3): p. 219-235.
55. Cescut, J., et al., *Carbon accumulation in Rhodotorula glutinis induced by nitrogen limitation*. Biotechnology for biofuels, 2014. **7**(1): p. 1.
56. Arendrup, M., et al., *ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections*. Clinical Microbiology and Infection, 2014. **20**(s3): p. 76-98.
57. Poli, A., et al., *Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea*. Archaea, 2011. **2011**.
58. Subudhi, S., et al., *Purification and characterization of exopolysaccharide bioflocculant produced by heavy metal resistant Achromobacter xylosoxidans*. Carbohydrate polymers, 2016. **137**: p. 441-451.
59. Shetty, A.D., et al., *Multidrug resistant pathogenic bacterial biofilm inhibition by Lactobacillus plantarum exopolysaccharide*. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2016. **8**(1): p. 7-14.
60. Liu, Y., et al., *Production, structural characterization and gel forming property of a new exopolysaccharide produced by Agrobacterium HX1126 using glycerol or D-mannitol as substrate*. Carbohydrate polymers, 2016. **136**: p. 917-922.
61. Elsupikhe, R.F., et al., *Green sonochemical synthesis of silver nanoparticles at varying concentrations of κ-carrageenan*. Nanoscale research letters, 2015. **10**(1): p. 1.
62. Chen, X., J.-K. Yan, and J.-Y. Wu, *Characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles prepared with a fungal*

- exopolysaccharide in water*. Food Hydrocolloids, 2016. **53**: p. 69-74.
63. Sathiyarayanan, G., et al., *Synthesis of carbohydrate polymer encrusted gold nanoparticles using bacterial exopolysaccharide: a novel and greener approach*. RSC Advances, 2014. **4**(43): p. 22817-22827.
  64. Raafat, D., et al., *Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound*. Applied and environmental microbiology, 2008. **74**(12): p. 3764-3773.
  65. Li, S. and N.P. Shah, *Antioxidant and antibacterial activities of sulphated polysaccharides from Pleurotus eryngii and Streptococcus thermophilus ASCC 1275*. Food chemistry, 2014. **165**: p. 262-270.
  66. Zhang, J., et al., *Physicochemical characteristics and bioactivities of the exopolysaccharide and its sulphated polymer from Streptococcus thermophilus GST-6*. Carbohydrate polymers, 2016. **146**: p. 368-375.
  67. Kim, Y. and S.H. Kim, *Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic Escherichia coli O157: H7*. Biochemical and biophysical research communications, 2009. **379**(2): p. 324-329.
  68. Jiang, P., et al., *Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium Vibrio sp. QY101*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18514.
  69. Shmuel M. Rubinstein, I.K.-G., Anna Mcloon, Liraz Chai, Roberto Kolter, Richard Losick, David A Weitz, *Osmotic Pressure Can Regulate Matrix Gene Expression in Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology, 2012. **86**(2).
  70. Singh, R., et al., *Bacteriagenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications*. Applied microbiology and biotechnology, 2015. **99**(11): p. 4579-4593.
  71. Rasulov, B., et al., *Synthesis of silver nanoparticles on the basis of low and high molar mass exopolysaccharides of Bradyrhizobium japonicum 36 and its antimicrobial activity against some pathogens*. Folia microbiologica, 2016. **61**(4): p. 283-293.
  72. Mohanty, S., et al., *An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2012. **8**(6): p. 916-924.

73. Morones, J.R., *The bactericidal effect of silver nanoparticles*. Nanotechnology, 2005. **16**: p. 2346-2353.
74. Kanmani, P. and S.T. Lim, *Synthesis and structural characterization of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its antimicrobial activity against food and multidrug resistant pathogens*. Process Biochemistry, 2013. **48**(7): p. 1099-1106.
75. Sanyasi, S., et al., *Polysaccharide-capped silver Nanoparticles inhibit biofilm formation and eliminate multi-drug-resistant bacteria by disrupting bacterial cytoskeleton with reduced cytotoxicity towards mammalian cells*. Scientific reports, 2016. **6**.

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Jesús Augusto Vázquez Rodríguez

Candidato para el grado de  
Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

**Tesis:** Síntesis y análisis de las propiedades antimicrobianas y antibiopelícula de materiales biopolímero-plata.

**Edad:** 26 años

**Campo de estudio:** Desarrollo de agentes antimicrobianos

### **Biografía:**

Datos personales: Nacido el 3 de diciembre de 1989, en la ciudad de Tampico, Tamaulipas. Hijo de Luz María Rodríguez Arellano y José Jesús Vázquez Silva.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Biotecnología Genómica en el 2013