

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**USO DEL EXOPOLISACÁRIDO DE *RHODOTORULA MUCILAGINOSA*  
UANL-001L COMO AGENTE ESTABILIZADOR EN LA SÍNTESIS DE  
NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PARA LA OBTENCIÓN DE  
COMPUESTOS HÍBRIDOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y  
ANTIBIOFILM**

**POR**

**MC JAVIER ALBERTO GARZA CERVANTES**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR  
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA APLICADA**

**OCTUBRE, 2019**

USO DEL EXOPOLISACÁRIDO DE *RHODOTORULA MUCILAGINOSA* COMO  
AGENTE ESTABILIZADOR EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS  
METÁLICAS PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS HÍBRIDOS CON  
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIBIOFILM

Aprobación de tesis:

---

Dr. José Rubén Morones Ramírez  
Presidente

---

Dra. María Elena Cantú Cárdenas  
Secretario

---

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño  
Vocal

---

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos  
Vocal

---

Dra. Selene Sepúlveda Guzmán  
Vocal

---

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez  
Sub-Directora de Posgrado

USO DEL EXOPOLISACÁRIDO DE *RHODOTORULA MUCILAGINOSA* COMO  
AGENTE ESTABILIZADOR EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS  
METÁLICAS PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS HÍBRIDOS CON  
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIBIOFILM

Revisión de tesis:

---

Dr. José Rubén Morones Ramírez  
ASESOR

---

Dra. María Elena Cantú Cárdenas  
COMITÉ TUTORIAL

---

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos  
COMITÉ TUTORIAL

---

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño  
COMITÉ TUTORIAL

---

Dra. Selene Sepúlveda Guzmán  
COMITÉ TUTORIAL

---

Dr. Leonardo Ríos Solís  
COMITÉ TUTORIAL

---

Dra. María Aracely Hernández Ramírez  
SUBDIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a todas las personas e instituciones que, directa e indirectamente, estuvieron presentes durante mi vida profesional.

A CONACyT y la Facultad de Ciencias Químicas por el apoyo económico que me brindaron durante el periodo en que se desarrolló este trabajo, así como por las instalaciones y equipos necesarios para el desarrollo de los experimentos realizados.

A mi asesor de tesis, el Dr. Rubén Morones, por darme nuevamente un espacio y la oportunidad de trabajar a su lado y con su grupo de investigación, por apoyarme en cada momento de duda y compartir sus conocimientos para ayudarme a mejorar mi vida profesional.

A mi comité tutorial, Dra. Ma. Elena Cantú, Dr. Xristo Zárate y Dr. Alberto Gómez, por su apoyo, por tomarse el tiempo necesario para evaluar mis avances en este proyecto, compartir los conocimientos en su área para aconsejarme, guiarme y aplicar las correcciones necesarias en mi investigación para no perder el sendero.

A mis profesores, por tener la paciencia necesaria para impartir los conocimientos en las diferentes materias que cursé durante este doctorado, por orientarme cuando no comprendía el tema y apoyarme cuando presentaba dudas.

A mis padres, por siempre estar presentes cuando los necesito, por apoyarme desde que decidí mi carrera universitaria. Por todo el apoyo emocional e incondicional y les agradezco criarme de esta manera ya que gracias a ustedes puedo estar orgulloso de quién soy y de quién me he convertido. A mis hermanas por estar conmigo y aguantarme todos estos años.

A mi esposa, por todo el cariño que me ha dado a través de mi vida académica, por comprender que hay veces que un experimento puede tomar más tiempo del previsto y por siempre estar ahí cuando la necesito. A mis compañeros de

generación que me permitieron compartir esta etapa y ayudarme en mis experimentos.

## DEDICATORIA

*El presente trabajo está dedicado a mi familia.*

*A mis padres, Ana María Cervantes Villegas y Javier Garza Martínez, mis modelos de vida y ejemplo a seguir.*

*A mis hermanas Ana Elisa Garza Cervantes y Paola Alejandra Garza Cervantes.*

*A mi esposa Laura Lizeth Carrillo Alanis.*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>CAPÍTULO 1</b>	14
<b>INTRODUCCIÓN</b>	14
1.1 La biotecnología	14
1.2 Exopolisacáridos microbianos	14
1.3 Desarrollo de agentes terapéuticos contra enfermedades infecciosas	17
1.4 Resistencia bacteriana a los antibióticos y la influencia de los biofilms	20
1.5 Métodos para la determinación de efectos antimicrobianos de potenciales agentes terapéuticos	23
1.6 Uso de terapias combinatorias para el tratamiento de enfermedades infecciosas	25
1.7 Nanotecnología y las nanopartículas	27
1.7.1 Síntesis de nanopartículas metálicas	28
1.7.2 Influencia del agente reductor	28
1.7.3 Influencia del polímero estabilizador	28
1.7.4 Síntesis verde de nanopartículas metálicas	29
1.7.5 Caracterización de nanopartículas metálicas	30
<b>CAPÍTULO 2</b>	32
<b>ANTECEDENTES</b>	32
<b>CAPÍTULO 3</b>	37
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	37
3.1 Hipótesis	37
3.2 Objetivos	37
3.2.1 Objetivo General	37
3.2.2 Objetivos específicos	37
<b>CAPÍTULO 4</b>	39
<b>METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b>	39
4.1 Material y reactivos	39
4.2 Equipo de laboratorio	39

4.3 Cepas de bacterias y levadura utilizadas	40
4.4 Cultivo de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UANL-001L y obtención de EPS	40
4.5 Síntesis de nanopartículas	41
4.6 Caracterización de las nanopartículas obtenidas	41
4.7 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas sintetizadas	42
4.8 Determinación de la actividad antibiofilm de las NPs sintetizadas	43
4.9 Estudio de toxicidad <i>in vivo</i> de las nanopartículas sintetizadas	44
4.10 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de antibióticos	44
4.11 Realización de pruebas de inhibición de crecimiento combinatorias antibiótico-compósito en cepas clínicas resistentes	45
4.12 Realización de pruebas combinatorias antibiótico-compósito de producción de biofilm en cepas clínicas resistentes	47
4.13 Determinación del efecto de los compósitos sobre la integridad de la membrana celular bacteriana	48
4.13 Determinación del efecto de los compósitos sobre la integridad de la membrana celular bacteriana	48
4.15 Aprobación del comité de ética	49
4.16 Manejo y disposición de residuos	49
<b>CAPÍTULO 5</b>	<b>50</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>50</b>
5.1 Extracción de exopolisacárido a partir de un cultivo de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UANL-001L	50
5.2 Síntesis y caracterización de nanopartículas de cobre estabilizadas con EPS	51
5.3 Síntesis y caracterización de nanopartículas de zinc estabilizadas con EPS	58
5.4 Síntesis y caracterización de nanopartículas de níquel estabilizadas con EPS	65
5.5 Pruebas antimicrobianas de las nanopartículas sintetizadas en EPS	72



5.6 Efecto de las nanopartículas sintetizadas en EPS sobre la producción de biofilm	75
5.7 Análisis de la toxicidad <i>in vivo</i> de las nanopartículas sintetizadas en EPS	76
5.8 Efecto de los antibióticos y su combinación con compósitos con nanopartículas sobre el crecimiento microbiano	78
5.9 Efecto de los antibióticos y su combinación con compósitos con nanopartículas sobre la producción de biofilm	86
5.10 Efecto de los compósitos sobre la integridad de la membrana celular bacteriana	88
<b>CAPÍTULO 6</b>	<b>90</b>
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>90</b>
<b>CAPÍTULO 7</b>	<b>102</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>102</b>
<b>CAPÍTULO 8</b>	<b>104</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>104</b>
<b>CAPÍTULO 9</b>	<b>106</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>106</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de algunos polímeros microbianos	15
Figura 2. Objetivos comunes de diversos antibióticos	18
Figura 3. Mecanismos generales de resistencia a antibióticos	19
Figura 4. Evolución de la resistencia a los antibióticos	20
Figura 5. Combinaciones de prueba típicas para ensayos checkerboard de un antimicrobiano A y un Antimicrobiano B	26
Figura 6. Espectro FTIR del exopolisacárido extraído de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> .	50
Figura 7. Espectros UV-Vis de las NPs de Cu obtenidas en las reacciones del diseño de experimentos	53
Figura 8. Espectro IR de las nanopartículas de Cu sintetizadas	54
Figura 9. Micrografía obtenida por SEM de las nanopartículas de cobre sintetizadas	55
Figura 10. Espectro UV-Vis de R3 <i>resuspendido</i> en agua ultra pura	56
Figura 11. Estabilidad de las nanopartículas de Cu en medio de cultivo	57
Figura 12. Espectros UV-Vis de las NPs de Zn obtenidas en las reacciones del diseño de experimentos	60
Figura 13. Espectro UV-Vis de nanopartículas de Zn obtenidos en la reacción R22	61
Figura 14. Espectro IR de las nanopartículas de Zn sintetizadas	62
Figura 15A. Caracterización de nanopartículas de ZnO estabilizadas con EPS mediante TEM	63
Figura 15B. Caracterización de nanopartículas de ZnO estabilizadas con EPS mediante TEM	64
Figura 15C. Caracterización de nanopartículas de ZnO estabilizadas con EPS mediante TEM	65
Figura 16. Espectros UV-Vis de las NPs de Ni obtenidas en las reacciones del diseño de experimentos	67

Figura 17. Espectro UV-Vis de nanopartículas de Ni obtenidos en la reacción R16	68
Figura 18. Espectro IR de las nanopartículas de Ni sintetizadas	69
Figura 19A. Caracterización mediante TEM de nanopartículas de NiO estabilizadas con EPS	70
Figura 19B. Caracterización mediante TEM de nanopartículas de NiO estabilizadas con EPS	71
Figura 19C. Caracterización mediante TEM de nanopartículas de NiO estabilizadas con EPS	72
Figura 20. Actividad antimicrobiana de EPS y los compósitos sintetizados contra cepas resistentes a antibióticos	73
Figura 21. Actividad inhibidora de biofilm de EPS y los compósitos sintetizados contra cepas resistentes a antibióticos	76
Figura 22. Parámetros de función renal de ratas Wistar tratadas con EPS y los compósitos sintetizados	77
Figura 23. Efecto inhibitorio de fracciones de MIC de antibióticos potenciados por el compósito EPS-NiO contra la cepa clínica de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente	80
Figura 24. Análisis de las interacciones antibiótico-compósito EPS-NiO contra la cepa clínica de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente	82
Figura 25. Efecto inhibitorio de fracciones de MIC de antibióticos potenciados por el compósito EPS-NiO contra la cepa clínica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente	84
Figura 26. Análisis de las interacciones antibiótico-compósito EPS-NiO contra la cepa clínica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente	86
Figura 27. Producción de biofilm de la cepa clínica de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente al utilizar fracciones de MIC de antibióticos en combinación con el compósito EPS-NiO	87
Figura 28. Producción de biofilm de la cepa clínica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente al utilizar fracciones de MIC de antibióticos en combinación con el compósito EPS-NiO	88

---

Figura 29. Efecto de los compósitos con NiONPs y ZnONPs, y de EPS sobre la segregación de azúcares reductores al medio de cultivo

---

89

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diseño de experimentos utilizado en la síntesis de nanopartículas de Cu	51
Tabla 2. Diseño de experimentos utilizado en la síntesis de nanopartículas de Zn	58
Tabla 3. Diseño de experimentos utilizado en la síntesis de nanopartículas de Ni	65
Tabla 4. Concentraciones mínimas inhibitorias de antibióticos	78

## NOMENCLATURA

%	Por ciento, porcentaje
°C	Grados centígrados
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
Ác.	Ácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Plata
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de plata
Al	Aluminio
ANOVA	Análisis de varianza
ATCC	American Type Culture Collection
Au	Oro
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
C	Carbono
Cd	Cadmio
CDC	Centro de Control y Prevención de Enfermedades
Células/mL	Células por mililitro
cm	Centímetro
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Co	Cobalto

Cu	Cobre
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de cobre
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	Sulfato de cobre pentahidratado
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDS	Espectroscopía de energía de dispersión de rayos-X
EPS	Exopolisacárido, exopolisacáridos
ESKAPE	Enterococcus, Staphylococcus, Klebsiella, Acinetobacter, Pseudomonas, Enterobacter
<i>et al.</i>	Y otros
EtOH	Etanol
FTIR	Infrarrojo con transformada de Fourier
H	Hidrógeno
h	hora
HAuCl <sub>4</sub>	Ácido cloroáurico
IR	Infrarrojo
JCPDS	Joint Committee on Powder Diffraction Standards
kV	Kilovoltios
L	Litro
LB	Luria-Bertani
LBb	Luria-Bertani ajustado con buffer
LC <sub>50</sub>	Concentración letal 50
LD <sub>50</sub>	Dosis letal 50
LSD	Diferencia mínima significativa

m	metro
M	Molar
<i>mar</i>	Resistencia múltiple a antibióticos
MBC	Concentración mínima bactericida
mg	Miligramo
mg/kg	Miligramos por kilogramo
mg/L	Miligramo por litro
mg/mL	Miligramos por mililitro
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mQH <sub>2</sub> O	Agua ultrapura
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
mV	milivolts
NaOH	Hidróxido de sodio
Ni	Níquel
NIH	National Institute of Health
NiO	Óxido de níquel
NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Sulfato de níquel hexahidratado
nm	Nanómetro
NOAEL	No observed adverse effects level



NP	Nanopartícula
NPM	Nanopartícula metálica
O	Oxígeno
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>PaR</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multi-resistente
PBP	Proteína de unión a penicilina
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAED	Difracción de electrones de área seleccionada
<i>SaR</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> multi-resistente
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SPN	Schizophylano
SPR	Resonancia de plasmón de superficie
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
Ti	Titanio
UFC/mL	Unidad formadora de colonia por mililitro
UV-Vis	Ultravioleta-visible
YM	Medio para levadura
Zn	Zinc
ZnO	Óxido de zinc
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Sulfato de zinc heptahidratado

## RESUMEN

**MC Javier Alberto Garza Cervantes Fecha de graduación: julio, 2019**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Título de Estudio: Uso del exopolisacárido de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L como agente estabilizador en la síntesis de nanopartículas metálicas para la obtención de compuestos híbridos con actividad antimicrobiana y antibiofilm.**

**Número de páginas: 125**

**Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con orientación en Microbiología Aplicada**

**Área de estudio: Desarrollo de Agentes Terapéuticos**

El consumo global de los antibióticos ha causado que los microorganismos estén sometidos bajo un estrés selectivo que los obliga a adaptarse a estas nuevas condiciones de vida que contienen altas concentraciones de antibióticos, por lo cual emergen cepas bacterianas con variedad de resistencias a diferentes familias de estos fármacos. Recientemente se ha estudiado el uso de nanopartículas metálicas en esta área, ya que poseen efecto antimicrobiano, tanto contra cepas silvestres como resistentes, que las convierten en candidatos potenciales para su uso como agentes terapéuticos; adicionalmente los exopolisacáridos microbianos se han utilizado en la síntesis de nanopartículas para mejorar su biocompatibilidad, reduciendo así el riesgo de utilizarlos en una variedad de aplicaciones.

En el presente trabajo se realizó la síntesis de nanopartículas metálicas, de Cu, Ni y Zn, utilizando el exopolisacárido de la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L, una cepa aislada en la región noreste del estado, como agente estabilizante, así como ácido ascórbico como agente reductor, con el fin de obtener compósitos antimicrobianos que posean la capacidad de inhibir el crecimiento y la producción de biofilm de dos cepas clínicas resistentes a antibióticos aisladas de pacientes internados en un hospital del municipio de Monterrey.

Estableciendo un diseño de experimentos  $3^3$ , que incluía 3 concentraciones a probar de cada componente (sal metálica, exopolisacárido y ácido ascórbico) se logró sintetizar nanopartículas estables de NiO y ZnO, se caracterizaron mediante diferentes técnicas observando los plasmones de resonancia de superficie característicos para estos metales, mediante

espectrofotometría infrarroja se observó que las nanopartículas se encuentran en la red polimérica del exopolisacárido utilizado, mediante microscopía electrónica se determinó un tamaño de partícula de 26 y 8 nm para las nanopartículas de Ni y Zn, respectivamente, sintetizadas en la matriz del EPS.

Dos cepas bacterianas resistentes a antibióticos, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, fueron utilizadas para conocer la actividad antimicrobiana de los compósitos obtenidos. Utilizando el compósito que contiene nanopartículas de NiO se logró inhibir tanto el crecimiento como la producción de biofilm de la cepa grampositiva a una concentración de 3 mg/mL, así como a la cepa gramnegativa a una concentración de 2 mg/mL. Mientras que el compósito que contiene las nanopartículas de ZnO solo logró inhibir el crecimiento de la cepa grampositiva a una concentración de 1 mg/mL, siendo incapaz de inhibir el crecimiento de la cepa gramnegativa ni la producción de biofilm de ambas cepas.

El compósito que contiene las nanopartículas de NiO fue utilizado en combinación con diferentes antibióticos con el fin de conocer si es capaz de potenciar el efecto de los mismos. Utilizando combinaciones de concentraciones menores a la inhibitoria se observó que este compósito es capaz de potenciar el efecto inhibitorio de los antibióticos ampicilina, kanamicina y cloranfenicol contra la cepa grampositiva, así como el efecto inhibitorio de kanamicina, cloranfenicol y ciprofloxacino contra la cepa gramnegativa. De manera similar se utilizaron combinaciones del compósito y antibióticos para conocer si es capaz de inhibir la producción de biofilm, observando que este efecto inhibitorio es nulo.

Con el fin de conocer la posibilidad de utilizar los compósitos para tratamiento de infecciones se determinó la toxicidad *in vivo*, vía oral, de ambos compósitos, así como del exopolisacárido sin modificar. Se encontró que los tres compuestos a una concentración mayor a las inhibitorias encontradas no posee efecto tóxico, evidenciado por la falta de diferencia significativa en los valores de parámetro renales determinados.

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que el compósito de exopolisacárido que contiene nanopartículas de NiO es un buen candidato para utilizarse como agente antimicrobiano en el tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* al poseer la capacidad de inhibir tanto el crecimiento como la producción de biofilm, así como no presentar toxicidad vía oral en ratas Wistar.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 La biotecnología

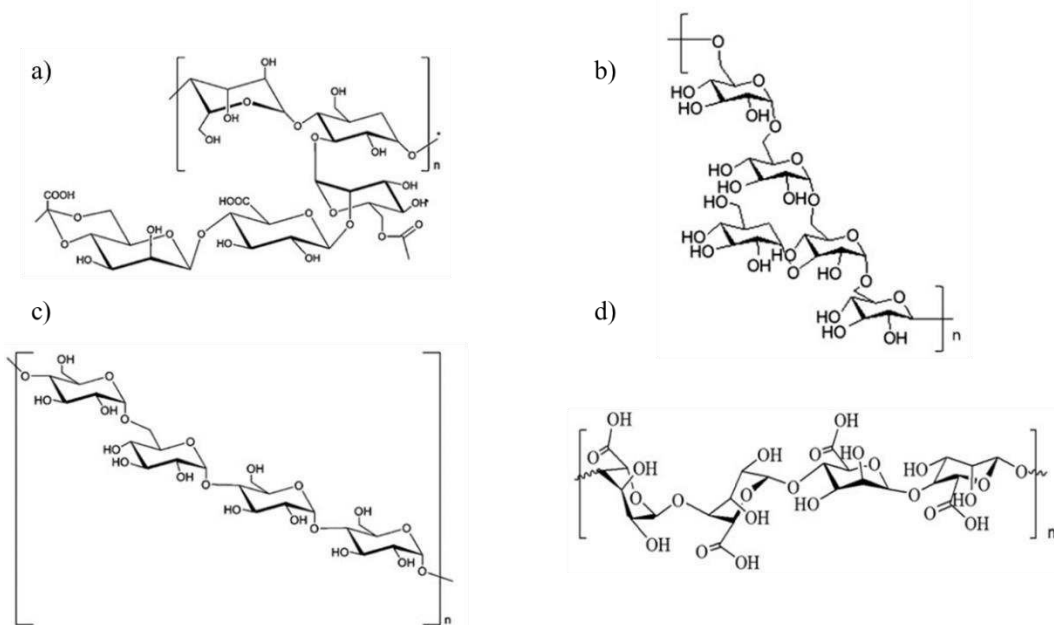
La palabra “biotecnología” fue acuñada alrededor de 1919 por el ingeniero agricultor húngaro Karoly Ereky, quien utilizó el término en el título de su libro “Biotecnología de la producción de carne, grasa y leche en industrias agrícolas a gran escala”. Ereky había establecido una granja de cerdos donde estos cerdos (llamados “máquinas biotecnológicas”) convertían productos y desechos agrícolas en carne, grasa y piel.

La biotecnología, como sugiere su nomenclatura, es la combinación de la biología y la tecnología. Implica el uso de la tecnología para utilizar, modificar o mejorar completamente, o una parte de, un sistema biológico para el bienestar humano o industrial. También se puede definir como “el uso integrado de la bioquímica, microbiología e ingeniería para alcanzar aplicaciones tecnológicas de las capacidades de los microorganismos y los cultivos celulares”. Por lo tanto, la biotecnología nos permite utilizar a los microorganismos como pequeñas *máquinas* productoras de compuestos de interés (como Ereky utilizaba a los cerdos como productores de carne) tales como proteínas, secuencias genéticas, metabolitos primarios precursores de compuestos de interés industrial, así como metabolitos secundarios de interés, como son los antibióticos y los exopolisacáridos (1).

### 1.2 Exopolisacáridos microbianos

En las últimas décadas se ha incrementado rápidamente el interés en polisacáridos y glicosustancias tanto en un punto de vista *fundamental*, con respecto a determinar su estructura, como en un punto de vista de *aplicación*, considerando su utilidad biotecnológica. Esta última característica deriva

enormemente en la diversidad de las propiedades estructurales y funcionales, incluso cuando están mayoritariamente compuestos por bloques (azúcares) muy similares. Con los polisacáridos se pueden obtener gran variedad de estructuras, moléculas extendidas como xantanos y schizofilanos; estructuras lineares con espirales al azar como los dextranos y pululanos; estructuras ramificadas como el glicógeno y la amilopectina; polianiones como los alginatos, pectinas, carrageninas, demás de policationes como lo son la microcelulosa y el quitosano (2).



**Figura 1. Estructura de algunos polímeros microbianos.** Composición y estructura de exopolímeros microbianos: a) Xantano, b) Dextrano, c) Pullulan y d) alginato.  $n$  representa el grado de polimerización, el cual puede diferir entre cepas y condiciones de cultivo. Imágenes tomadas de Sathiyarayanan *et al.* (3)

Los polisacáridos son polímeros de carbohidratos con una gran diversidad estructural, desde una estructura lineal del mismo monómero hasta estructuras altamente ramificadas de muchos azúcares. Hay dos tipos de polisacáridos, aquellos que sirven para almacenamiento de energía, y aquellos estructurales, comúnmente extracelulares, exopolisacáridos (EPS), producidos y secretados por microorganismos, que se acumulan fuera de la célula (4). Debido a su

diversidad en composición, estructura y propiedades físicas, los EPS se han utilizado para aplicaciones en alimentos, farmacéutica y otras industrias (5). El término exopolisacárido se ha utilizado ampliamente para describir polisacáridos externos a aquellos estructurales en la superficie del microorganismo y puede ser aplicado a los polímeros de composición variada (6). Se cree que los EPS microbianos contribuyen a diferentes funciones como la formación de biofilms, adherencia a superficies, protección contra condiciones ambientales adversas, protección de respuestas inmunológicas y comunicación entre los microorganismos (7). Se han caracterizado más de 30 EPS, varios son monopolisacáridos, pero la mayoría de estos son heteropolisacáridos que consisten en una mezcla de azúcares (4). Los EPS pueden variar entre cepas de la misma especie, así entre los EPS microbianos se encuentran la xantana, el alginato, gelano, pululano, ácido hialurónico, dextrán y el escleroglucano. Levaduras de diferentes géneros también son productoras de EPS, entre los que se encuentran mananos, glucanos, glucomananos, galactomananos y fosfomananos (8,9).

Recientemente, se ha descrito una función no esperada para estas moléculas, la capacidad de inhibir la producción de biofilms, conocidos como polisacáridos antibiofilm. A pesar de que el modo de acción de estos EPS aún no se conoce completamente, no se ha identificado acción biocida, lo que indica que su actividad antibiofilm es mediada por diferentes mecanismos. Se sugiere que estas moléculas actúan como modificadores de las propiedades físicas tanto de las superficies bióticas como las abióticas (10). Además, como polímeros de azúcares, tienen también la capacidad de actuar como inhibidores de lectina. Estas tienen la función de facilitar la adherencia de las bacterias a los hospederos (4). De esta forma, los EPS antibiofilm representan una alternativa prometedora para diversas aplicaciones médicas e industriales. En años recientes, los polisacáridos derivados de planta, animales y microorganismos recibieron mucha atención como agentes estabilizadores y/o reductores. Actualmente, los polisacáridos microbianos, especialmente los exopolisacáridos, están siendo

investigados y utilizados en la síntesis de diversas NPs metálicas para una variedad de aplicaciones (3).

### 1.3 Desarrollo de agentes terapéuticos contra enfermedades infecciosas

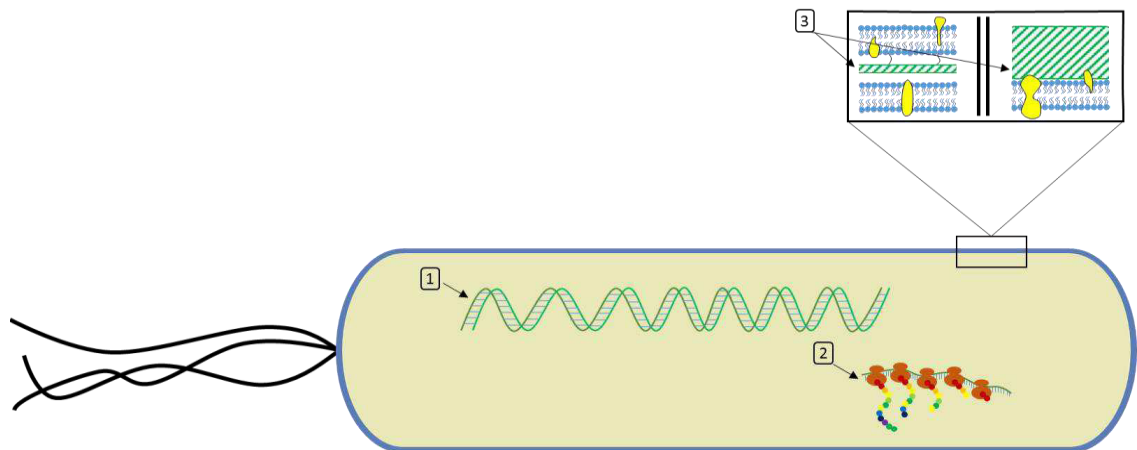
Uno de los acontecimientos de gran impacto en la terapéutica humana durante el siglo XX fue el descubrimiento de los antibióticos, iniciando con la penicilina de Fleming en 1928. A partir de este acontecimiento las compañías farmacéuticas comenzaron la producción a gran escala de una gran variedad de compuestos antimicrobianos obtenidos en la llamada “era dorada de los antibióticos”, entre 1940-1970 (11,12).

Los antibióticos actúan de distintas maneras sobre los microorganismos, sus mecanismos se pueden englobar en tres objetivos comunes (13): la síntesis de la pared celular, la síntesis de proteínas bacterianas y por último la replicación y reparación del DNA. Una de las familias de antibióticos que actúan a nivel de la síntesis de la pared celular es la de los  $\beta$ -lactámicos, estos ejercen su efecto sobre los dominios transpeptidasas y transglicosidasas, conocidas como proteínas de unión a penicilina (PBPs por sus siglas en inglés, *penicillin-binding proteins*), actuando como pseudosustratos que interrumpen la unión al sitio activo impidiendo el correcto entrecruzamiento de las cadenas peptídicas que conforman el peptidoglicano, dejando la célula mecánicamente débil y susceptible a daños por presión osmótica y lisis (13). Entre estos se encuentran ampicilina y meticilina. La primera es un derivado de la penicilina, introducida en 1967, que posee un grupo funcional carboxilo en lugar de un grupo amino (14); la segunda, un derivado semi-sintético, fue inicialmente utilizada contra cepas resistentes a penicilinas, mostrando buenos resultados al ser estable cuando es atacada por  $\beta$ -lactamasas (15).

La familia de los antibióticos aminoglucósidos interviene en las funciones celulares correspondientes a la síntesis de proteínas al unirse al sitio ribosomal-A (16) de la subunidad 30S de los ribosomas causando, una vez unida a la subunidad 50S (17), una mala interpretación de la lectura o una interrupción prematura de la síntesis proteica. Entre estos se encuentra la kanamicina, un

antibiótico de amplio espectro purificado en mayor parte como kanamicina A, y en menor grado como kanamicina B, C y D (18).

Entre los antibióticos que intervienen en la síntesis y reparación del DNA se encuentran las quinolonas, un grupo de antibióticos sintéticos que afecta tanto a bacterias grampositivas como gramnegativas. Estos actúan sobre la enzima topoisomerasa II, conocida como DNA girasa que se encarga de plegar y enrollar el DNA bacteriano, inhibiendo la subunidad A e interrumpiendo su actividad, dejando el DNA expuesto a la acción de las exonucleasas bacterianas (19). Uno de los antibióticos pertenecientes a esta familia es la fluoroquinolona ciprofloxacino, usado de manera rutinaria para el tratamiento de enfermedades infecciosas en vías urinarias (20).



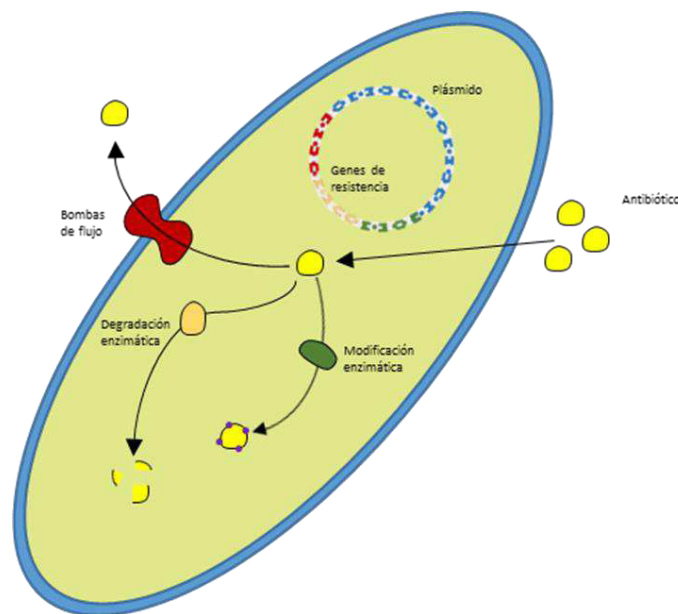
**Figura 2. Objetivos comunes de diversos antibióticos.** Representación de las estructuras bacterianas que son atacadas por una variedad de antibióticos; 1: la integridad de la doble cadena de DNA por ejemplo al ser atacada por las quinolonas dejando a este vulnerable; 2: la síntesis de proteínas se ve comprometida cuando los antibióticos, como los aminoglucósidos o los macrólidos, intervienen en el correcto ensamblaje de los ribosomas e interpretación de la cadena poli peptídica; y 3: la síntesis e integridad de la pared celular, la cual se ve comprometida cuando intervienen antibióticos como las penicilinas y derivados o las cefalosporinas impiden la formación de la pared celular.

Sin embargo, fue prematuro concluir que con estos descubrimientos y la amplia distribución entre la población que padeciera de infecciones se lograría



erradicar el problema. El aumento en el uso de los antibióticos durante las últimas décadas ha ejercido una presión selectiva en la comunidad microbiana del mundo, causando que las bacterias susceptibles a los compuestos antimicrobianos no sean capaces de sobrevivir, favoreciendo el crecimiento de aquellas bacterias capaces de resistir el efecto de uno o varios antibióticos (21,22).

Existen diferentes mecanismos por los cuales los microorganismos son capaces de resistir los efectos causados por los diversos antibióticos, entre los cuales se encuentran (13,23): la destrucción del antibiótico por la acción de enzimas bacterianas, forma en que actúan las enzimas beta-lactamasas en las cepas resistentes a penicilina y derivados; la modificación enzimática de los grupos funcionales del antibiótico, como la adición del fosfato terminal del ATP a las moléculas de kanamicina (24); y a través de estructuras proteicas llamadas bombas de flujo, encargadas de expulsar una gran variedad de moléculas dañinas hacia el exterior de la bacteria.

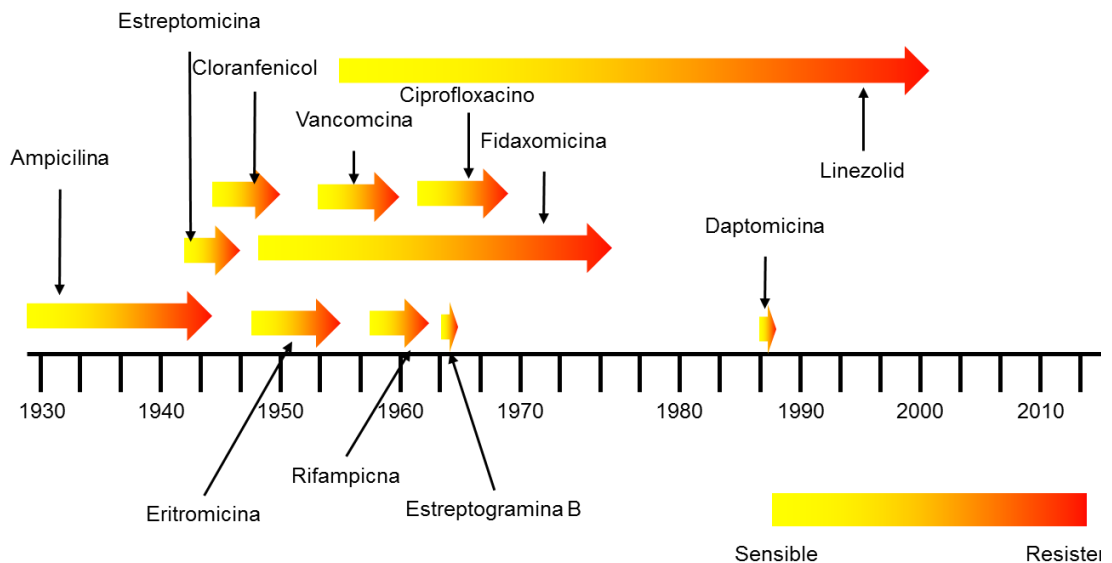


**Figura 3. Mecanismos generales de resistencia a antibióticos.** Representación gráfica de los diferentes mecanismos por los cuales un microorganismo puede crear resistencia a uno o varios antibióticos, mediante la expresión de diferentes tipos de proteínas codificadas en uno o varios plásmidos. Las bombas de flujo expulsan a los antibióticos del citosol; el antibiótico puede sufrir modificaciones por parte de las

enzimas al agregar/cambiar grupos funcionales que atenúen su función, así como sufrir degradación por acción de enzimas liberando fragmentos de la molécula original con nula actividad antimicrobiana.

#### 1.4 Resistencia bacteriana a los antibióticos y la influencia de los biofilms

La resistencia bacteriana a los antibióticos se puede definir como la capacidad de un microorganismo de sobrevivir a la exposición de un agente antimicrobiano, incluso a más de uno, al cual era originalmente vulnerable. Como ejemplo tenemos el caso de la penicilina, la cual comenzó a ser producida de manera industrial en el año 1943 disminuyendo dramáticamente la problemática referente a enfermedades infecciosas, sin embargo, después de unos cuantos años, 1947, comenzaron a aparecer casos de cepas microbianas resistentes a este antibiótico (25). Años más tarde, entre los años 1950-60s, se comenzaron a ver casos de bacterias como *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella* resistentes a múltiples fármacos (26), introduciendo una nueva amenaza que enfrentar en el área de las enfermedades infecciosas. El problema del crecimiento explosivo de bacterias resistentes ha empeorado en las últimas décadas, y combatirlo no ha sido fácil debido a una disminución en el número de nuevos agentes antibacterianos (27), limitando los tratamientos disponibles.



**Figura 4. Evolución de la resistencia a los antibióticos.** Representación temporal sobre la aparición de cepas resistentes a diversos antibióticos al incrementarse su venta y distribución a la población.

Esta problemática se ve reflejada de diferente manera entre países, en general es mayor en países en desarrollo que en países desarrollados. Entre las amenazas comunes se encuentra el grupo *ESKAPE* (28), que incluye los patógenos comúnmente más letales, entre ellos *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*. En México existe una falta de información acerca de la cantidad de antibióticos utilizados para propósitos clínicos y no-clínicos. Además es probable que los médicos mexicanos utilicen los antibióticos tan mal como sus colegas extranjeros, es decir, erróneamente en aproximadamente la mitad de los casos (29). En América latina (21), se reporta una elevada incidencia de infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* resistente a cefalosporinas de tercera generación, así como este último resistente a fluoroquinolonas, dos clases de fármacos importantes y muy utilizados para tratamientos de enfermedades infecciosas. En algunos entornos, hasta un 90% de los casos de infecciones hospitalarias son causadas por *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), lo cual significa que el tratamiento con los antibióticos habituales no es suficiente para combatir el problema. Se puede dar una idea de las complicaciones que estas enfermedades infecciosas pueden causar, se calcula que, en Canadá, MRSA genera un costo de entre \$42-59 millones de dólares anualmente (30). El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés, *Center of Disease Control and Prevention*) reporta (31), tan solo en el 2013, un total de 80 000 casos de infecciones y 11 000 muertes por MRSA, incluidas en los más de 2 millones de infecciones y más de 23 mil muertes por enfermedades infecciosas causadas por diferentes microorganismos incluidos en el grupo *ESKAPE*. De esta forma las enfermedades infecciosas representan el 26% de las muertes totales a nivel mundial (32), así como el lugar número 28 de diagnóstico más común en pacientes hospitalizados, en el caso de infecciones de piel y tejidos suaves (4). En un ambiente hostil, las bacterias buscarán sobrevivir y comenzarán a formar una matriz polimérica extracelular conocida como *biofilm* (ing. *biopelícula*) (34). Las

poblaciones bacterianas dentro de los biofilms expresan de manera diferente factores como moléculas de superficie, resistencia a antibióticos, aprovechamiento de nutrientes y factores de virulencia. Debido a la estructura de la red polimérica, dentro de los biofilms existen zonas en gradiente de nutrientes, metabolitos secundarios, crean zonas anóxicas y ácidas en su interior (35). Así, en las zonas donde exista una deficiencia de nutrientes puede desarrollarse un estado estacionario, que puede ser responsable de la resistencia a antibióticos asociada a los biofilms (36).

A pesar de que la matriz no inhibiría la penetración de antibióticos al interior del biofilm, puede retardar su ritmo de entrada el tiempo suficiente para que la población microbiana comience a expresar genes que medien la resistencia a los mismos (37). En un estudio, Gillis *et al.* (38) reportaron que, a diferencia de las células planctónicas (no formando biofilm), *P. aeruginosa* en biofilm resistió el efecto de azitromicina debido a una bomba de flujo, la cual solo fue expresada en presencia del antibiótico. En otros estudios se ha observado que en biofilms de *E. coli*, las cepas que poseen el locus *mar* (*ing. multiple antibiotic resistance; resistencia múltiple a antibióticos*) resisten al antibiótico ciprofloxacino de manera similar a aquellas cepas que no poseen el locus (39). De esta forma, es apreciable que se manifiestan múltiples mecanismos de resistencia a antibióticos en las células de un biofilm, dependiendo del tipo de bacteria o de antibiótico (35).

Las infecciones por biofilms son de gran importancia debido a que las bacterias exhiben una resistencia general a compuestos antimicrobianos, además de ser persistentes a pesar de las defensas constantes del huésped, se estima que son responsables de más del 65% de infecciones nosocomiales, así como de un 80% de todas las infecciones microbianas (35,40). Debido a esto, y a la creciente problemática de las bacterias resistentes a los diversos agentes antimicrobianos en existencia, la necesidad de poseer las herramientas para combatir esta problemática aumenta, encaminando a los diversos investigadores

en el área a buscar nuevas alternativas para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por este tipo de bacterias.

### 1.5 Métodos para la determinación de efectos antimicrobianos de potenciales agentes terapéuticos

Con la gran problemática de la resistencia a antibióticos, la necesidad de desarrollar nuevas posibilidades de tratamiento es evidente. Existen tres enfoques que se han aplicado en la búsqueda de nuevos antibióticos o agentes antimicrobianos: 1) *Cribado biodirigido*: basado en la búsqueda de compuestos activos obtenidos a partir de extractos de plantas, o compuestos extraídos de microorganismos en conjunto con pruebas *in vitro*; 2) *Cribado químico*: enfocado en la identificación de nuevas moléculas, sin tomar en cuenta su actividad biológica; 3) *Cribado sitio-dirigido*: donde se buscan compuestos que ataquen un objetivo definido. La principal desventaja de estos enfoques es que se necesita evaluar un inmenso número de metabolitos (12).

Conocer la susceptibilidad de un microorganismo a un agente antimicrobiano “nuevo” es un paso clave para el desarrollo de nuevas terapias capaces de combatir los microorganismos resistentes que actualmente se presentan en los múltiples casos de enfermedades infecciosas causadas por esta clase de microorganismos. Un dato sumamente útil es la concentración mínima inhibitoria (MIC, *ing. Minimum Inhibitory Concentration*), la cual se define como la concentración más baja necesaria para inhibir el crecimiento del microorganismo en condiciones óptimas para su crecimiento capaz de ser detectada a simple vista. Existen diferentes métodos para la determinación de la MIC, entre ellos están los métodos de difusión y de dilución.

Entre los métodos de difusión se encuentra el método de difusión en disco. Desarrollado en 1940 (41), este método es el utilizado de manera oficial en la mayoría de los laboratorios de análisis clínicos para determinar la susceptibilidad de un microorganismo a un agente antimicrobiano. En un ensayo típico, cajas de agar son inoculadas con una cantidad estandarizada de microorganismo expandiéndolo por todo el agar. Después, pequeños discos (aprox. 6 mm) de

papel filtro, impregnados con el compuesto de interés, son colocados en la superficie del agar. Después de incubar a las condiciones idóneas para el microorganismo utilizado se visualizan los halos de inhibición causados por la difusión del agente antimicrobiano en el agar. Existen variantes al método estándar de difusión, en los cuales se puede colocar el agente antimicrobiano es colocado en pocillos, de diámetro de 6-8 mm, realizados asépticamente. Para este método el agente debe ser colocado en solución, siendo no apropiado para compuestos en dispersión. A pesar de que el método de difusión esté tan estandarizado y sea de una gran utilidad en pruebas de importancia clínica, no es un método de excelencia para la determinación de la MIC, ya que es prácticamente imposible determinar la cantidad de agente antimicrobiano que se difundió del disco impregnado al agar, aunque puede ser utilizado para generar datos aproximados de la MIC y delimitar el rango de concentraciones a evaluar para el efecto antimicrobiano. Sin embargo, esta metodología presenta una gran ventaja, la cual es la posibilidad de evaluar el efecto de diferentes agentes antimicrobianos a la vez, así como su bajo costo, su simplicidad y la facilidad de interpretar los resultados obtenidos (42).

Los métodos de dilución son más apropiados para la determinación de la MIC de un compuesto, ya que ofrece la posibilidad de conocer la concentración del agente antimicrobiano tanto en los métodos en medio sólido, como aquellos en caldo (macro- o microdilución), siendo ambos capaces de medir cuantitativamente la actividad *in vitro* del compuesto de interés. Los métodos en caldo, tanto macro como microdilución, consisten en preparar diluciones seriadas, en relación 1:2, del agente antimicrobiano en un medio de cultivo líquido colocado en tubos (macrodilución) o en placas de 96 pocillos (microdilución). Estos son inoculados con una cantidad estandarizada de microorganismo, mezclados apropiadamente, para llevarse a incubar y observar el resultado al final de la prueba, generalmente 20-24 horas después. Generalmente se coloca como concentración final de microorganismo  $2-5 \times 10^5$  UFC/mL. En los métodos de medio sólido se sigue una metodología similar, preparando las diluciones en agar fundido, para luego vaciarse y una vez sólido inocular el microorganismo.

Sin embargo, estos métodos solo nos dicen si el compuesto es capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo, para conocer la concentración mínima bactericida (MBC, *ing Minimum Bactericidal Concentration*) es necesario realizar un cultivo sólido de aquellos pocillos, o tubos, sin crecimiento, siendo la MBC aquella concentración que sea capaz de impedir el crecimiento de los microorganismos en este cultivo sólido (42).

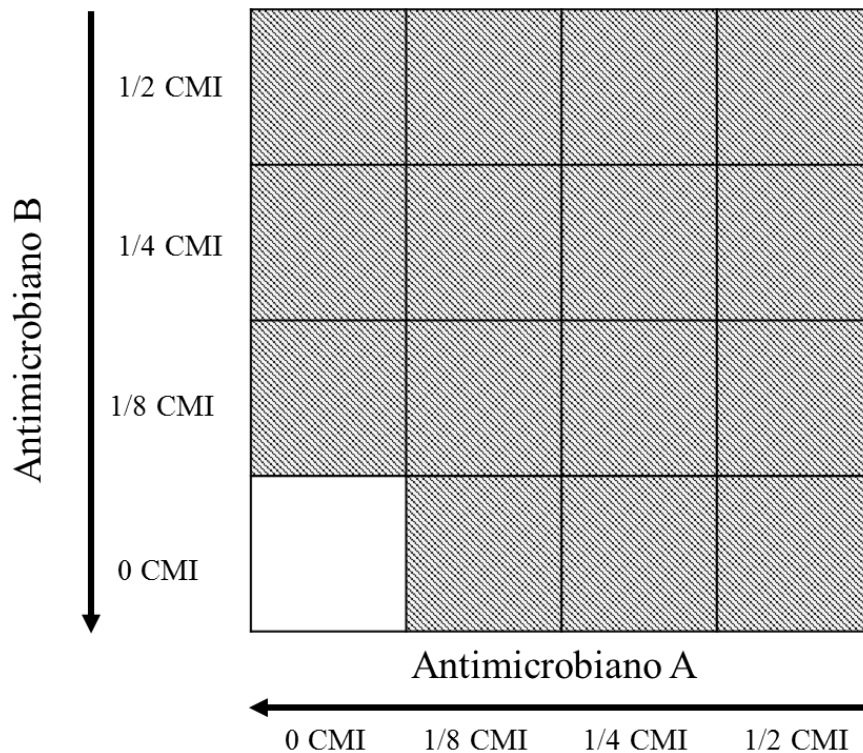
#### 1.6 Uso de terapias combinatorias para el tratamiento de enfermedades infecciosas

Para contrarrestar el problema de la resistencia a antibióticos, una atractiva estrategia es la reintroducción de antibióticos de uso actual y previo, a los cuales existe resistencia, y utilizarlos en combinación con otros agentes antimicrobianos o sensibilizantes (43). Generalmente, las terapias combinatorias utilizadas consisten en antibióticos  $\beta$ -lactámicos y un aminoglucósido o una fluoroquinolona, en su mayoría para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias gramnegativas(44).

A pesar de que existen ventajas teóricas sobre el uso de terapias combinatorias observadas tanto en ensayos *in vitro* como en estudios con animales, la evidencia clínica se encuentra aún en controversia. Sin embargo, el uso de las terapias combinatorias para el tratamiento de enfermedades infecciosas se justifica principalmente por tres razones: (i) la amplia cobertura empírica de dos agentes antimicrobianos con diferentes espectros de actividad, (ii) para aprovechar la sinergia observada en estudios *in vitro* de estos dos agentes comparados a cuando solo se utiliza uno de ellos y (iii) para prevenir o demorar el desarrollo de resistencia durante la terapia antimicrobiana (44).

Existe evidencia de que pacientes con infecciones causadas por microorganismos resistentes a múltiples antibióticos son más propensos a presentar un retraso en los efectos de una terapia efectiva y los riesgos de estos se pueden evitar con la adición de un segundo agente (45) Un beneficio potencial de agregar un segundo agente a la terapia antimicrobiana es el efecto sinérgico de la combinación, ya que podría eliminar el microorganismo más rápidamente

que en monoterapia (46). Para esto se puede evaluar el efecto de diferentes combinaciones de dos agentes antimicrobianos mediante la técnica *checkerboard*. El término *checkerboard* hace referencia al patrón formado por la múltiple dilución de dos agentes antimicrobianos en concentraciones menores a sus MICs contra el microorganismo de prueba. Generalmente se ponen a prueba cuatro o cinco diluciones de la MIC, en relaciones 1:2, además de incluir una fila (o columna) de pocillos con cada agente antimicrobiano solo. De esta forma, el ensayo checkerboard consiste en columnas de la droga A diluida sobre el eje x y filas de la droga B diluida sobre el eje y, dando como resultado que cada pocillo posee una combinación única de los agentes antimicrobianos a prueba (47). El efecto sinérgico puede determinarse como cuando el efecto combinado de los agentes antimicrobianos sea mayor al predicho a partir de sus efectos individuales (48).



**Figura 5. Combinaciones de prueba típicas para ensayos checkerboard de un antimicrobiano A y un Antimicrobiano B.** El recuadro blanco indica el cultivo control y los recuadros con sombra indican los pocillos de prueba.



## 1.7 Nanotecnología y las nanopartículas

La nanotecnología es la ciencia que estudia la materia en escala de  $10^{-9}$  m (nanómetros, *nm*), así como su manipulación en escala atómica y molecular (49). Es un campo de la ciencia interdisciplinario y prometedor que proporciona materiales a escala nanométrica con posibles aplicaciones médicas, eléctricas, mecánicas, catalíticas, fotónicas, biotecnológicas, entre otros. En las últimas décadas se ha incrementado el espectro de estas aplicaciones, y con esto el interés en el uso de nanopartículas (50). Las nanopartículas se definen como aquellas partículas con un tamaño entre 10-1000 nm, y dependiendo el método de síntesis se pueden obtener nanopartículas, nanoesferas, nanotubos, entre otros (51). Existen dos enfoques en la síntesis de nanopartículas que afectan considerablemente sus propiedades, denominadas como “*top-down*” y “*bottom-up*”. En la técnica *top-down* se trabaja con el material en bruto y se va reduciendo su tamaño hasta la escala nanométrica por diversas técnicas, como descomposición térmica, ablación láser, entre otras. La técnica de *bottom-up* (llamada también de auto-ensamblaje) la síntesis involucra un sistema homogéneo donde se producen las nanoestructuras por acción de un agente reductor (moléculas, polímeros, enzimas), donde intervienen factores como el medio y las condiciones de reacción (solventes, estabilizantes, temperatura, etc.) (49).

El enfoque *bottom-up*, es la técnica más utilizada en biotecnología, ya que tiene mayor posibilidad de generar nanoestructuras con menos defectos, composición química más homogénea. Varios métodos de síntesis se pueden agrupar en dos categorías: los enfoques termodinámicos o los enfoques cinéticos. En los termodinámicos el proceso consiste en generar una (i) supersaturación, (ii) nucleación, y (iii) el subsecuente crecimiento. En el enfoque cinético, la formación de nanopartículas se alcanza ya sea limitando la cantidad de precursor disponible para el crecimiento, o confinando el proceso a un espacio limitado (52).

Las NPs metálicas se utilizan en diversos campos como son los sistemas de almacenamiento electrónico, biotecnología, separación magnética y pre-concentración de analitos, vehículo para la entrega de fármacos y material genético (53), así como el desarrollo de agentes antibacterianos. Aquellas utilizadas en el campo de la biotecnología varían su tamaño entre los 10-500 nm, sin exceder los 700 nm, debido a las características que estos tamaños les proporcionan, entre las cuales se encuentra su alta área superficial que le confiere diversas propiedades (53,54).

#### 1.7.1 Síntesis de nanopartículas metálicas

Para la formación de NPs metálicas de tamaños homogéneos se obtiene en la mayoría de los casos por la combinación de bajas concentraciones de un soluto y una capa polimérica sobre las superficies de crecimiento. Aquí, varios tipos de precursores, agentes reductores, otros factores y métodos se han utilizado para promover o controlar la reacción de reducción, la nucleación inicial y el subsecuente crecimiento del núcleo inicial (52).

#### 1.7.2 Influencia del agente reductor

La distribución y el tamaño de las NPs varía significativamente con el tipo de agente reductor utilizado, en general, un reductor fuerte contribuye a una rápida reacción y favorece la formación de NPs de pequeño tamaño, mientras que un reductor débil induce una reacción lenta y la obtención de partículas relativamente grandes, sin embargo, puede resultar en una distribución de tamaños más homogénea. Si no se genera una nucleación secundaria, o formación de nuevos núcleos, una reducción lenta daría lugar a un crecimiento controlado por difusión, debido a que el crecimiento del núcleo sería controlado por la disponibilidad de átomos zero-valentes. Consecuentemente, se obtendría una distribución de tamaños homogénea (52).

#### 1.7.3 Influencia del polímero estabilizador

A pesar de que los polímeros estabilizadores se introducen principalmente para formar una monocapa en la superficie de las nanopartículas para prevenir

la aglomeración de las NPs, la presencia de estos polímeros durante la formación de estas puede influir en el proceso de crecimiento de las NPs. Las interacciones entre la superficie sólida y el polímero pueden variar significativamente por la química de la superficie sólida, el polímero, el solvente y la temperatura. Una fuerte adsorción de los polímeros podría ocupar los sitios de crecimiento para las NPs y por lo tanto reducir su tasa de crecimiento. Además, los polímeros pueden también interaccionar con el soluto, catalizador, o con el solvente de reacción, e intervenir en la reacción (52).

#### 1.7.4 Síntesis verde de nanopartículas metálicas

Existen diferentes métodos físicos y químicos para su síntesis, aunque usualmente suelen ser costosos y potencialmente dañinos para el ambiente, por lo que se buscan alternativas para obtenerlas de una manera “eco-amigable”. De esta forma se han propuesto métodos basados en utilizar organismos vivos o partes de ellos, como lo son plantas y microorganismos para la obtención de NPs, lo cual tiene como ventajas un bajo costo y tiempo de producción, seguridad y la posibilidad de producción a grandes volúmenes (55).

Para el desarrollo de la síntesis verde, se han propuesto tres factores importantes que deben considerarse: la elección de un solvente, un agente reductor y un material estabilizante, siendo todos no-tóxicos para el ecosistema (56). La síntesis biológica es un enfoque “eco-amigable” y costo-efectivo en donde se utilizan materiales renovables para la reducción del metal y estabilización de las NPs (57). Se han utilizado polvos y extractos de plantas para estos fines, sin embargo, estos llegan a tener una gran variedad de compuestos, lo cual puede afectar la síntesis. Los métodos de síntesis de NPs mediada por microorganismos son por mucho mejor a aquellos basados en utilizar plantas, ya que son de fácil manipulación bajo condiciones de laboratorio, además se pueden optimizar por modificaciones genéticas (58). Los EPS microbianos poseen la capacidad de coordinar iones metálicos, debido a esto se les considera una alternativa atractiva a los diversos compuestos que se utilizan en la síntesis físico/químicas. Estos EPS son clasificados como aniónicos, catiónicos o no-

iónicos, se cree que los polisacáridos polianiónicos, debido a gran cantidad de estos grupos funcionales, los cuales interaccionan fuertemente con los iones metálicos en el proceso de síntesis de NPs, logran un mejor control sobre la forma, tamaño y dispersión de las mismas, además, la capacidad de los EPS para formar películas se puede aprovechar para el almacenamiento de NPs metálicas sin presentarse aglomeración (59,60).

#### 1.7.5 Caracterización de nanopartículas metálicas

Conocer la forma y el tamaño de las nanoestructuras formadas es de gran importancia, ya que estos parámetros determinan sus propiedades físicas. Generalmente las técnicas que se utilizan para caracterizar estas estructuras son la medición del espectro UV-Vis, espectroscopia de infrarrojo (FTIR, *ing Fourier Transform Infrared*), microscopía electrónica, tanto de barrido (SEM, *ing Scanning Electron Microscopy*) como de transmisión (TEM, *ing Transmission Electron Microscopy*) acompañado con la espectroscopia de energía de dispersión de rayos-X (EDS, *ing Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) para conocer la composición elemental de la muestra. Cada una de estas técnicas nos da información sobre la naturaleza de la muestra sintetizada. Uno de los cambios más notorios en la síntesis de nanopartículas es el cambio de color entre la solución inicial y la dispersión de nanopartículas obtenidas, este cambio es debido a su plasmón de resonancia de superficie (SPR, *ing Surface Plasmon Resonance*) el cual se origina por el movimiento de la banda de electrones que interacciona con un campo electromagnético. El color que se observa es causado por la fuerte absorción de las nanopartículas metálicas cuando la frecuencia del campo electromagnético se vuelve resonante con el movimiento de los electrones. El SPR, además de evidenciar de manera instrumental que la síntesis de nanopartículas se llevó a cabo, nos ayuda a monitorear el crecimiento y la estabilidad de las NPs obtenidas (61). La técnica de TEM es ampliamente utilizada para estudiar el tamaño y la forma de las NPs sintetizadas, mientras que SEM además nos ayuda a analizar la morfología de las NPs. Una técnica de gran utilidad para la caracterización de NPs sintetizadas por metodologías verdes es

la medición de FTIR, ya que generalmente durante la síntesis y/o estabilización la NP recibe grupos funcionales provenientes del agente estabilizador. En una síntesis típica utilizando EPS, los grupos funcionales que se encuentran al analizar las NPs sintetizadas por FTIR incluyen grupos hidroxilo y carbonilos provenientes de ácidos carboxílicos entre otros(3).

## CAPÍTULO 2

### ANTECEDENTES

La resistencia a antibióticos es un problema que ha estado en constante presencia en nuestra sociedad, no solo a nivel hospitalario sino también en ambientes no hospitalarios. Así, el incremento en la posibilidad de encontrarse con una bacteria resistente a algún antibiótico es uno de los problemas más importantes a nivel mundial, amenazando cada vez a más personas con el paso del tiempo. Por esta razón, la necesidad de desarrollar nuevas formas de combatir esta problemática se incrementa (62).

Se sabe que el uso de diversos metales debido a sus propiedades antimicrobianas se practica desde la antigüedad en la historia de la humanidad. Antiguas civilizaciones utilizaron estos conocimientos con diversos fines en el ámbito sanitario. Se tienen registros del uso de cobre en el antiguo Egipto para esterilización de heridas en el pecho y agua potable (63), estas eran utilizadas directamente como sales de estos metales, como por ejemplo  $\text{CuSO}_4$  o  $\text{AgNO}_3$ . Recientemente el uso de nanopartículas metálicas se ha ganado su lugar en varias ramas de la ciencia, entre ellas el desarrollo de agentes antimicrobianos. Sin embargo, para la obtención de estas NPs se requiere utilizar diversidad de compuestos químicos que pueden, a corto o largo plazo, afectar el medio ambiente, por lo que se buscan métodos alternos para su obtención.

Los métodos bio-sintéticos tienen una mayor compensación en relación con los métodos clásicos, ya sea físicos o químicos, debido a su disponibilidad de más muestras biológicas y procedimientos eco-amigables. Así, diversas partes de plantas y microorganismos han sido ampliamente utilizados para la síntesis de NPs a través de varios procesos biológicos, enzimáticos y no enzimáticos (64). Se han investigado una amplia biodiversidad de plantas en la

síntesis de nanomateriales, utilizando desde las plantas completas hasta materiales derivados de ellas, como extractos, frutas, tejidos, entre otros (65).

Por otra parte, la síntesis verde de NPs no solo abarca el uso de extractos de plantas, sino también existe la posibilidad de obtener NPs utilizando polímeros, como los exopolisacáridos (EPSs), ya que estos pueden actuar no solo como agente reductor, sino también como estabilizador/encapsulador de las NPs formadas (66), disminuyendo de esta forma la posibilidad de obtener una amplia dispersión de tamaños. Chen *et al.* (67) utilizaron el polímero poli(N-isopropilacrilamida) para la síntesis de NPs de Ag, reportando que no solo el polímero sirvió como agente estabilizante, sino que promueve la adsorción de las NPs formadas. No todos los polímeros utilizados en la síntesis de NPs poseen la capacidad de actuar tanto de agente reductor como de agente estabilizador. Es aquí donde entran en juego el uso de agentes reductores no tóxicos para el medio ambiente, entre ellos se utilizan azúcares reductores, ácidos orgánicos, entre otros. Raveendran *et al.* (56) sintetizaron NPs de Ag a partir de una solución de  $\text{AgNO}_3$ , glucosa como agente reductor y almidón como agente estabilizador, calentando levemente la solución obtuvieron NPs con tamaño promedio de 5 nm. Musa *et al.* (68) sintetizaron NPs de Cu a partir de  $\text{CuSO}_4$  utilizando celulosa nano-cristalina como agente estabilizador y ácido ascórbico (vitamina C) como agente reductor, observando el cambio de color que evidencia la formación de NPs, las cuales tenían un tamaño menor a 5 nm.

Los EPSs poseen una variedad de propiedades, entre ellas la capacidad de adsorber/encapsular metales de transición en su red polimérica, debido a la variedad de grupos funcionales que poseen, en especial los grupos carboxilo, ya que son responsables de la alta capacidad de unión a metales que poseen estos polímeros. EPS de distintos microorganismos se han estudiado para medir sus capacidades de adsorción/reducción de metales de transición, así como la síntesis de nanopartículas a partir de estos polímeros. Además, los EPS son capaces de inhibir el crecimiento y la formación de biofilms de gran variedad de microorganismos. Valle *et al.* (69) utilizaron el EPS de una cepa de *E. coli* contra

una variedad de bacterias, encontrando que es capaz de inhibir *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Enterococcus*. En combinación con metales, Golberg *et al.* (70) utilizaron un EPS proveniente de la microalga *Porphyridium*, el cual posee iones de Cu(II) o Zn(II) acomplejados en su matriz, observando un cambio en su capacidad para inhibir la formación de biofilm en el material acomplejado con Cu(II). Distintos investigadores han estudiado la síntesis de nanopartículas con EPS de diversos microorganismos. Utilizando EPS de bacterias, Kanmani & Lim (50) sintetizaron NPs de Ag a partir de AgNO<sub>3</sub> utilizando el EPS de *Lactobacillus rhamnosus*, colocando la solución de Ag en contacto con la solución del polímero bajo agitación constante, al cabo de 10 horas observaron el cambio de coloración de incolora a amarilla, lo cual indica que obtuvieron NPs de Ag. Utilizando otra bacteria, Sathiyarayanan *et al.* (71) sintetizaron NPs de Au utilizando el EPS de *Bacillus megaterium* como agente reductor y estabilizante, colocando 5 mg/mL de EPS y 1 mM de HAuCl<sub>4</sub> a temperatura ambiente, observando cada 12 horas hasta alcanzar una coloración rojiza que evidenciaba la síntesis de NPs, obteniendo un tamaño promedio de 5-20 nm. Diversos estudios se han realizado también utilizando EPS de microorganismos eucariotas, como los hongos y las levaduras. Bae *et al.* (72) utilizaron *esquizofilano* (SPN, por sus siglas en inglés), aislado a partir de *Schizophyllum commune*, como molde para la formación de nanotubos de Au a partir de NPs. También, el SPN fue utilizado para la preparación de un nanocomposito de AgNP/SPN, donde el exopolímero fue tanto el agente reductor como estabilizante (73). Chen *et al.* (74) sintetizaron NPs de Ag(I) utilizando un EPS extraído del hongo *Cordyceps sinensis*, observando que utilizando 10 mM de AgNO<sub>3</sub> y 1 mg/mL de EPS calentando a 100°C por 60 min se obtenían NPs de tamaño cercano a los 40 nm.

En los últimos años, se ha estudiado el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de diversos metales de transición, entre los más utilizados se encuentran las NPs de Ag que se ha demostrado que poseen actividad antimicrobiana contra bacterias gramnegativas (75), aunque también se ha estudiado el efecto de NPs de otros metales de transición, como lo son el Cu, Zn,



Al, Ti, entre otros, para los cuales se ha observado actividad contra distintas cepas bacterianas tanto grampositivas como gramnegativas (76). Además, diversos grupos de investigación se han enfocado en observar si las NPs de metales son capaces de potenciar el efecto de antibióticos. Shahverdi *et al.* (77) observaron potenciación de penicilina G, amoxicilina, eritromicina, clindamicina y vancomicina con NPs de Ag contra *E. coli* y *S. aureus*. De manera similar, Fayaz *et al.* (78) observaron que NPs de Ag fueron capaces de potenciar el efecto de ampicilina, kanamicina, eritromicina y cloranfenicol contra bacterias grampositivas y gramnegativas.

En estudios anteriores, Garza-González *et al.* (79) estudiaron el comportamiento de la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L al ser expuesta a distintas concentraciones de metales de transición, observando que ésta aumenta la producción de un EPS al estar en contacto con los metales incluidos en su estudio. También observaron que este EPS posee buenas propiedades de adsorción, y debido a que la producción de su EPS aumenta al encontrarse en crecimiento junto con los metales de transición, es posible utilizar el polímero para la bio-remediación de diversos metales y contaminantes. Vázquez-Rodríguez *et al.* (80) analizaron la actividad antibacteriana y antibiofilm contra una cepa *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* encontrando que a 2500 ppm inhibió el 27%, 60% y 24% del crecimiento, respectivamente. También, encontraron que esta misma concentración inhibió el 96% y el 30% la formación de biofilm para *S. aureus* y *P. aeruginosa*, respectivamente.

En este grupo de investigación se ha estado trabajando con el uso de metales de transición para el desarrollo de agentes terapéuticos, especialmente agentes antimicrobianos, utilizando terapias combinatorias. Garza-Cervantes *et al.* (81) utilizaron combinaciones de iones Ag(I) con iones de Cu(II), Co(II), Cd(II), Ni(II) y Zn(II) para inhibir el crecimiento de *E. coli* y *B. subtilis*, utilizados como modelos de bacteria gramnegativa y grampositiva, respectivamente. Encontraron que varias combinaciones fueron capaces de inhibir de manera significativa el crecimiento de los microorganismos, observando un efecto sinérgico entre los

metales. En otro estudio, Garza-Cervantes *et al.* (82) demostraron la capacidad que poseen los iones de metales de transición Cu(II), Ni(II) y Zn(II) para potenciar el efecto antimicrobiano de los antibióticos ampicilina y kanamicina al combinarse en cultivos de cepas de *E. coli* y *S. aureus* sensibles y resistentes (mediante transformación con plásmidos) a los mismos, logrando no solo la inhibición de las cepas sensibles sino también la re-sensibilización de las cepas resistentes. Además, observaron que las combinaciones re-sensibilizadoras presentaban interacciones de naturaleza sinérgica al comparar los resultados con sus componentes individuales.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, una de las alternativas para el combate de bacterias resistentes es el uso de nanopartículas (NPs) metálicas, así como el uso de exopolisacáridos (EPS) microbianos. De la bibliografía consultada, existen muchos estudios sobre potenciación de antibióticos con NPs, principalmente de Ag o de Au, pero hay muy poca información sobre este tema con otros metales de transición, de esta manera se propone la síntesis de NPs de Cu, Zn o Ni utilizando el EPS de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L como agente estabilizador, las cuales se utilizarán en combinación con antibióticos, las cuales tendrá un mayor efecto antibacteriano y antibiofilm que sus componentes individuales, debido al efecto sinérgico que las NPs tendrían sobre el efecto del antibiótico.

## CAPÍTULO 3

### HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1 Hipótesis

Las nanopartículas de Cu, Ni o Zn sintetizadas utilizando el EPS de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L como agente estabilizador, serán capaces de potenciar sinérgicamente la actividad de diversos antibióticos, logrando un mayor efecto antimicrobiano y antibiofilm que los componentes por separado.

#### 3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo General: Desarrollar agentes antibacterianos y antibiofilms a partir de EPS de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L con NPs de Cu, Ni o Zn, en combinación con antibióticos.

#### 3.2.2 Objetivos específicos:

1. Producir y extraer EPS de la cepa *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L
2. Obtener un agente reductor eco-amigable
3. Sintetizar NPs de Cu, Ni o Zn a partir del agente reductor eco-amigable, utilizando EPS de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L como agente estabilizador.
4. Caracterizar la composición y morfología de las nanopartículas obtenidas.
5. Obtener un agente antibacteriano a partir de las NPs producidas y el EPS de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L.
6. Realizar las pruebas antibacterianas necesarias para determinar la concentración mínima inhibitoria de los compósitos obtenidos en cepas bacterianas resistentes a antibióticos.

7. Realizar las pruebas para determinar la capacidad inhibitoria de biofilm de los compósitos obtenidos en cepas bacterianas resistentes a antibióticos.

8. Realizar pruebas de toxicidad *in vivo* de los compósitos obtenidos.

## CAPÍTULO 4

### METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### 4.1 Material y reactivos

Cajas petri de vidrio marca KIMAX, matraces Erlenmeyer de 125, 250 y 500 mL marca JENAerGLAS, tubos de vidrio para cultivo marca HACH, tubos de ensayo de 15 y 50 mL marca Corning, placas de 96 pocillos, fondo plano (Corning, Costar), celdas para espectrofotómetro de 10 mm (Brand), micropipetas de 2-20, 20-200, 100-1000 y 5-5000 L  $\mu$ L (Eppendorf) con sus respectivas puntillas desechables (Neptune), tubos para microcentrífuga de 1.5 mL (Neptune), medios de cultivo: LB, Miller (Difco); YM (BD, Bioxon); agar bacteriológico (BD, Bioxon), sales de metales:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Desarrollo de Especialidades Químicas S.A. de C.V.),  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V.) y  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V.), agua grado molecular (mQH<sub>2</sub>O), fosfato monobásico de sodio dihidratado y dibásico de sodio anhidro (Sigma Alrich), antibióticos: Ampicilina (A.G. Scientific Inc.), Kanamcina (A.G. Scientific Inc.), Ciprofloxacino (Sigma-Aldrich) y Cloranfenicol (Bio Basic, Canada Inc.); ácido ascórbico (Jalmek).

#### 4.2 Equipo de laboratorio

Incubadora estática (Lab Companion), incubadora con agitación (Lab Companion), balanza analítica (AND), campana de flujo laminar (LabConco), autoclave (All American), refrigerador y congelador (Norlake), espectrofotómetro Optizen 2120 UV Plus, lector de placas Multiskan Go (Thermo Scientific), purificador de agua PureLabClassic (ELGA), concentrador Savant SPD 2010 SpeedVac (Thermo Scientific). El desarrollo del proyecto se llevará a cabo en los laboratorios de Biotecnología 2 y 3 ubicados en la División de Estudios de

Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL, así como el Laboratorio de Biología Sintética y de Sistemas ubicado en el Centro de Investigación de Biotecnología y Nanotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

#### 4.3 Cepas de bacterias y levadura utilizadas

Para la obtención del exopolisacárido de interés se utilizó la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L, una cepa nativa de la región previamente aislada e identificada (79). Para las pruebas antimicrobianas y antibiofilm se utilizaron dos aislados clínicos, una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente (*PaR*), y una cepa de *Staphylococcus aureus* multi-resistente (*SaR*), como modelos de estudio de bacterias gramnegativa y grampositiva, respectivamente (donadas amablemente por la responsable del departamento de bacteriología del Hospital San Vicente, Monterrey, Nuevo León, México).

#### 4.4 Cultivo de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L y obtención de EPS

Para esta metodología se utilizó como guía el protocolo descrito por Garza-González *et al.* (79) con algunas modificaciones. En un tubo con 5 mL de medio YM se inoculó *R. mucilaginosa* a partir de una colonia en cultivo sólido (agar) y se cultivó a 30°C por 18 h a 150 rpm para obtener un cultivo *overnight*. En matraces Erlenmeyer de 500 mL se inoculó una alícuota del cultivo *overnight* en 350 mL de medio YM. Se incubaron a 30±1°C - 150 rpm por 96 horas con el fin de favorecer la producción del exopolisacárido. Para la extracción del EPS a partir de los cultivos de *R. mucilaginosa*, estos se dividieron en grupos de alícuotas de 45 mL y se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 min a 4°C para separar la biomasa y recolectar el sobrenadante. Este último se filtró a través de una membrana de polietersulfona con poros de 0.45 µm de diámetro. Se colectó el filtrado y se precipitó el EPS agregando dos volúmenes de etanol absoluto (EtOH, 99.5%) por cada volumen de sobrenadante para ser colocados *overnight* a -20°C y con esto favorecer una completa precipitación del EPS en la mezcla. Se centrifugó la mezcla EtOH:sobrenadante a 12 000 rpm por 15 min a 4°C para

separar el EPS y descartar el sobrenadante. Posterior a esto se realizaron dos lavados con EtOH al 70% con el objetivo de eliminar los residuos que puedan quedar del medio de cultivo. Por último, se colocaron los tubos con EPS en un concentrador, por 5 h a 5.1 torr con 1 h de calentamiento a 45°C para secar la muestra y eliminar el EtOH residual.

#### 4.5 Síntesis de nanopartículas

Para la obtención de las NPs metálicas se realizó un diseño de experimentos 3<sup>3</sup> para encontrar las condiciones en las cuales se sinteticen NPs de Cu(II), Ni(II) y Zn(II). Se tomaron 3 concentraciones de la sal precursora, exopolisacárido y agente reductor (ácido ascórbico), utilizando una relación 1:2 exopolímero:agente reductor. A partir de soluciones de EPS a 12.5 mg/mL, ácido ascórbico al 20 %, H<sub>2</sub>O<sub>m</sub>Q ajustados a pH 9 con NaOH, así como soluciones de Cu(II) 100 mM, Ni(II) 1.5 M y Zn(II) 3 M se tomaron las cantidades necesarias para alcanzar las siguientes condiciones: concentraciones de EPS de 1, 2 y 5 mg/mL, concentraciones de ácido ascórbico de 2, 4 y 10 %, para las reacciones de Cu se utilizaron 1, 2 y 5 mM, para las reacciones de Ni(II) se utilizaron 10, 50 y 100 mM y para las reacciones de Zn(II) se utilizaron 100, 200 y 250 mM. Se obtuvo un total de 27 combinaciones para cada metal de transición. Las NPs se precipitaron y lavaron de la misma forma que para la extracción de EPS, con el fin de recuperar la mayor cantidad de EPS-NPs presente en el medio de reacción. Se secaron de igual manera en un concentrador por 5 h a 5.1 torr con 1 h de calentamiento a 45°C.

#### 4.6 Caracterización de las nanopartículas obtenidas

Como evidencia preliminar se monitorearon las reacciones de síntesis por medio de espectrofotometría UV-Vis para observar el SPR observando un pico de absorción característico a la NP obtenida. Para esto se tomaron alícuotas de 10 µL y se midieron espectros UV-Vis de 300 a 700 nm para las reacciones de Ni y Zn, mientras que para las reacciones de Cu se midió el espectro de 400 a 700 nm. Se realizó medición del espectro infrarrojo por FTIR, de las reacciones

seleccionadas, para observar los grupos funcionales correspondientes al EPS después de las reacciones de NPs, así como los posibles cambios en los mismos. El espectro de las NPs fue medido entre 500 y 4000  $\text{cm}^{-1}$  usando un espectrómetro Shimadzu modelo IRAfinity-1. Se utilizó el equipo Nanotracs wave (Microtracs, USA) para la determinación del potencial zeta de los compósitos.

Se realizó un monitoreo de la forma y el tamaño de las nanopartículas sintetizadas por medio de microscopía electrónica. El análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM *ing.* Scanning Electron Microscopy) se llevó a cabo como parte del curso “Síntesis de Materiales Nanoestructurados” tomado en la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica. Se analizó el polvo de las NPs de Cu usando el microscopio electrónico de barrido JSM- 7401F (JEOL, Thermal, Analytical FE SEM). El análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM *ing.* Transmission Electron Microscopy) se llevó a cabo en colaboración con el Centro de Investigación en Química Aplicada, ubicado en Saltillo, Coahuila, México. Mediante esta técnica se analizaron las NPs de Ni y Zn obtenidas. Se obtuvieron micrografías de estas y se utilizó la técnica de difracción de electrones de área seleccionada (SAED *ing.* Selected Area Electron Diffraction) utilizando un microscopio FEI-TITAN 80-300 operado a un voltaje de aceleración de 300 kV en rejillas de cobre *lacey*-carbon. Además, se determinó el espectro de energía dispersiva (EDS *ing.* Energy Dispersive Spectrometry) integrado al TEM.

#### 4.7 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas sintetizadas

La determinación de la MIC se llevó a cabo en placas de 96 pocillos tomando como base el protocolo anteriormente reportado(81). Se prepararon soluciones de NPs de Ni y Zn, así como del EPS sin reaccionar, a una concentración de 5.56 mg/mL en medio LB ajustado a pH 7 con buffer de fosfatos 0.1 M (LBb) como vehículo. Se adicionaron las cantidades necesarias de estas soluciones para obtener concentraciones de 4, 3, 2 y 1 mg/mL una vez añadido el inóculo de bacterias.



Para inocular cada pocillo de prueba en la determinación de la MIC, un cultivo *overnight* (20 h de incubación a 37°C y 150 rpm) en medio LBb de cada cepa, *PaR* y *SaR*, fue diluido 1:100 en un tubo con 5 mL de medio LBb fresco e incubado hasta alcanzar una densidad óptica de  $0.2 \pm 0.02$ . A partir de esto, se realizó una dilución 1:20 en medio LBb fresco y se tomaron 20  $\mu\text{L}$  para inocular cada pocillo de prueba, teniendo una concentración de  $10^5$  células/mL. Cada placa de prueba se incubó a 37°C por 20 h con una agitación de 150 rpm.

Después del tiempo de incubación se determinó la MIC como la concentración más baja a la cual no se observó crecimiento de la cepa tratada con NPs o EPS. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

#### 4.8 Determinación de la actividad antibiofilm de las NPs sintetizadas

La capacidad de las NPs y del EPS para inhibir la producción de biofilm de las cepas clínicas utilizadas se desarrolló utilizando como base el protocolo reportado por O'Toole (83). Se preparó una solución madre de las NPs de Ni y Zn, así como del EPS sin reaccionar, a una concentración de 5.56 mg/mL en medio LBb. Se añadieron las cantidades necesarias para obtener concentraciones de 4, 3, 2 y 1 mg/mL una vez añadido el inóculo. Se incluyó un control sin tratamiento para observar la producción normal de biofilm de las cepas clínicas. Cada pocillo de prueba se inoculó de la misma forma que para la determinación de la MIC mencionada anteriormente con el fin de tener una concentración celular de  $10^5$  células/mL en cada pocillo. Se incubaron las placas de prueba a 37°C por 40 h en condiciones estáticas.

Después del tiempo de incubación se retiró el sobrenadante de cada pocillo de prueba y control. Estos fueron lavados 3 veces con mQH<sub>2</sub>O y secados en horno de secado a 70°C por 1 h. Posteriormente se tiñó cada pocillo con 240  $\mu\text{L}$  del colorante cristal violeta 0.1 % por 20 minutos a temperatura ambiente y condiciones estáticas. Después de este tiempo el colorante fue removido y cada pocillo fue lavado 3 veces con mQH<sub>2</sub>O y secado a 70°C por 1 h. Una vez secas, se destiñeron agregando 250  $\mu\text{L}$  de EtOH al 99% y reposando las placas por 30 minutos en condiciones estáticas. Por último, 100  $\mu\text{L}$  de la solución

EtOH/colorante fueron transferidos a una placa nueva y la densidad óptica fue determinada a 590 nm. Todas las pruebas, así como el control sin tratamiento, se realizaron por triplicado.

#### 4.9 Estudio de toxicidad *in vivo* de las nanopartículas sintetizadas

Con el fin de evaluar la toxicidad de los compósitos sintetizados se realizaron pruebas de función renal en ratas Wistar adultas macho con peso aproximado de 250 g, las cuales fueron mantenidas en rejillas de acero inoxidable con un régimen de luz/oscuridad de 12 h. Se probaron tanto los compósitos de Ni y Zn sintetizados como el EPS utilizado como estabilizante. Las ratas se anestesiaron con isoflurano, se separaron en 4 grupos (control, EPS, NiNPs y ZnNPs con  $n = 4$  en cada grupo) y fueron tratadas con las nanopartículas y el EPS mediante la administración por vía oral de 1 mL de una suspensión de estos compuestos en buffer de fosfatos 0.1 M a una concentración de 6 mg/mL, 1 mL de buffer fue administrado al grupo control. El régimen de dosificación fue una administración de compósito, EPS o buffer cada 24 h durante tres días. Durante todo el experimento las ratas se mantuvieron con comida y agua *ad libitum* a temperatura ambiente ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Después de 24 h de la última dosis, se recolectaron muestras de orina de las ratas utilizando cajas metabólicas (3700M020; Tecniplast Buguggiate (VA), Italia) donde la orina se recolectó en recipientes adjuntos a la caja. Después se recolectaron muestras de sangre para finalmente sacrificar a los animales de prueba.

Para analizar la función renal de los animales expuestos a los compósitos y al EPS se midió: volumen urinario, concentración de glucosa (84), proteínas (85) y creatinina (86,87) en orina, así como la concentración plasmática de creatinina (86,87). Todos los experimentos realizados con animales fueron desarrollados de acuerdo con lo establecido en la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

#### 4.10 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de antibióticos

La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de os antibióticos a probar, ampicilina, kanamicina, ciprofloxacino y cloranfenicol, se realizaron siguiendo las indicaciones de Andrews (88) y Garza-Cervantes *et al.* (81), con algunas modificaciones, llevando a cabo los ensayos en placas de 96 pocillos, tomando la MIC como la concentración más baja a la cual no se observa crecimiento.

Se prepararon soluciones madre de cada antibiótico según las recomendaciones de los proveedores, siendo de 50 mg/mL para ampicilina, kanamicina y cloranfenicol, y de 25 mg/mL para ciprofloxacino. A partir de estas soluciones, en el primer pocillo de cada prueba se agregó la cantidad necesaria para lograr una concentración de 1024 ppm en un volumen final de 200  $\mu$ L. Posteriormente se realizaron las diluciones correspondientes, tomando 100  $\mu$ L de cada pocillo y transfiriéndolos al pocillo siguiente que contiene 100  $\mu$ L de medio de cultivo fresco logrando que la concentración sea 1/2 de la anterior, se repitió este último paso las veces necesarias para que las concentraciones a probar de cada antibiótico sean 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062, 0.031, 0.015, 0.007, 0.003 y 0.001 ppm una vez agregado los 100  $\mu$ L del inóculo.

Para inocular cada pocillo de prueba en la determinación de la MIC, un cultivo *overnight* (20 h de incubación a 37°C y 150 rpm) en medio LBb de cada cepa, *PaR* y *SaR*, fue diluido 1:100 en un tubo con 5 mL de medio LBb fresco e incubado hasta alcanzar una densidad óptica de  $0.2 \pm 0.02$ . A partir de esto, se realizó una dilución 1:20 en medio LBb fresco y se tomaron 20  $\mu$ L para inocular cada pocillo de prueba, teniendo una concentración de  $10^5$  células/mL. Cada placa de prueba se incubó a 37°C por 20 h con una agitación de 150 rpm.

Después del tiempo de incubación se determinó la MIC como la concentración más baja a la cual no se observó crecimiento de la cepa tratada con NPs o EPS. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

4.11 Realización de pruebas de inhibición de crecimiento combinatorias antibiótico-compósito en cepas clínicas resistentes

Los ensayos checkerboard se desarrollaron a partir de las concentraciones mínimas inhibitorias de cada metal y antibiótico, se probaron en combinaciones de 0, 1/2, 1/4, y 1/8 de MIC para ver la interacción entre cada componente, en placas de 96 pocillos con fondo plano Costar (Corning). En el eje de las *x* (columnas) se colocaron las diferentes fracciones de la MIC del compuesto, y en el eje de las *y* (filas) se colocaron las diferentes fracciones de la MIC del antibiótico determinados para cada prueba.

Se prepararon diluciones de cada compuesto y de cada antibiótico con medio fresco, en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, con el fin de que, al agregar las cantidades necesarias a cada pocillo en la placa, se obtenga la fracción de la concentración mínima inhibitoria a utilizar en cada una de las combinaciones metal-antibiótico.

Para las concentraciones a utilizar de cada antibiótico se agregó de manera horizontal, 8  $\mu$ L en cada pocillo de la segunda fila para lograr 1/8 de la MIC, 16  $\mu$ L en cada pocillo de la tercera fila para lograr 1/4 de la MIC y 32  $\mu$ L en cada pocillo de la cuarta fila para lograr 1/2 de la MIC. Para las concentraciones a utilizar del compuesto se agregó de manera vertical, 25  $\mu$ L en cada pocillo de la segunda columna para lograr 1/8 de la MIC, 50  $\mu$ L en cada pocillo de la tercera columna para lograr 1/4 de la MIC y 100  $\mu$ L en cada pocillo de la cuarta columna para lograr 1/2 de la MIC. Se colocó la cantidad restante de medio fresco para completar 180  $\mu$ L y se procedió a agregar el inóculo.

Para inocular cada pocillo de prueba en la determinación de la MIC, un cultivo *overnight* (20 h de incubación a 37°C y 150 rpm) en medio LBb de cada cepa, *PaR* y *SaR*, fue diluido 1:100 en un tubo con 5 mL de medio LBb fresco e incubado hasta alcanzar una densidad óptica de  $0.2 \pm 0.02$ . Se realizó una dilución 1:20 en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL con medio de cultivo fresco y al final se agregaron 20  $\mu$ L (1:10) de esta dilución a cada pocillo de prueba, con el fin de lograr una concentración celular de  $\sim 10^5$  células/mL en 200  $\mu$ L como volumen final y se dejó incubar a 37°C-150 rpm por 20 h.

Cada prueba fue realizada por triplicado, con sus correspondientes controles de crecimiento y esterilidad. La lectura de las placas para el análisis de los resultados se llevó a cabo por espectrofotometría en un lector de microplacas Multiskan GO.

#### 4.12 Realización de pruebas combinatorias antibiótico-compósito de producción de biofilm en cepas clínicas resistentes

Se prepararon diluciones de cada compósito y de cada antibiótico con medio fresco, en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, con el fin de que, al agregar las cantidades necesarias a cada pocillo en la placa, se obtenga la fracción de la concentración mínima inhibitoria a utilizar en cada una de las combinaciones metal-antibiótico.

Para las concentraciones a utilizar de cada antibiótico se agregó de manera horizontal, 8  $\mu$ L en cada pocillo de la segunda fila para lograr 1/8 de la MIC, 16  $\mu$ L en cada pocillo de la tercera fila para lograr 1/4 de la MIC y 32  $\mu$ L en cada pocillo de la cuarta fila para lograr 1/2 de la MIC. Para las concentraciones a utilizar del compósito se agregó de manera vertical, 25  $\mu$ L en cada pocillo de la segunda columna para lograr 1/8 de la MIC, 50  $\mu$ L en cada pocillo de la tercera columna para lograr 1/4 de la MIC y 100  $\mu$ L en cada pocillo de la cuarta columna para lograr 1/2 de la MIC. Se colocó la cantidad restante de medio fresco para completar 180  $\mu$ L y se procedió a agregar el inóculo.

Para inocular cada pocillo de prueba en la determinación de la MIC, un cultivo *overnight* (20 h de incubación a 37°C y 150 rpm) en medio LBb de cada cepa, *PaR* y *SaR*, fue diluido 1:100 en un tubo con 5 mL de medio LBb fresco e incubado hasta alcanzar una densidad óptica de  $0.2 \pm 0.02$ . Se realizó una dilución 1:20 en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL con medio de cultivo fresco y al final se agregaron 20  $\mu$ L (1:10) de esta dilución a cada pocillo de prueba, con el fin de lograr una concentración celular de  $\sim 10^5$  células/mL en 200  $\mu$ L como volumen final y se dejó incubar a 37°C por 40 h.

Después del tiempo de incubación se retiró el sobrenadante de cada pocillo de prueba y control. Estos fueron lavados 3 veces con mQH<sub>2</sub>O y secados en horno de secado a 70°C por 1 h. Posteriormente se tiñó cada pocillo con 240 µL del colorante cristal violeta 0.1 % por 20 minutos a temperatura ambiente y condiciones estáticas. Después de este tiempo el colorante fue removido y cada pocillo fue lavado 3 veces con mQH<sub>2</sub>O y secado a 70°C por 1 h. Una vez secas, se destiñeron agregando 250 µL de EtOH al 99% y reposando las placas por 30 minutos en condiciones estáticas. Por último, 100 µL de la solución EtOH/colorante fueron transferidos a una placa nueva y la densidad óptica fue determinada a 590 nm. Todas las pruebas, así como el control sin tratamiento, se realizaron por triplicado.

#### 4.13 Determinación del efecto de los compósitos sobre la integridad de la membrana celular bacteriana

Para cada compuesto se colocó en cada pocillo la cantidad necesaria para alcanzar 3 mg/mL una vez agregado el inóculo de manera similar a los ensayos anteriores. Para inocular cada pocillo de prueba en la determinación de la MIC, un cultivo *overnight* (20 h de incubación a 37°C y 150 rpm) en medio LBb de cada cepa, *PaR* y *SaR*, fue diluido 1:100 en un tubo con 5 mL de medio LBb fresco e incubado hasta alcanzar una densidad óptica de  $0.2 \pm 0.02$ . Se realizó una dilución 1:20 en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL con medio de cultivo fresco y al final se agregaron 20 µL (1:10) de esta dilución a cada pocillo de prueba, con el fin de lograr una concentración celular de  $\sim 10^5$  células/mL en 200 µL como volumen final y se dejó incubar a 37°C-150 rpm por 4 horas.

Después del tiempo de incubación las placas se centrifugaron a 3500 rpm por 15 min, después se tomaron 5 µL del sobrenadante y se determinaron los azúcares reductores por el método de Miller (89), se utilizó glucosa para la preparar la curva de calibración correspondiente.

#### 4.14 Análisis de datos

Para estimar la significancia observada en las diferencias obtenidas en los tratamientos empleados en el presente trabajo, todos los datos recolectados fueron analizados utilizando un análisis de varianza (ANOVA) así como la prueba de la diferencia significativa mínima de Fisher (LSD *ing.* Least Significant Difference) utilizando Microsoft Excel 2016.

#### 4.15 Aprobación del comité de ética

El cuidado de los animales utilizados, así como su manejo en los experimentos realizados en la Universidad de Aguascalientes son constantemente revisados por el Comité de Cuidado y Uso Animal, siguiendo los lineamientos de la regulación mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Al final del experimento los animales fueron sacrificados utilizando un exceso del anestésico pentobarbital sódico (40 mg/kg de peso). Se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar el sufrimiento animal.

#### 4.16 Manejo y disposición de residuos

Los residuos generados durante la realización del proyecto de investigación (tales como soluciones alcohólicas, reacciones de síntesis y residuos biológico-infecciosos) fueron gestionados de acuerdo con 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.

## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS

#### 5.1 Extracción de exopolisacárido a partir de un cultivo de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L

A partir de los cultivos realizados de *R. mucilaginosa* se separó la biomasa, se precipitó y extrajo el EPS del medio de cultivo. Se extrajeron, en promedio, un total de 620.85 mg en un volumen de 1.5 L de cultivo, obteniendo un rendimiento aproximado de 413.9 mg/L de cultivo a 30°C por 96h. A este EPS se le realizó un espectro infrarrojo para observar los grupos funcionales característicos de los monómeros de azúcares que conforman estos exopolímeros.

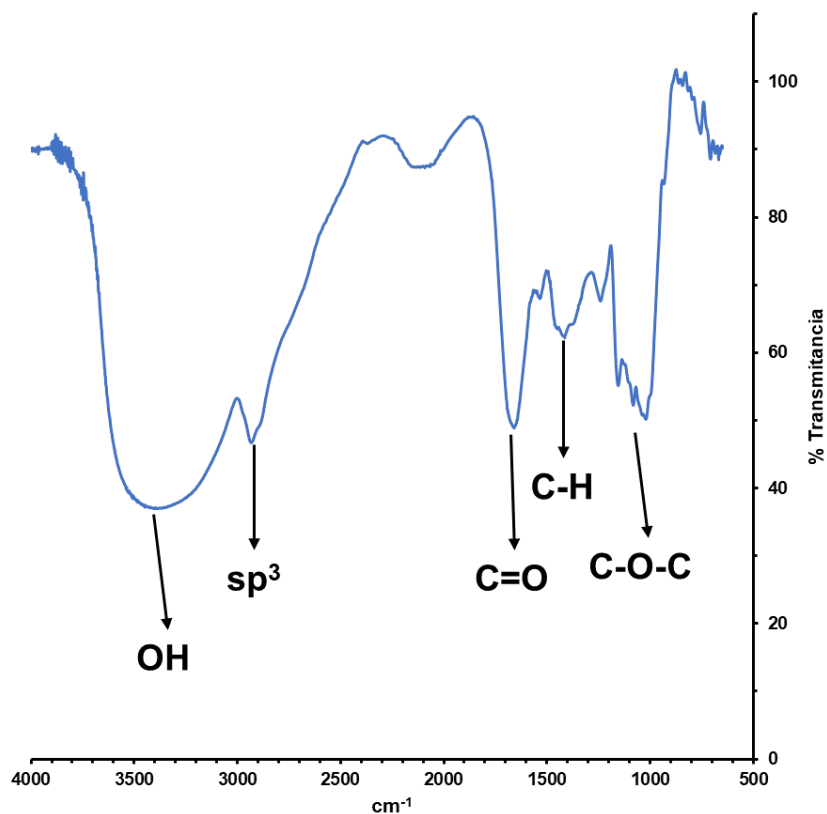


Figura 6. Espectro FTIR del exopolisacárido extraído de *Rhodotorula mucilaginosa*.



En la figura 6 se muestra el espectro IR obtenido al analizar el EPS extraído. Se presenta la banda característica del grupo -OH ( $3600-3200\text{ cm}^{-1}$ ) y el pico de  $\text{-C=O}$  ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ). Se presenta también el pico que evidencia la presencia de carbonos  $\text{sp}^3$  ( $2900\text{ cm}^{-1}$ ), y picos que confirman los enlaces C-H ( $1420\text{ cm}^{-1}$ ) y C-O-C (picos múltiples entre  $1050-1250\text{ cm}^{-1}$ ). El potencial zeta para el EPS fue de  $-76.1\text{ mV}$ .

## 5.2 Síntesis y caracterización de nanopartículas de cobre estabilizadas con EPS

Para la síntesis de NPs de Cu se llevó a cabo un diseño experimental, involucrando 3 concentraciones de Cu(II) (1, 2 y 5 mM), EPS (1, 2 y 5 mg/mL) y ácido ascórbico (2, 4 y 10 %), dando un total de 27 combinaciones, las cuales se muestran en la tabla 1. Las reacciones se llevaron a cabo en un baño de agua en ebullición por 30 minutos y se midió su espectro UV-Vis de 400-700 nm para observar el plasmón de resonancia característico para las NPs de este metal, el cual se encuentra alrededor entre 550 y 600 nm.

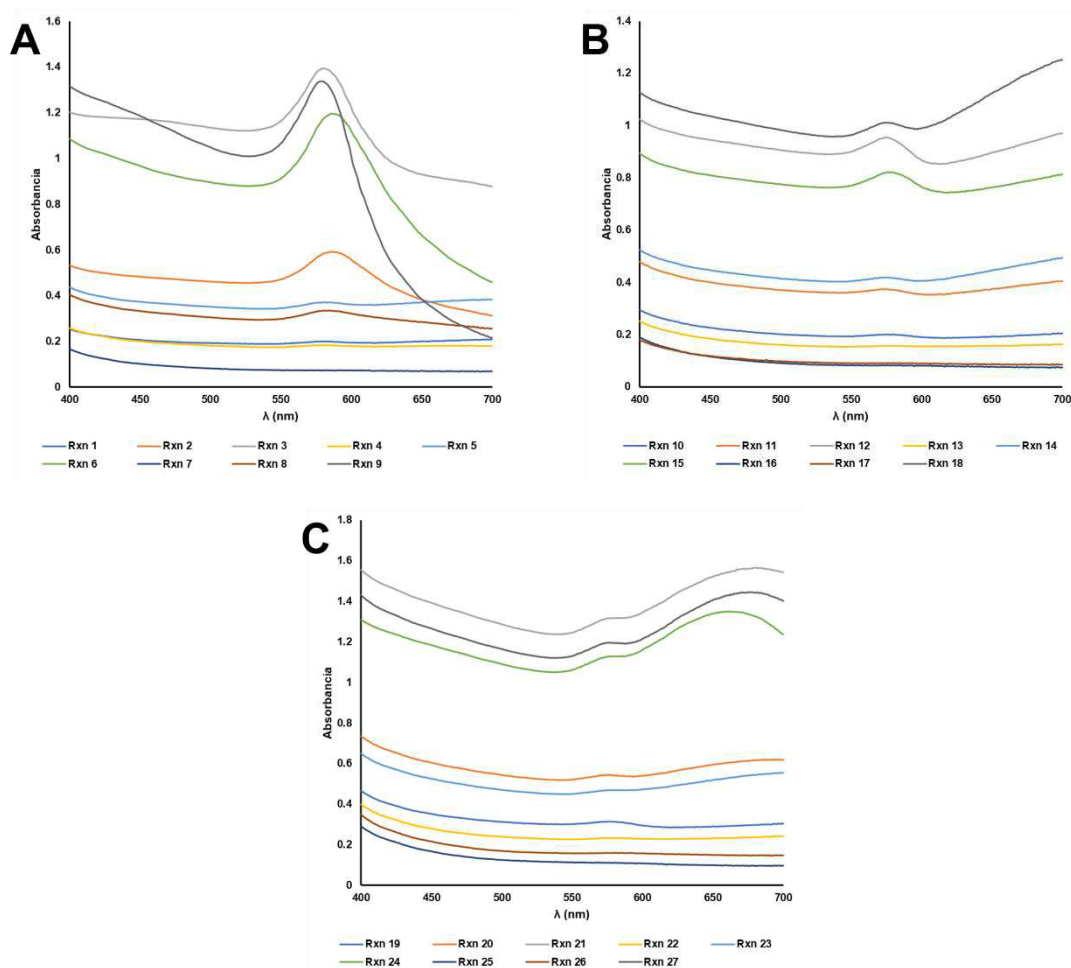
Tabla 1. Diseño de experimentos utilizado en la síntesis de nanopartículas de Cu.

<b>Reacción</b>	<b>Cu(II) [mM]</b>	<b>EPS [mg/mL]</b>	<b>Ác. ascórbico [%]</b>
R1	1	1	2
R2	2	1	2
R3	5	1	2
R4	1	2	2
R5	2	2	2
R6	5	2	2
R7	1	5	2
R8	2	5	2
R9	5	5	2
R10	1	1	4
R11	2	1	4
R12	5	1	4

<i>R13</i>	1	2	4
<i>R14</i>	2	2	4
<i>R15</i>	5	2	4
<i>R16</i>	1	5	4
<i>R17</i>	2	5	4
<i>R18</i>	5	5	4
<i>R19</i>	1	1	10
<i>R20</i>	2	1	10
<i>R21</i>	5	1	10
<i>R22</i>	1	2	10
<i>R23</i>	2	2	10
<i>R24</i>	5	2	10
<i>R25</i>	1	5	10
<i>R26</i>	2	5	10
<i>R27</i>	5	5	10

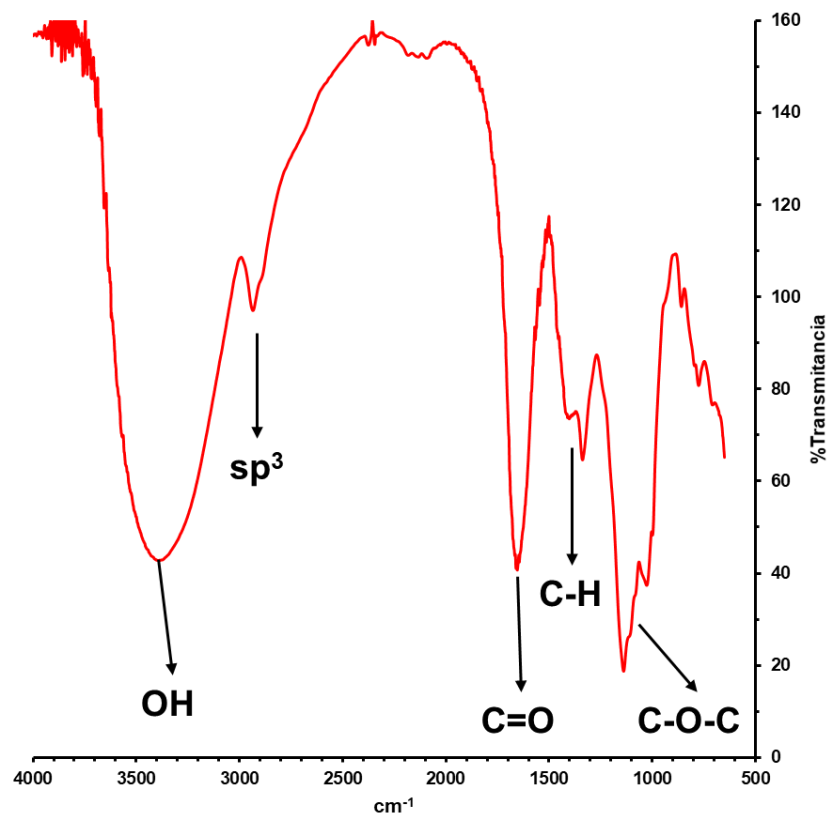
La figura 7 muestra los espectros obtenidos en este diseño de experimentos: la figura 7A muestra las reacciones donde se utilizó 2% de ácido ascórbico, la figura 7B muestra las reacciones donde se utilizó 4% de ácido ascórbico y la figura 7C muestra las reacciones donde se utilizó 10% de ácido ascórbico. En las reacciones donde se utilizó 2% de ácido ascórbico (figura 7A) se observan picos de absorbancia correspondientes al SPR esperado, entre 550 y 600 nm, de NPs de Cu. Se puede observar que las reacciones 3, 6 y 9 el pico de absorbancia se encuentra más angosto. En las reacciones donde se utilizó 4% de ácido ascórbico (figura 7B) se pueden observar picos de absorbancia a longitudes de onda similares a las reacciones con 2%, aunque estos picos son menos intensos y el espectro presenta un incremento en la absorbancia conforme se incrementa la longitud de onda. Este fenómeno es más intenso cuando se utilizó 10% de ácido ascórbico (figura 7C), se puede observar que el incremento en la absorbancia a longitudes de onda mayores a 600 nm se encuentra muy cerca del SPR esperado para las NPs de Cu, impidiendo que éste último se aprecie adecuadamente. Tres de las nueve reacciones que contenían la máxima concentración de Cu(II) utilizada (5 mM) presentaron el SPR esperado,

con máximos de absorción de 580 nm (*R3*), 586 nm (*R6*) y 578 nm (*R9*), así como *R2* (2mM de Cu(II)) cuya absorción máxima fue de 586 nm. Se eligió *R3* para los análisis posteriores.



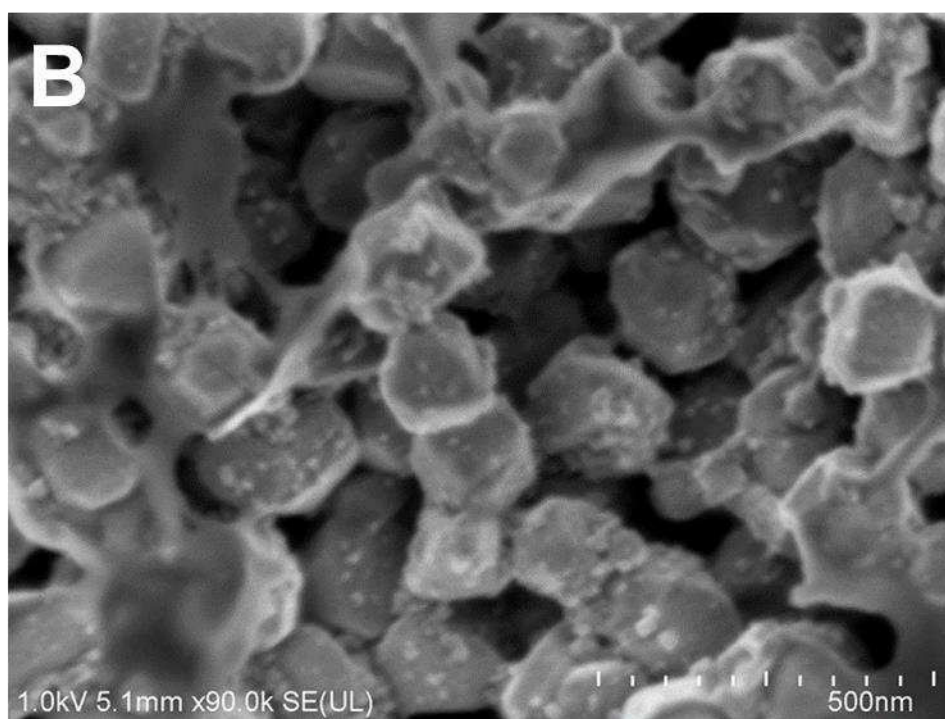
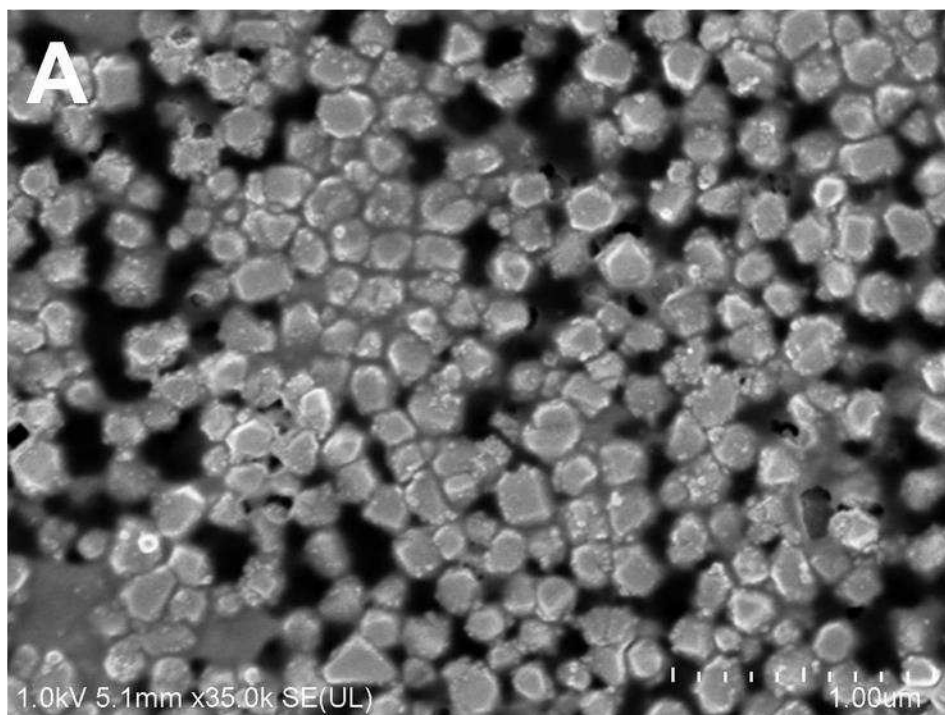
**Figura 7. Espectros UV-Vis de las NPs de Cu obtenidas en las reacciones del diseño de experimentos.** Espectros UV-Vis de cada una de las reacciones resultantes en el diseño de experimentos para la síntesis de nanopartículas de Cu. **A** muestra las reacciones 1 a la 9. **B** muestra las reacciones 10 a la 18. **C** muestra las reacciones 19 a la 27.

Se obtuvo un espectro de infrarrojo (IR) de las nanopartículas obtenidas para observar la presencia de grupos funcionales y así determinar si las nanopartículas sintetizadas se encuentran estabilizadas en la matriz polimérica del EPS. La figura 8 muestra el espectro de IR obtenido. Se puede observar que las NPs aún conservan los picos correspondientes a los grupos funcionales del EPS puro, aunque con ligeros cambios en su intensidad.



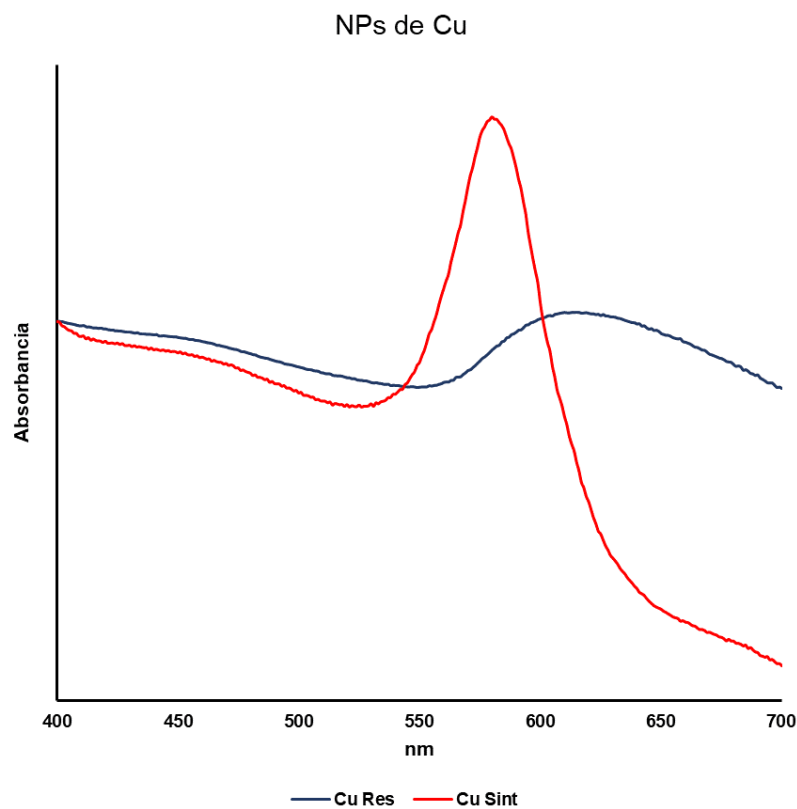
**Figura 8. Espectro IR de las nanopartículas de Cu sintetizadas.** FTIR de las NPs de Cu sintetizadas en la matriz polimérica del EPS bajo las condiciones de la reacción número 3 del diseño de experimentos planteado en el presente trabajo.

Se llevó a cabo un estudio por microscopía SEM para observar la forma de las NPs obtenidas bajo estas condiciones de síntesis. La figura 9 muestra las micrográficas obtenidas. Se puede observar que se obtuvieron NPs de geometría cristalina, no uniforme, confinadas dentro de la red polimérica del EPS, con un tamaño promedio de  $145.14 \pm 53.21$  nm.



**Figura 9. Micrografía obtenida por SEM de las nanopartículas de cobre sintetizadas.** Micrografía SEM de las NPs de Cu (R3) estabilizadas con el EPS de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L. **A** muestra las diversas formas poligonales obtenidas. **B** se evidencia que la matriz polimérica del EPS posee adheridas las NPs de Cu.

De las NPs secas se tomó un miligramo con el fin de resuspenderlo en un mililitro de agua ultra pura y determinar su espectro UV-Vis, ya que se observó a través de SEM un mayor tamaño de partícula al esperado por el pico de absorción. La figura 10 muestra el espectro realizado para las NPs de *R3* resuspendidas y el espectro obtenido al momento de la síntesis. Se puede observar que el SPR se desplaza hacia el rojo, comenzando en 564 nm y alcanzando un máximo de absorción a 612 nm. Esto puede ser causado por aglomeración de las NPs obtenidas durante el proceso de secado de la muestra, provocando un aumento en el tamaño de partícula.

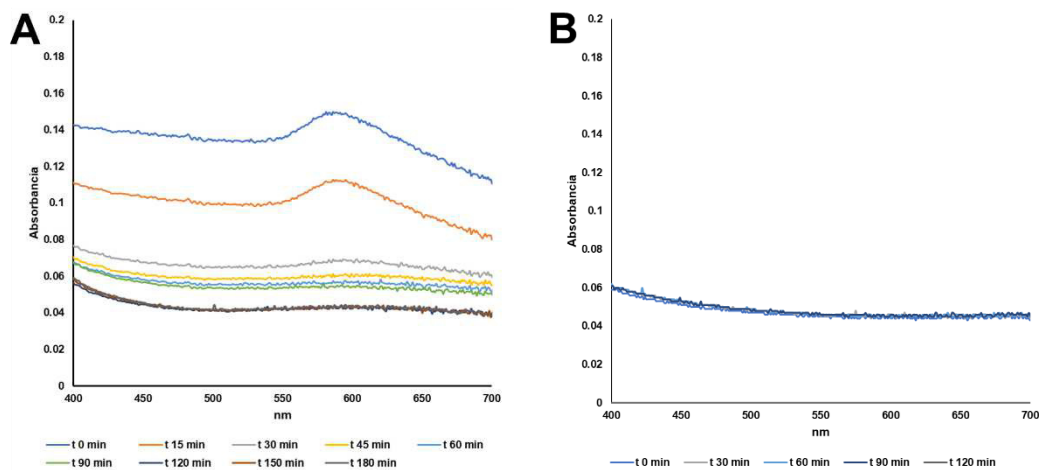


**Figura 10. Espectro UV-Vis de *R3* resuspendido en agua ultra pura.** Comparación de los espectros UV-Vis de las NPs de Cu en la mezcla de reacción de síntesis (Cu Sint) y la suspensión a 1 mg/mL (Cu Res) realizada después de lavar y secar las NPs obtenidas.

Con el fin de conocer si las nanopartículas mantienen su forma y tamaño, evidenciado por el espectro de su SPR, se tomó un miligramo de estas NPs y se resuspendieron en un mililitro de medio LB, ya que este es el que se utilizó para

las pruebas de inhibición de crecimiento y producción e biofilm. Se realizó un espectro UV-Vis cada 30 minutos. La figura 11A muestra los espectros obtenidos en cada lectura. Se puede observar que el SPR característico de estas nanopartículas es menos intenso con el paso del tiempo, lo cual indica que las nanopartículas de Cu sintetizadas no se mantienen estables en la matriz polimérica del EPS bajo las condiciones proporcionadas por el medio de cultivo.

Ya que el pH fue un factor determinante en la síntesis de estas partículas se resuspendió 1 mg de las NPs de Cu en 1 mililitro de medio LB ajustado a pH 7 con un buffer de fosfatos a una concentración de 0.1 M, de esta forma ayudaría a estabilizar las nanopartículas sin que la concentración de sales en el medio fuera un impedimento para el crecimiento de las bacterias de estudio. De igual manera se midieron los espectros UV-Vis cada 30 minutos. La figura 11B muestra los espectros obtenidos. Como es posible observar, el ajuste del pH no fue efectivo en mantener estables las nanopartículas en la red polimérica del EPS, al no presentarse el SPR de las mismas. Debido a estos resultados se decidió no utilizar las nanopartículas de Cu sintetizadas en EPS para las siguientes pruebas.



**Figura 11. Estabilidad de las nanopartículas de Cu en medio de cultivo.** Estabilidad a distintos tiempos de las nanopartículas de Cu resuspendidas en: **A** medio LB y **B** medio LB ajustado a pH 7.

### 5.3 Síntesis y caracterización de nanopartículas de zinc estabilizadas con EPS

En la síntesis de las NPs de Zn, se realizó un diseño de experimentos similar al de Cu descrito anteriormente, con las mismas concentraciones de EPS y ácido ascórbico, pero utilizando concentraciones de Zn de 100, 200 y 250 mM. Las reacciones se llevaron a cabo en un baño de agua a ebullición por 30 minutos y se midió su espectro UV-Vis de 300-700 nm al terminar el tiempo de reacción, donde se esperaba observar las NPs de Zn entre 330-400 nm. La tabla 2 muestra los 27 experimentos resultantes.

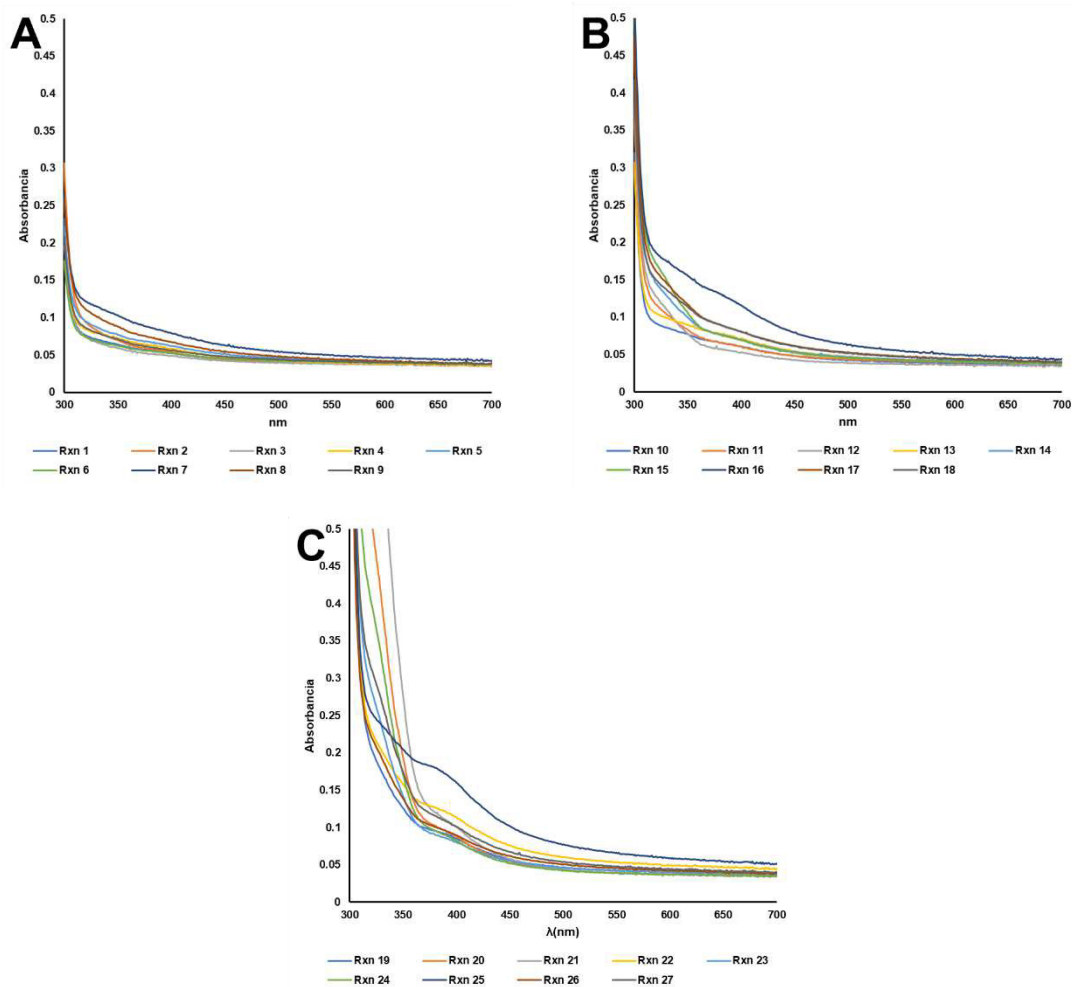
*Tabla 2. Diseño de experimentos utilizado en la síntesis de nanopartículas de Zn.*

<b>Reacción</b>	<b>Zn(II) [mM]</b>	<b>EPS [mg/mL]</b>	<b>Ác. ascórbico [%]</b>
R1	100	1	2
R2	200	1	2
R3	250	1	2
R4	100	2	2
R5	200	2	2
R6	250	2	2
R7	100	5	2
R8	200	5	2
R9	250	5	2
R10	100	1	4
R11	200	1	4
R12	250	1	4
R13	100	2	4
R14	200	2	4
R15	250	2	4
R16	100	5	4
R17	200	5	4
R18	250	5	4
R19	100	1	10
R20	200	1	10
R21	250	1	10
R22	100	2	10



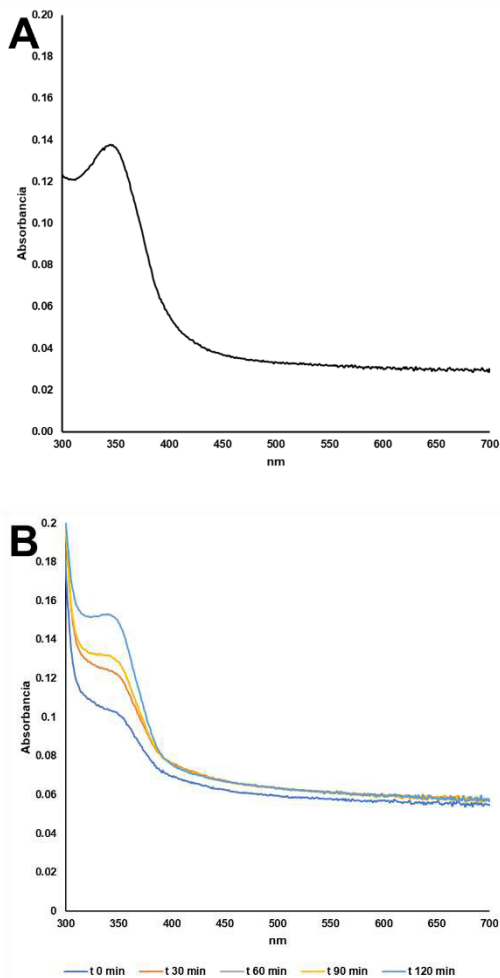
<i>R23</i>	200	2	10
<i>R24</i>	250	2	10
<i>R25</i>	100	5	10
<i>R26</i>	200	5	10
<i>R27</i>	250	5	10

En la figura 12 se muestran los espectros UV-Vis de las reacciones, de las 27 reacciones realizadas, agrupados según la concentración de agente reductor utilizado. La figura 12A muestra las reacciones donde se utilizó 2% de ácido ascórbico, la figura 12B muestra las reacciones donde se utilizó 4% de ácido ascórbico y la figura 12C muestra las reacciones donde se utilizó 10% de ácido ascórbico. Se puede observar que, al incrementar la concentración del ácido ascórbico, se modifica la absorbancia en la región entre 300 y 400 nm, siendo este cambio evidente en las reacciones donde se utilizó 10 % de ácido ascórbico (figura 12C). Para este conjunto de reacciones, dos de ellas presentan una absorción más notoria que las demás, la reacción 22 (*R22*) y la reacción 25 (*R25*). Entre ellas difiere la absorción del espectro por debajo de los 350 nm, a causa del EPS, debido a que en *R22* se utilizó una concentración de 2 mg/mL de EPS mientras que en *R25* se utilizó 5 mg/mL. Dados estos resultados se decidió tomar *R22* para las pruebas posteriores.



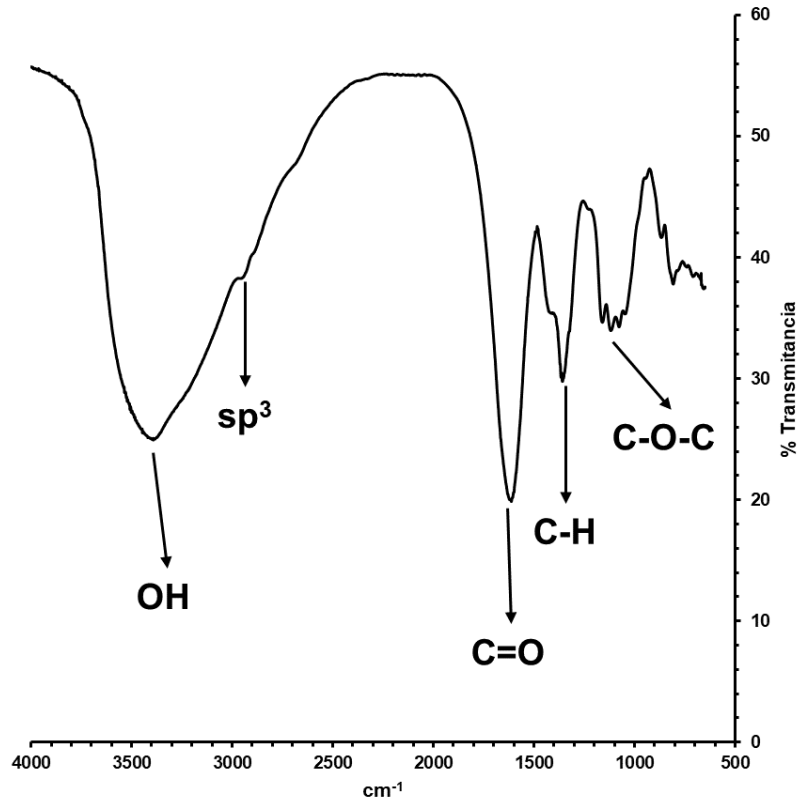
**Figura 12. Espectros UV-Vis de las NPs de Zn obtenidas en las reacciones del diseño de experimentos.** Espectros UV-Vis de cada una de las reacciones resultantes en el diseño de experimentos para la síntesis de nanopartículas de Zn. **A** muestra las reacciones 1 a la 9. **B** muestra las reacciones 10 a la 18. **C** muestra las reacciones 19 a la 27.

Posterior al periodo de secado, se procedió a medir nuevamente su SPR. La figura 13A muestra el espectro obtenido para las NPs de *R22*. Se observa una absorbancia entre los 330-360 nm, teniendo un pico máximo de absorción a los 347 nm. Para conocer la estabilidad de las NPs en el medio de cultivo a utilizar en las pruebas antimicrobianas y antibiofilm, se midió el espectro UV-Vis a diferentes tiempos como se realizó con las NPs de Cu obtenidas. La figura 13B muestra los espectros obtenidos en este medio de cultivo.



**Figura 13. Espectro UV-Vis de nanopartículas de Zn obtenidos en la reacción R22. A** Absorción del SPR de las nanopartículas de Zn obtenidas. **B** Cambios en el SPR de las nanopartículas de Zn sintetizadas con respecto al tiempo en medio LBb a pH 7.

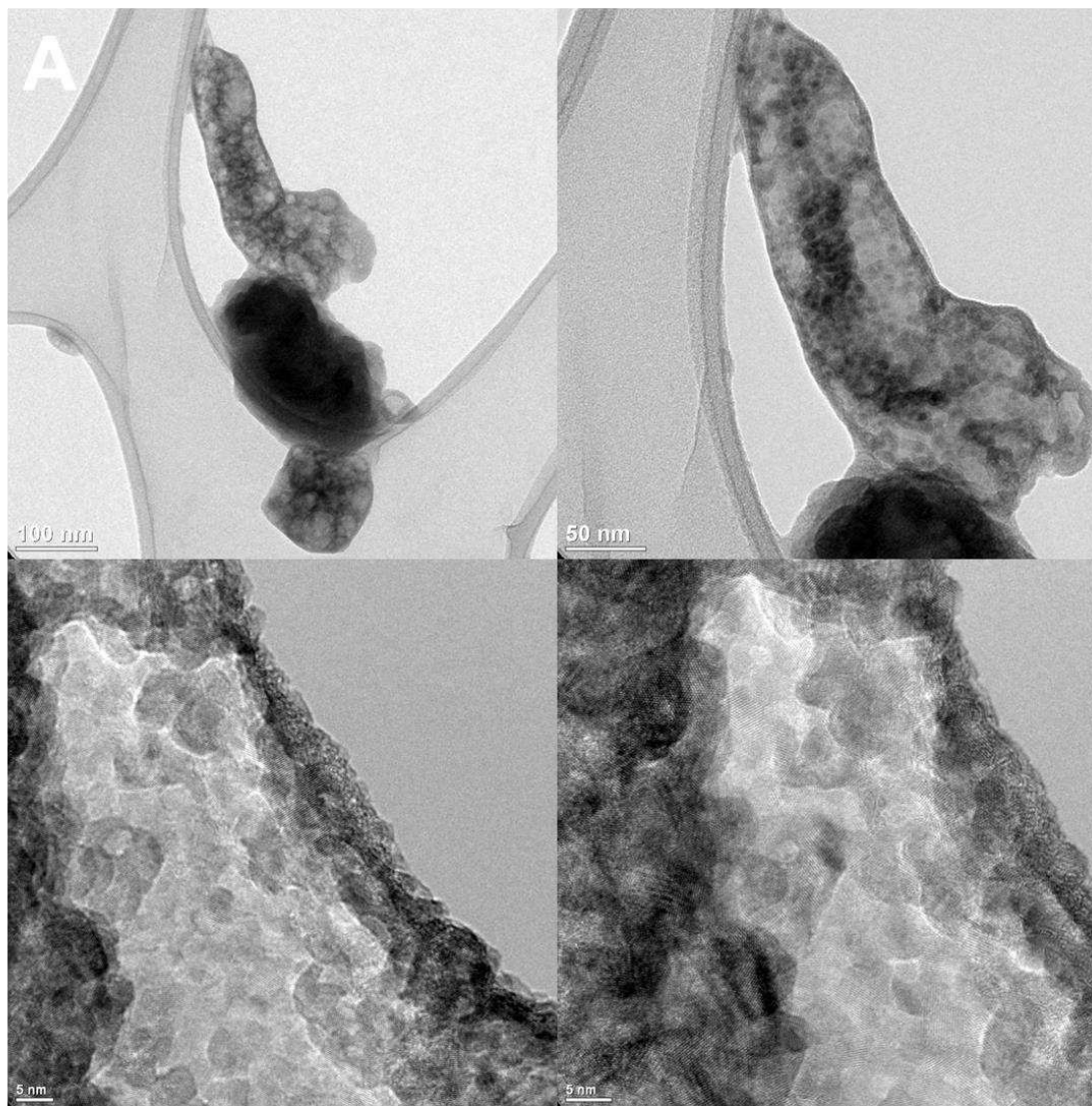
La caracterización de las NPs de Zn se llevó a cabo por espectrofotometría IR así como microscopía electrónica de transmisión. La figura 14 muestra el espectro FTIR obtenido para estas nanopartículas, donde se observan, similar al obtenido para las NPs de Cu, que se conservan los grupos funcionales principales encontrados en el EPS.



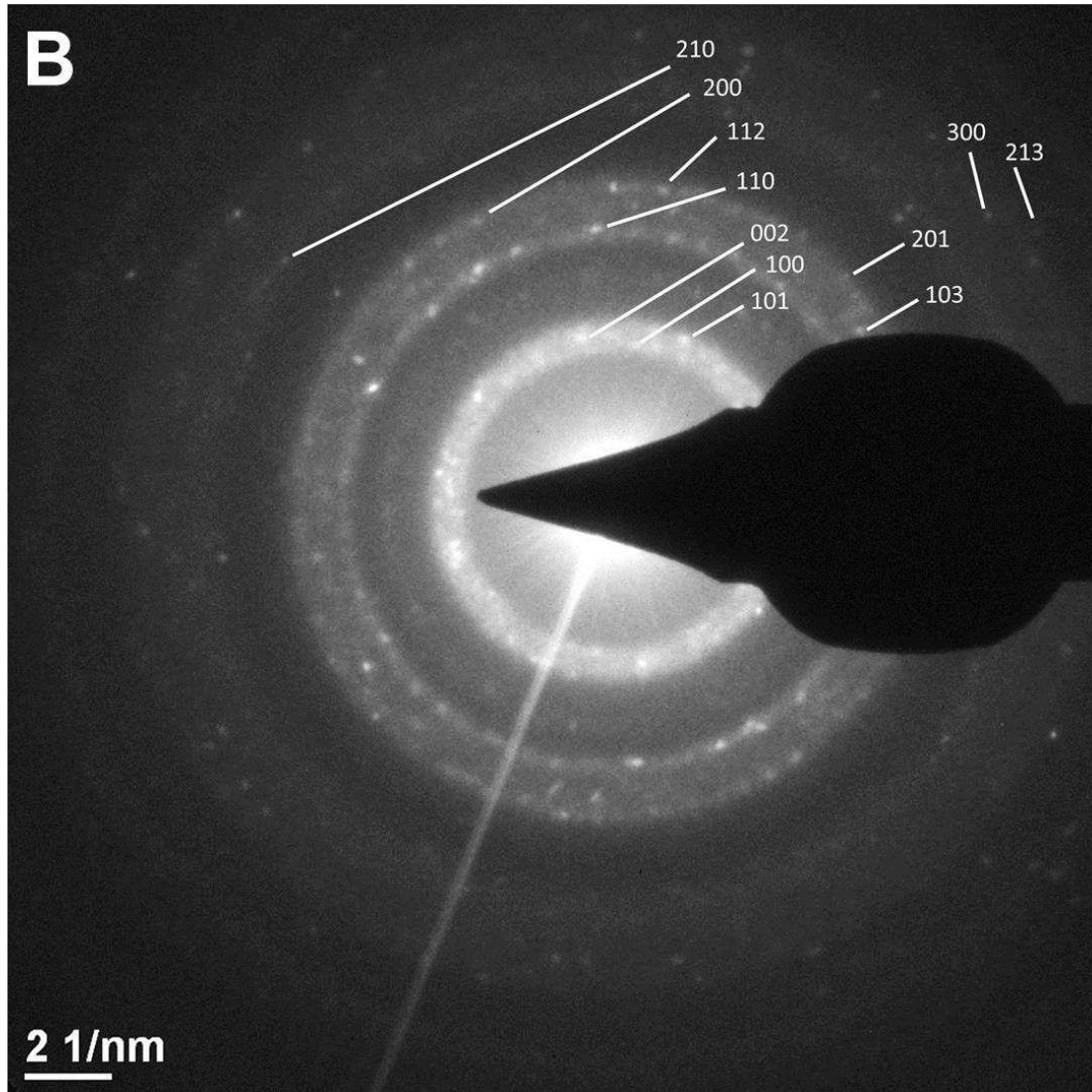
**Figura 14. Espectro IR de las nanopartículas de Zn sintetizadas.** FTIR de las NPs de Zn sintetizadas en la matriz polimérica del EPS bajo las condiciones de la reacción número 22 del diseño de experimentos planteado en el presente trabajo.

Con el fin de conocer la morfología de las NPs sintetizadas se realizó una microscopía TEM. En la figura 15A se muestra la forma de las nanopartículas obtenidas, se puede observar que poseen un arreglo polimórfico sin una forma definida. El diámetro de estas nanopartículas se encuentra entre los 4 y los 11 nm con un promedio de  $8.32 \pm 1.99$  nm. El patrón SAED de las nanopartículas de Zn sintetizadas muestra anillos y puntos brillantes debido a la naturaleza amorfa del EPS y lo policristalino de las NPs de Zn (figura 15B). Estos pueden ser atribuidos a los planos [1,0,0], [0,0,2], [1,0,1], [1,1,0], [1,0,3], [2,0,0], [1,1,2], [2,0,1], [2,1,0], [3,0,0] y [2,1,3] del cristal de ZnO con geometría hexagonal (90). Como parte de la caracterización se realizó un análisis EDS de la muestra, el cual se puede observar en la figura 15C. Este análisis muestra la presencia de Zn, C

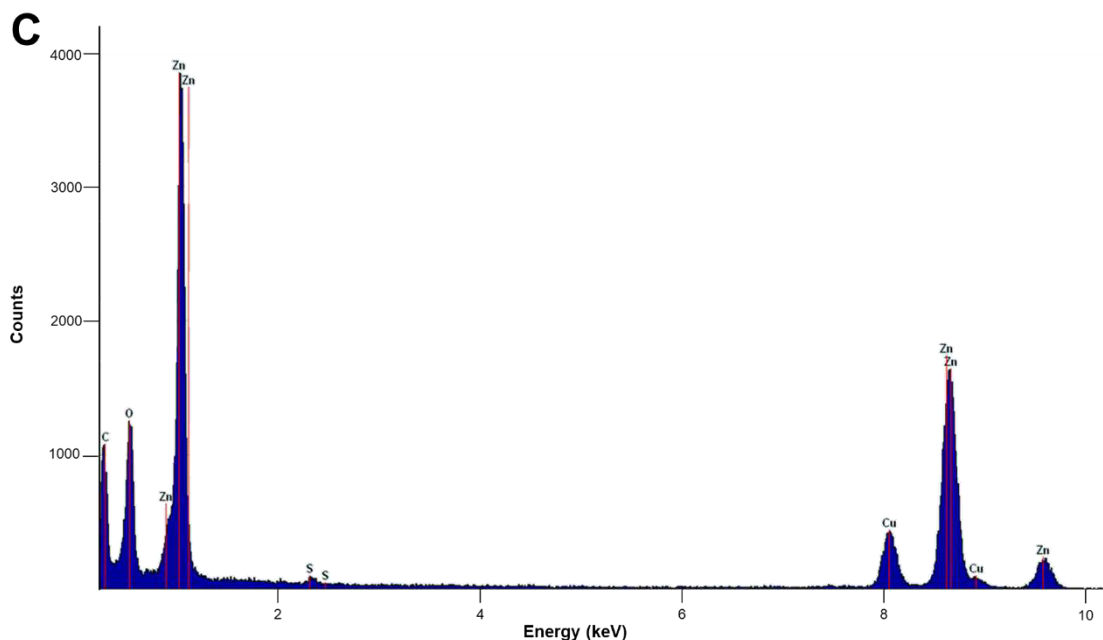
y O, que confirman la presencia de las nanopartículas en la matriz polimérica del EPS. El potencial zeta para este compuesto fue de -84.3 mV.



**Figura 15A. Caracterización de nanopartículas de ZnO estabilizadas con EPS mediante TEM.** Caracterización morfológica y elemental de las NPs de ZnO obtenidas; A muestra una micrografía TEM donde se aprecia que las NPs se encuentran adheridas a la matriz polimérica del EPS



**Figura 15B. Caracterización de nanopartículas de ZnO estabilizadas con EPS mediante TEM.** Caracterización morfológica y elemental de las NPs de ZnO obtenidas; **B** muestra el patrón de difracción de electrones de la muestra de nanopartículas.



**Figura 15C. Caracterización de nanopartículas de ZnO estabilizadas con EPS mediante TEM.** Caracterización morfológica y elemental de las NPs de ZnO obtenidas; C muestra el análisis de EDS donde se evidencia que las NPs obtenidas contienen Zn.

#### 5.4 Síntesis y caracterización de nanopartículas de níquel estabilizadas con EPS

En la síntesis de las NPs de Ni, se realizó un diseño de experimentos similar a los anteriormente descritos, con las mismas concentraciones de EPS y ácido ascórbico, pero utilizando concentraciones de Ni de 10, 50 y 100 mM. Las reacciones se llevaron a cabo en un baño de agua a ebullición por 30 minutos y se midió su espectro UV-Vis de 300-700 nm al terminar el tiempo de reacción, donde se esperaba observar las NPs de Ni entre 330-400 nm. La tabla 3 muestra los 27 experimentos resultantes.

*Tabla 3. Diseño de experimentos utilizado en la síntesis de nanopartículas de Ni.*

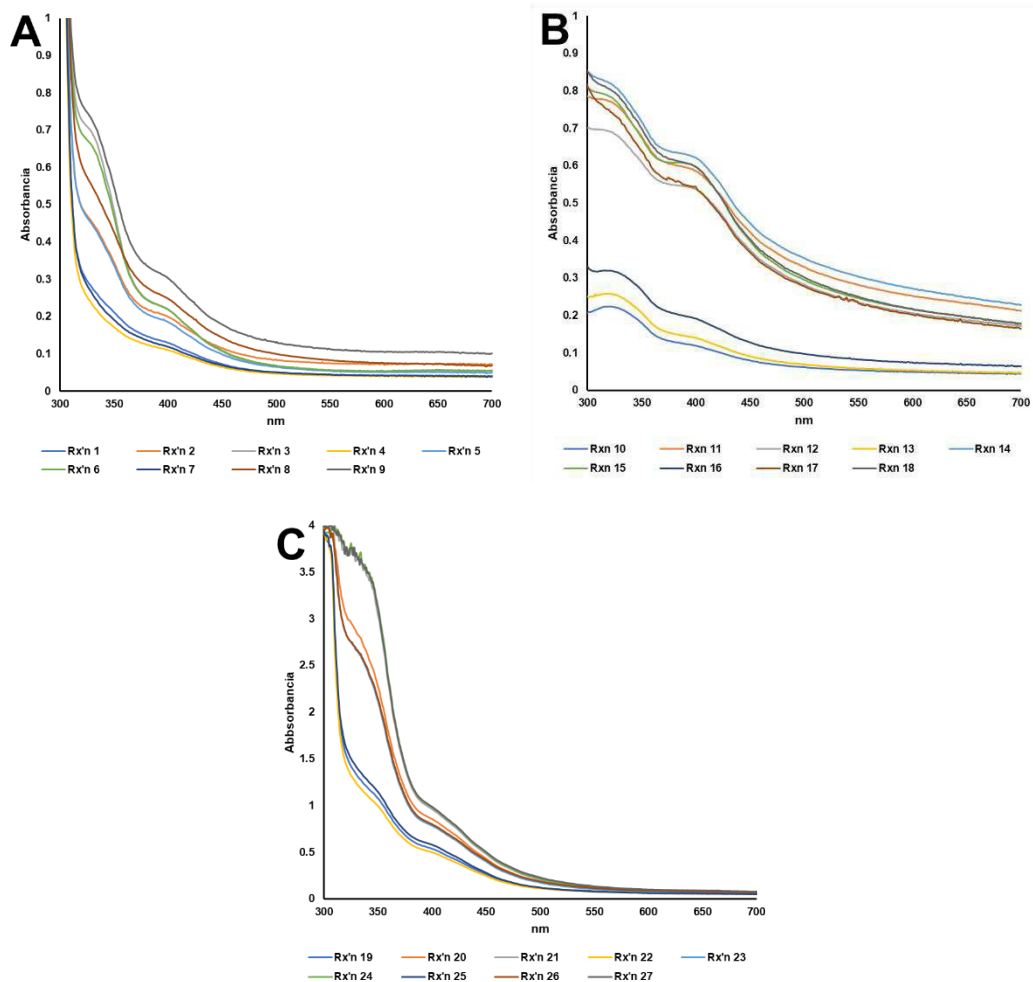
<b>Reacción</b>	<b>Ni(II) [mM]</b>	<b>EPS [mg/mL]</b>	<b>Ác. ascórbico [%]</b>
R1	10	1	2
R2	50	1	2
R3	100	1	2

R4	10	2	2
R5	50	2	2
R6	100	2	2
R7	10	5	2
R8	50	5	2
R9	100	5	2
R10	10	1	4
R11	50	1	4
R12	100	1	4
R13	10	2	4
R14	50	2	4
R15	100	2	4
R16	10	5	4
R17	50	5	4
R18	100	5	4
R19	10	1	10
R20	50	1	10
R21	100	1	10
R22	10	2	10
R23	50	2	10
R24	100	2	10
R25	10	5	10
R26	50	5	10
R27	100	5	10

En la figura 16 se muestran los espectros UV-Vis de las 27 reacciones realizadas, agrupados según la concentración de agente reductor utilizado. La figura 16A muestra las reacciones donde se utilizó 2% de ác. ascórbio, la figura 16B muestra las reacciones donde se utilizó 4% de ác. ascórbio y la figura 16C muestra las reacciones donde se utilizó 10% de ác. ascórbio. Como se puede observar en la figura, los tres grupos de reacciones muestran absorbancia alrededor de los 350 nm, así como en los 400 nm, dentro del rango esperado para las nanopartículas de Ni. De los tres grupos de reacciones aquel donde se utilizó la concentración media de ácido ascórbico (4%) es donde se ven más



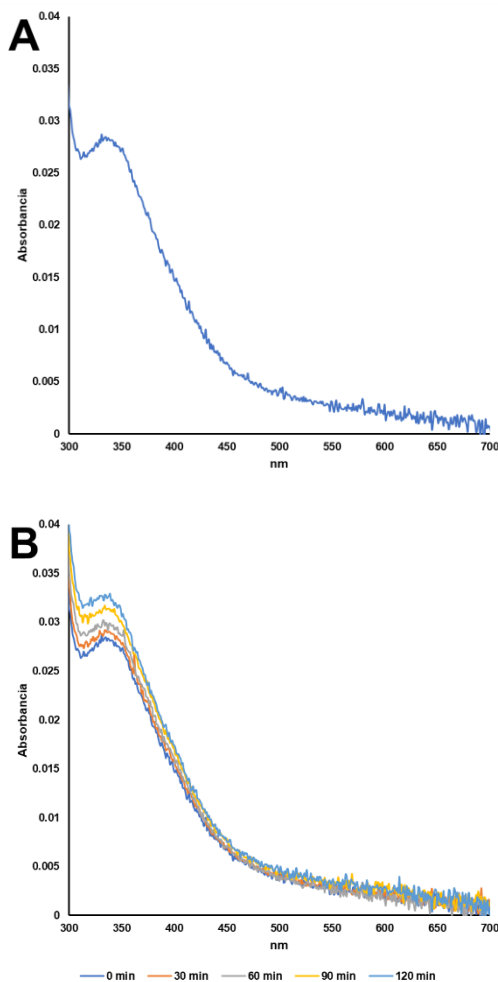
definidos los picos de absorbancia a los 350 nm. Mientras que en los otros dos grupos se observa una zona de absorción más amplia. Debido a estos resultados se seleccionó la reacción 16 para las siguientes determinaciones.



**Figura 16. Espectros UV-Vis de las NPs de Ni obtenidas en las reacciones del diseño de experimentos.** Espectros UV-Vis de cada una de las reacciones resultantes en el diseño de experimentos para la síntesis de nanopartículas de Ni. **A** muestra las reacciones 1 a la 9. **B** muestra las reacciones 10 a la 18. **C** muestra las reacciones 19 a la 27.

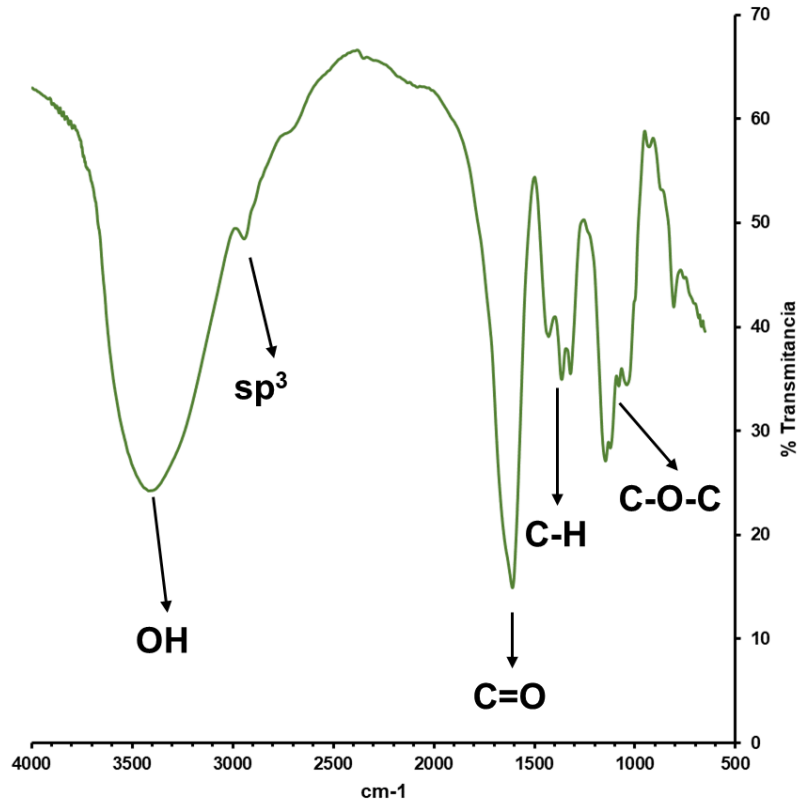
Después del periodo de secado al que se sometió la muestra se procedió a medir nuevamente su SPR. La figura 17A muestra el espectro obtenido para las NPs de *R16*. Se observa una absorbancia cerca de los 350 nm, teniendo un pico máximo de absorción a los 348 nm. Similar con las otras NPs, se tomó una muestra para conocer la estabilidad de las NPs en el medio de cultivo a utilizar

en las pruebas antimicrobianas y antibiofilm, se midió el espectro UV-Vis a diferentes tiempos. La figura 17B muestra los espectros obtenidos en este medio de cultivo.



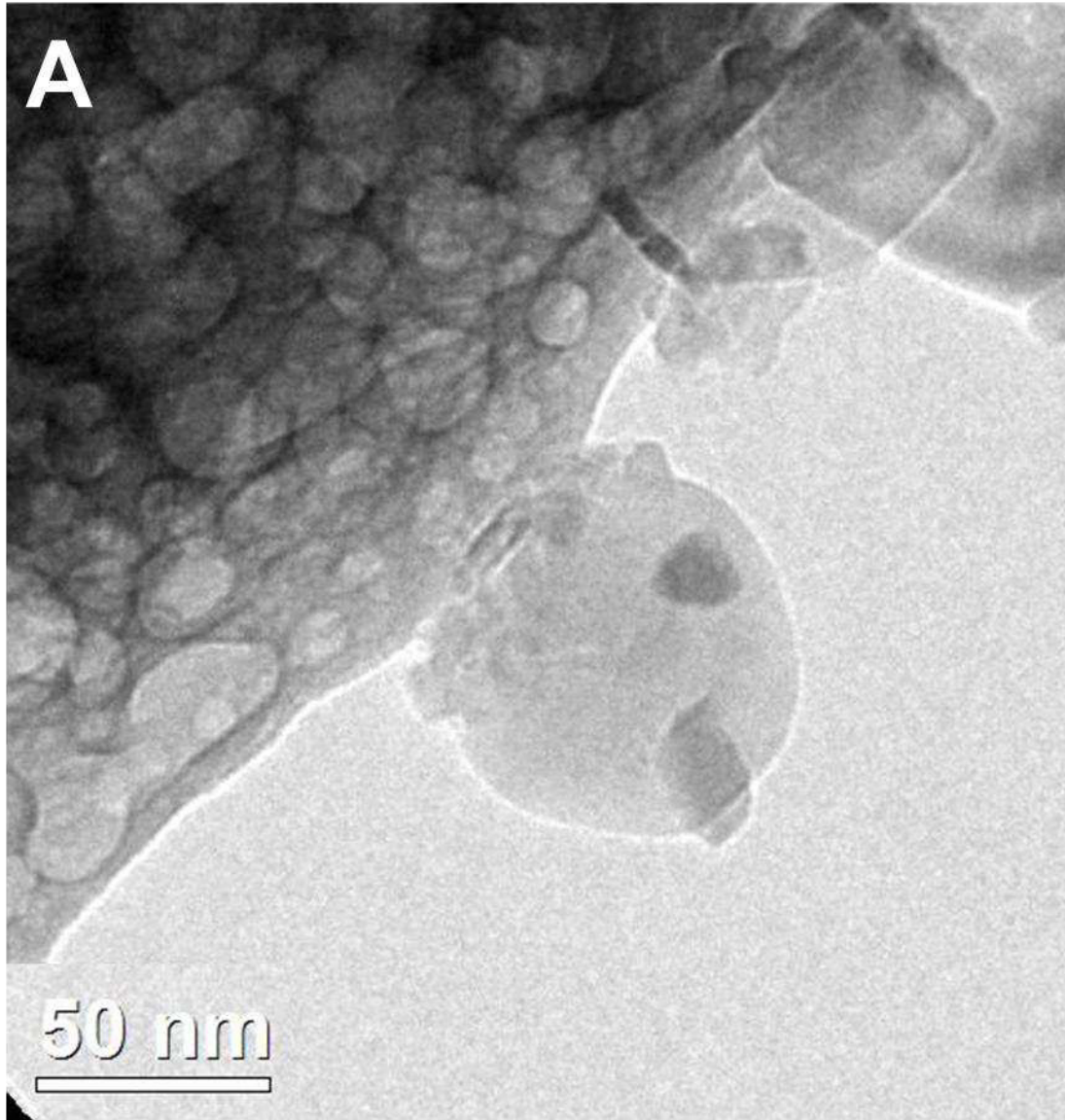
**Figura 17. Espectro UV-Vis de nanopartículas de Ni obtenidos en la reacción R16. A** Absorción del SPR de las nanopartículas de Ni obtenidas. **B** Cambios en el SPR de las nanopartículas de Ni sintetizadas con respecto al tiempo en medio LBB a pH 7.

Se determinó el espectro IR de estas nanopartículas para corroborar que se sintetizaron en la matriz polimérica del EPS. La figura 18 muestra que las partículas presentan los grupos funcionales encontrados en el FTIR del EPS antes de las reacciones, con ligeros cambios en cuanto a su intensidad.

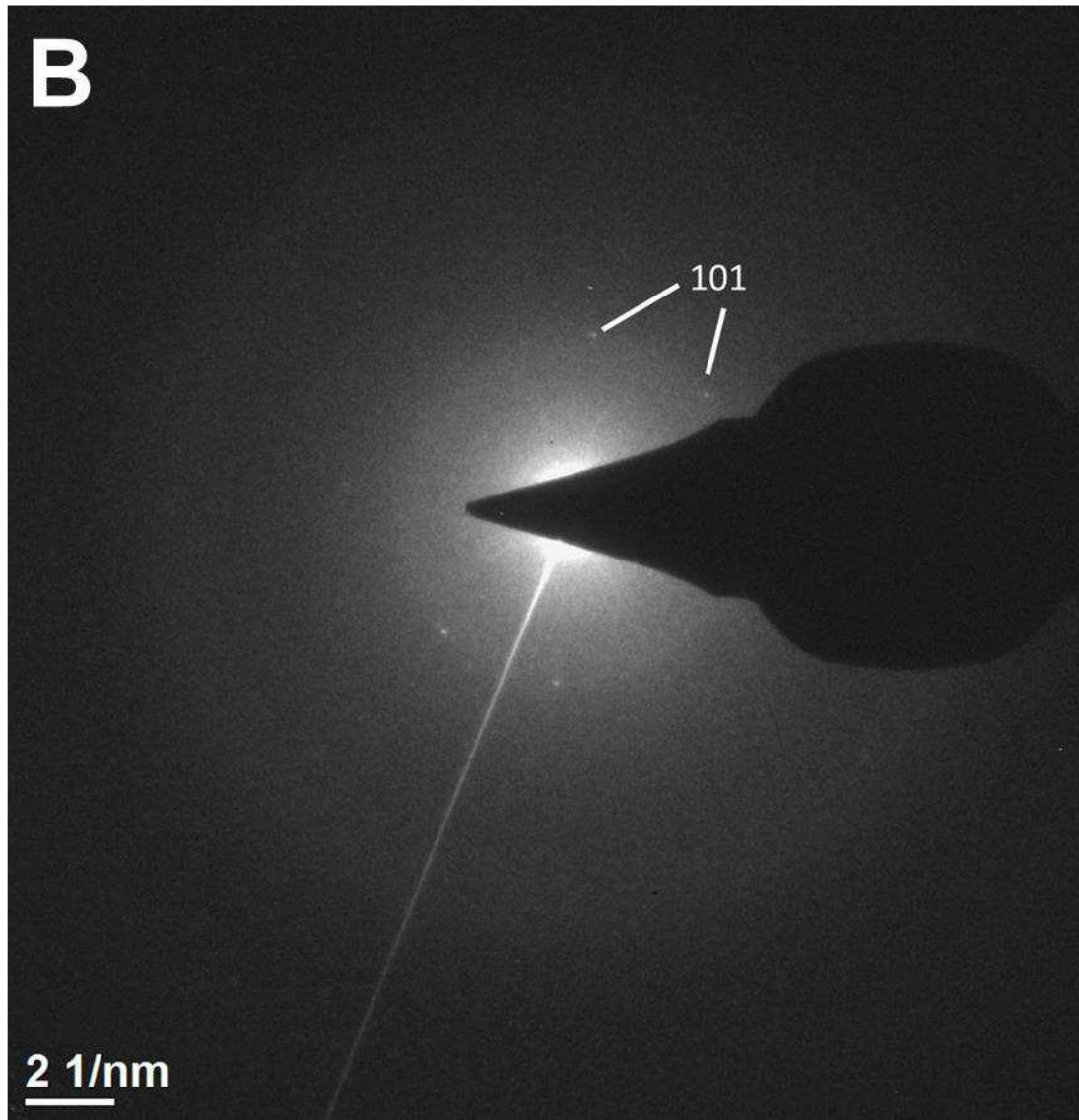


**Figura 18. Espectro IR de las nanopartículas de Ni sintetizadas.** FTIR de las NPs de Ni sintetizadas en la matriz polimérica del EPS bajo las condiciones de la reacción número 16 del diseño de experimentos planteado en el presente trabajo.

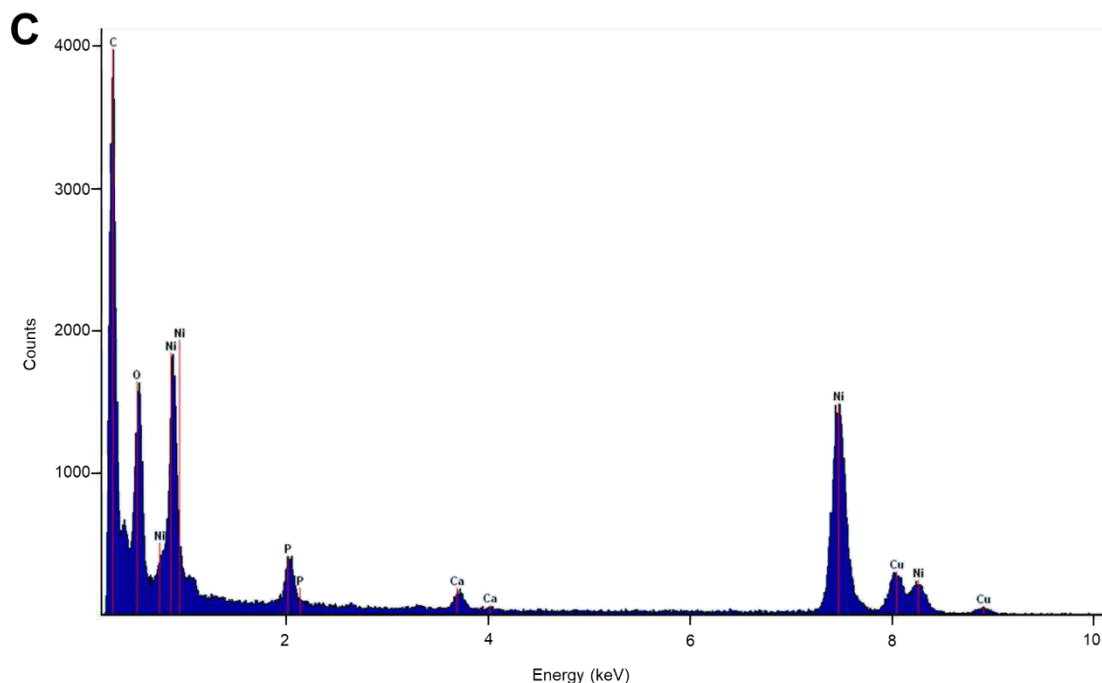
Para conocer la morfología de las NPs sintetizadas se realizó una microscopía TEM. En la figura 19A se muestra la forma de las nanopartículas obtenidas, se puede observar que poseen un arreglo polimórfico sin una forma definida, similar al observado con Zn. El diámetro de estas nanopartículas se encuentra entre los 17 y los 52 nm con un promedio de  $26.73 \pm 8.99$  nm. El patrón SAED de las nanopartículas de Ni sintetizadas muestra anillos y puntos brillantes debido a la naturaleza amorfa del EPS y lo cristalino de las NPs de Ni (figura 19B). Estos pueden ser atribuidos a los planos [1,0,1] del cristal de NiO con geometría romboédrica (91). El análisis EDS se puede observar en la figura 19C. Éste muestra la presencia de Ni, C y O, que confirman la presencia de las nanopartículas en la matriz polimérica del EPS. El potencial zeta para este compuesto es de -8.6 mV.



**Figura 19A. Caracterización mediante TEM de nanopartículas de NiO estabilizadas con EPS.** Caracterización morfológica y elemental de las NPs de NiO obtenidas; A muestra una micrografía TEM donde se aprecia que las NPs se encuentran adheridas a la matriz polimérica del EPS.



**Figura 19B.** Caracterización mediante TEM de nanopartículas de NiO estabilizadas con EPS. Caracterización morfológica y elemental de las NPs de NiO obtenidas; **B** muestra el patrón de difracción de electrones de la muestra de nanopartículas.



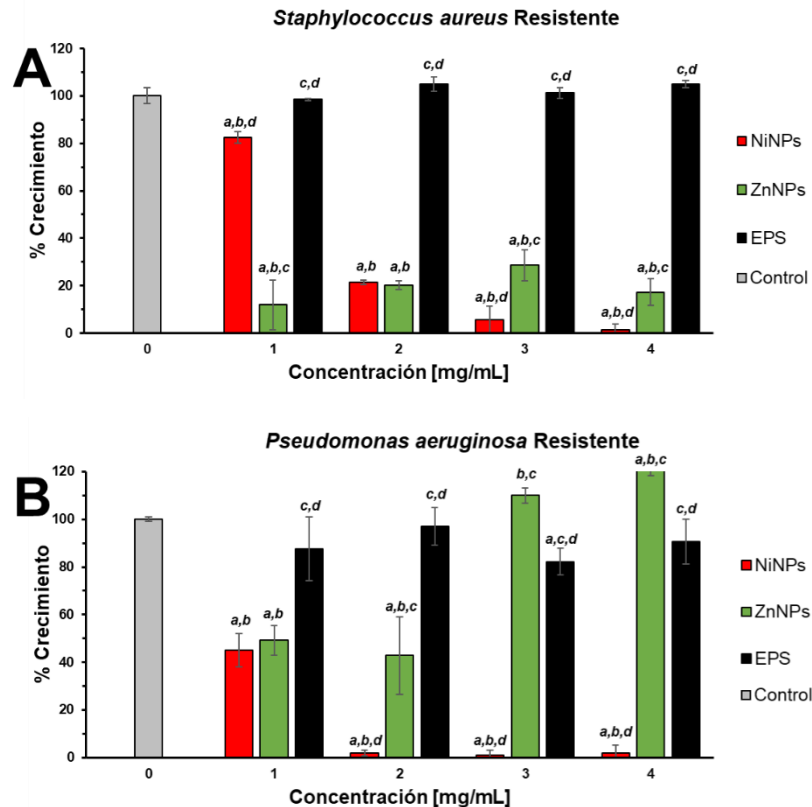
**Figura 19C. Caracterización mediante TEM de nanopartículas de NiO estabilizadas con EPS.** Caracterización morfológica y elemental de las NPs de NiO obtenidas; C muestra el análisis de EDS donde se evidencia que las NPs obtenidas contienen Ni.

### 5.5 Pruebas antimicrobianas de las nanopartículas sintetizadas en EPS

Una vez que se realizó la síntesis y caracterización de las NPs planteadas en este trabajo, se realizaron las pruebas antimicrobianas con el fin de determinar si las NPs eran capaces de inhibir cepas de aislados clínicos consideradas como fármaco-resistentes. Para ello se expusieron cultivos de la cepa grampositiva *Staphylococcus aureus* resistente y la cepa gramnegativa *Pseudomonas aeruginosa* resistente a distintas concentraciones de los compósitos.

En los ensayos realizados con *SaR* se encontró que el compósito que contiene NPs de Ni inhibió el crecimiento de esta cepa en más de 90% a concentraciones de 3 y 4 mg/mL, hasta un 80% utilizando 2 mg/mL y solo un 20% de inhibición en los pocillos que se trataron con 1 mg/mL, como se puede observar en la figura 20A. Cada uno de los tratamientos con este compósito mostró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) al ser comparado con el control sin

tratamiento y el tratamiento solo con EPS a las mismas concentraciones. La inhibición causada por los tratamientos de 3 y 4 mg/mL no mostraron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) al ser comparados entre ellos.



**Figura 20. Actividad antimicrobiana de EPS y los compósitos sintetizados contra cepas resistentes a antibióticos.** Porcentaje de crecimiento de las cepas *SaR* y *PaR* tratadas con los compósitos de Ni y Zn sintetizados. **A** muestra los efectos de los compósitos y el EPS en la cepa *SaR*. **B** muestra el efecto de los compósitos y el EPS en la cepa *PaR*. *a*, *b*, *c* y *d* muestran que el tratamiento posee diferencia significativa en comparación con el tratamiento control, con EPS, con NiNPs y con ZnNPs, respectivamente. Las barras de error representan la desviación estándar. Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

Cuando se trató esta cepa con las diferentes concentraciones del compósito que contiene las NPs de Zn se encontró en general una inhibición de más del 70%. Se observan inhibiciones del 90, 80, 70 y 80% con 1, 2, 3 y 4 mg/mL, respectivamente, como se muestra en la figura 20A. Como se observó con los resultados del compósito de Ni, cada tratamiento con el compósito de Zn mostró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el control sin

tratamiento y los tratamientos de EPS a las mismas concentraciones. Entre los tratamientos con el compuesto de Zn, solamente el tratamiento donde se utilizó 3 mg/mL mostró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a los demás tratamientos. Comparando la inhibición del crecimiento de estos compósitos en la cepa *SaR*, al utilizar una concentración de 2 mg/mL no se encontró una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

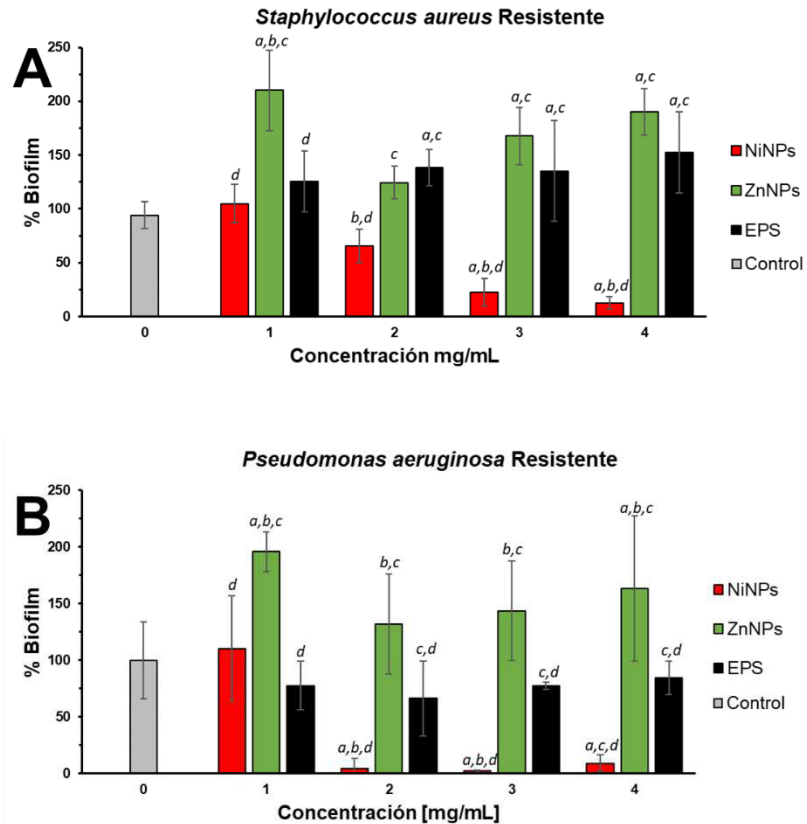
Cuando se trató la cepa *PaR* con el compuesto que contiene las NPs de Ni se encontró que al utilizar 2, 3 y 4 mg/mL se inhibió más del 90% el crecimiento de esta cepa, mientras que al utilizar 1 mg/mL se inhibió más del 50%, como se muestra en la figura 20B. Cada uno de los tratamientos mostró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control y al tratamiento con EPS a la misma concentración. No se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la inhibición del crecimiento causada por los tratamientos a 2, 3 y 4 mg/mL. Sin embargo, al tratar *PaR* con el compuesto de ZnNPs se obtuvo un comportamiento diferente al observado contra *SaR*. Para la cepa *PaR* se encontró una inhibición del crecimiento de alrededor del 50% al utilizar 1 y 2 mg/mL, pero no se observó inhibición a concentraciones mayores, como se muestra en la figura 20B. De estos tratamientos, únicamente en aquel donde se utilizó 3 mg/mL no se observó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) comparado con el control sin tratamiento, mientras que los demás tratamientos si poseen diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control y al tratamiento con EPS a la misma concentración. Al comparar la inhibición causada por las diferentes nanopartículas, no se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos a 1 mg/mL.



## 5.6 Efecto de las nanopartículas sintetizadas en EPS sobre la producción de biofilm

Se utilizaron diferentes concentraciones tanto del EPS como de los compósitos obtenidos al sintetizar las nanopartículas de Ni y Zn como agentes inhibidores de la producción de biofilm. En los ensayos donde se trató a *SaR* con el compósito con NiNPs la formación de biofilm se inhibió hasta un 80% y 90% (con respecto al control) al utilizar 3 y 4 mg/mL, respectivamente, como se muestra en la figura 21A. Estos dos tratamientos mostraron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control y al tratamiento con EPS a las mismas concentraciones. Por otra parte, no se observó inhibición de la producción de biofilm al utilizar las diferentes concentraciones tanto de EPS como del compósito con ZnNPs, si no un aumento en la producción del mismo. Además, al comparar la inhibición en la producción de biofilm en los tratamientos con las diferentes nanopartículas, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos donde se utiliza la misma concentración.

Cuando se trataron los cultivos de *PaR* con el compósito que contiene NiNPs se encontró más del 90% de inhibición en la producción de biofilm de esta cepa al utilizar 2, 3 y 4 mg/mL, observando que estadísticamente no hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre estos tratamientos, como se observa en la figura 21B. Únicamente el cultivo tratado con 1 mg/mL de este compósito no mostró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con el control sin tratamiento, mientras que los tratamientos a 2, 3 y 4 mg/mL mostraron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) al ser comparados con los tratamientos con EPS a estas concentraciones. Mientras tanto, similar a lo observado con *SaR*, al tratar los cultivos de *PaR* con el compósito de ZnNPs se observó un incremento en la producción de biofilm, figura 21B, además, no se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la inhibición de biofilm al tratar el cultivo con EPS.

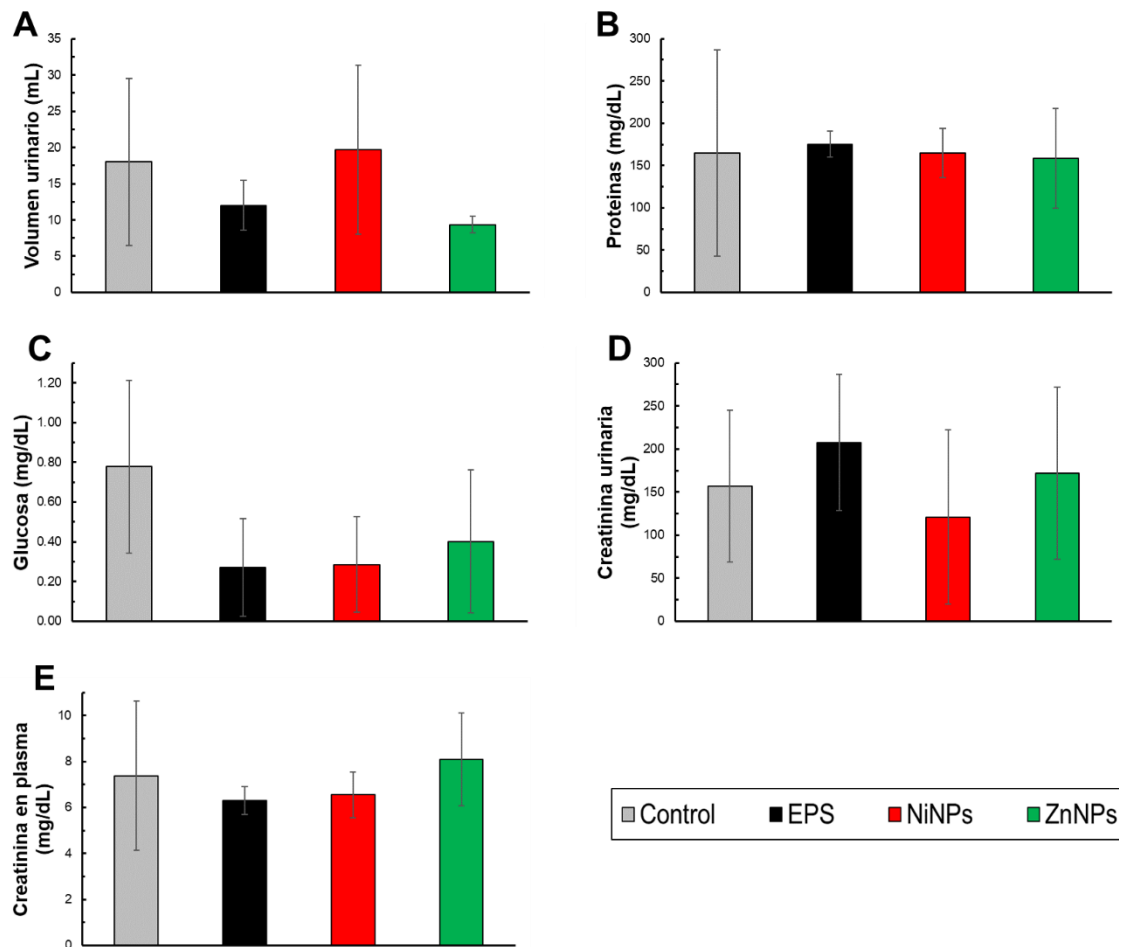


**Figura 21. Actividad inhibidora de biofilm de EPS y los compósitos sintetizados contra cepas resistentes a antibióticos.** Porcentaje de biofilm producido por las cepas resistentes al ser tratados con diferentes concentraciones de los compósitos. A muestra el efecto del EPS y los compósitos con NPs de NiO y ZnO contra SaR. B muestra el efecto del EPS y los compósitos con NPs de NiO y ZnO contra PaR. *a, b, c* y *d* muestran que el tratamiento posee diferencia significativa en comparación con el tratamiento control, con EPS, con NiNPs y con ZnNPs, respectivamente. Las barras de error representan la desviación estándar. Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

### 5.7 Análisis de la toxicidad *in vivo* de las nanopartículas sintetizadas en EPS

Para comprobar la seguridad de los compósitos que contienen nanopartículas de NiO y ZnO sintetizadas, se realizó un ensayo de toxicidad en ratas Wistar macho, administrando dosis orales de 6 mg/mL. Para este estudio se analizaron diferentes parámetros renales, volumen urinario, concentraciones urinarias de proteínas, glucosa, así como creatinina en plasma y orina. La figura

22 muestra los resultados obtenidos para estos parámetros. En los resultados obtenidos para el volumen urinario (figura 22A), proteínas y glucosa (figura 22B y C) se puede observar que no existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control y los grupos tratados, tanto con EPS como con los compósitos. De manera similar, la concentración urinaria y plasmática de creatinina (figura 22D y E) tampoco se encontró una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos y el control del cultivo. Además, no se observaron cambios en la apariencia física ni en el comportamiento de las ratas durante el periodo de tratamiento.



**Figura 22. Parámetros de función renal de ratas Wistar tratadas con EPS y los compósitos sintetizados.** El ensayo se realizó administrando dosis de 6 mg/mL vía oral de buffer (control), EPS, NPs de Ni y Zn. **A** volumen urinario; **B** proteínas; **C** glucosa; **D** creatinina urinaria y **E** creatinina en plasma. Barras de error representan la desviación estándar. Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

## 5.8 Efecto de los antibióticos y su combinación con compósitos con nanopartículas sobre el crecimiento microbiano

Para conocer la interacción de los compósitos sintetizados en conjunto con antibióticos y su posible efecto inhibitorio sobre las cepas clínicas primero se realizó la determinación de la MIC de estas cepas a los antibióticos ampicilina, kanamicina, cloranfenicol y ciprofloxacino, y se compararon estos valores contra los encontrados y registrados por el grupo de investigación para las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*Pa*) y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (*Sa*). Estos datos se muestran en la tabla 4.

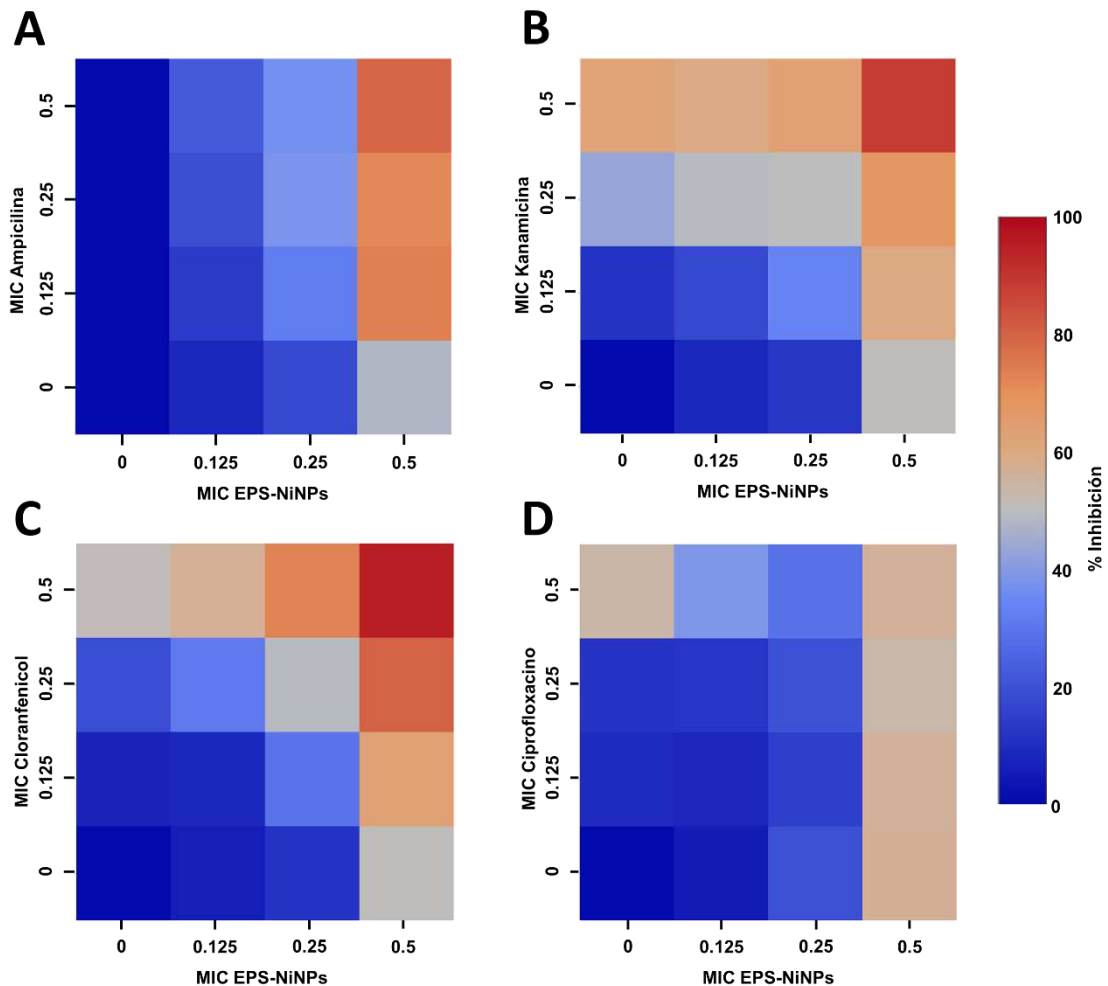
**Tabla 4. Concentraciones mínimas inhibitorias de antibióticos**

<b>Antibiótico</b>	<b>Concentración mínima inhibitoria (ppm)</b>					
	<i>PaR</i>	<i>Pa</i>	Incremento (x veces)	<i>SaR</i>	<i>Sa</i>	Incremento (x veces)
<b>Ampicilina</b>	8	16	---	512	0.0625	8192
<b>Kanamicina</b>	8192	16	512	8192	16	512
<b>Cloranfenicol</b>	128	8	16	64	1	64
<b>Ciprofloxacino</b>	32	0.125	256	32	0.125	256

Una vez determinada la concentración inhibitoria de los antibióticos, se procedió a realizar las combinaciones de estos con el compósito que contiene las nanopartículas de níquel, ya que este fue capaz de inhibir ambos microorganismos. Se probaron combinaciones de 0.5, 0.25, 0.125 y 0 veces la MIC obtenida del compósito con las mismas fracciones de la MIC de cada antibiótico, para tener un total de 9 combinaciones para cada par compósito-antibiótico.

Se obtuvieron buenas interacciones con ampicilina, kanamicina y cloranfenicol en los ensayos realizados con *SaR*, así como con kanamicina y cloranfenicol en los ensayos realizados con *PaR*. Obteniendo resultados no inhibitorios en las combinaciones compósito-ciprofloxacino.

En los ensayos donde se combinó el compósito con ampicilina, al utilizarse contra *SaR* (figura 23A) se obtuvo más de un 70% de inhibición en las combinaciones que utilizan 0.5 veces la MIC del compósito con las tres fracciones de MIC del antibiótico, siendo estas tres combinaciones diferentes significativamente ( $p < 0.05$ ) de sus respectivos controles, los tratamientos con los componentes por separado a esas concentraciones. Las 6 combinaciones restantes también presentaron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) de sus respectivos controles, inhibiendo entre 31-36% las combinaciones realizadas con 0.25 MIC del compósito y entre 13-22% las combinaciones realizadas con 0.125 MIC del compósito. Las 9 combinaciones realizadas presentaron sinergia en su efecto inhibitorio contra *SaR* (figura 24A). En las combinaciones utilizadas contra *PaR* (figura 25A) no se encontraron buenas inhibiciones de esta cepa, observando que siete de las nueve combinaciones utilizadas no presentan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a alguno de sus controles, mientras que en aquellas que presentaron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) no se observó sinergia en su interacción (figura 26A), siendo la combinación de 0.125 MIC de ambos componentes de naturaleza aditiva y la que combina 0.5 MIC de ambos componentes de naturaleza antagónica. Mientras que cuatro combinaciones presentan naturaleza sinérgica, probablemente por la diferencia que existe entre uno de sus dos controles.

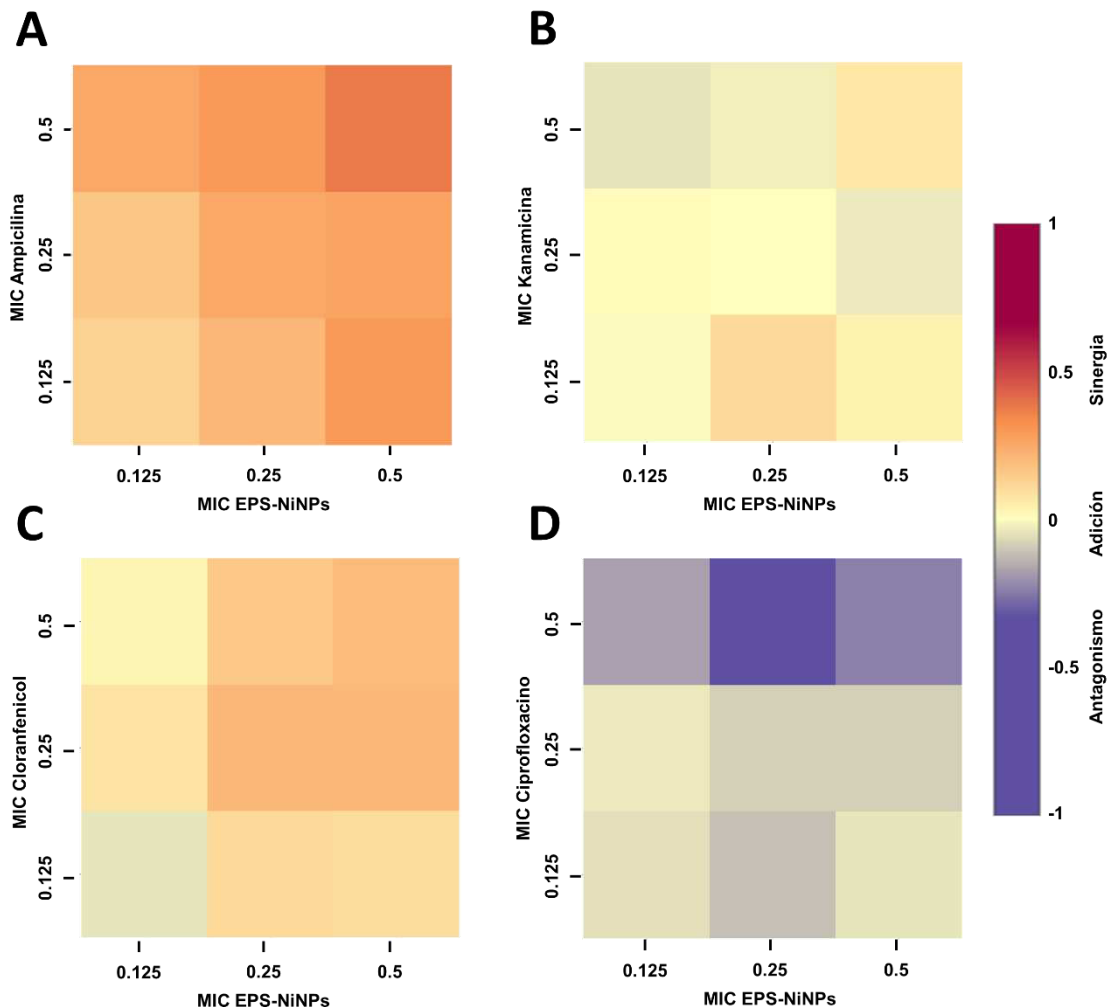


**Figura 23. Efecto inhibitorio de fracciones de MIC de antibióticos potenciados por el compuesto EPS-NiO contra la cepa clínica de *Staphylococcus aureus* resistente.** Mapas de calor de los porcentajes de inhibición causados por las combinaciones de antibiótico-compósito utilizadas. La barra de color indica el porcentaje de inhibición de crecimiento que representa el gradiente de colores. El eje x muestra las fracciones de la MIC del compuesto y el eje y muestra las fracciones de la MIC de los antibióticos ampicilina (A), kanamicina (B), cloranfenicol (C) y ciprofloxacino (D).

En los ensayos donde se utilizaron las combinaciones compuesto-kanamicina, en ambas cepas se observaron buenas interacciones. En los ensayos realizados con *SaR* (figura 23B) únicamente las combinaciones donde se utilizó 0.5 MIC de kanamicina con 0.125 y 0.25 MIC del compuesto no presentaron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con alguno de sus controles, mientras que las siete combinaciones restantes si presentaron esta diferencia

( $p < 0.05$ ). La combinación donde se utilizó 0.5 MIC de cada componente presentó buena inhibición, dando casi un 90% de inhibición. Mientras que las combinaciones restantes presentaron inhibiciones de 60 y 67% donde se utilizó 0.5 MIC del compuesto con 0.125 y 0.25 MIC de kanamicina, respectivamente; 33 y 49% donde se utilizó 0.25 MIC del compuesto con 0.125 y 0.25 MIC de kanamicina, respectivamente; así como 17 y 48% donde se utilizó 0.125 MIC el compuesto con 0.125 y 0.25 MIC de kanamicina, respectivamente.

Las interacciones observadas con estas combinaciones son en su mayoría sinérgicas (figura 24B). Para la combinación de 0.5 MIC de ambos componentes se observó una interacción sinérgica, las dos combinaciones donde no se observó diferencia significativa presentaron una interacción de naturaleza antagónica mientras que la combinación donde se utilizó 0.25 MIC de cada componente se observó una interacción de naturaleza aditiva. Al utilizar esta combinación en los cultivos de *PaR* (figura 25B) cuatro de las nueve combinaciones mostraron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a sus controles, siendo estas las combinaciones de 0.5 MIC del compuesto con 0.5 y 0.25 MIC de kanamicina, con 84 y 71% de inhibición, respectivamente; la combinación de 0.25 MIC del compuesto con 0.125 MIC de kanamicina, con 27% inhibición, así como la combinación de 0.125 MIC del compuesto con 0.25 MIC de kanamicina con 43% inhibición. En cuanto a las interacciones, únicamente tres presentaron naturaleza sinérgica (figura 26B), siendo estas 0.5 MIC del compuesto con 0.5 y 0.125 MIC de kanamicina y 0.25 MIC del compuesto con 0.125 MIC de kanamicina.



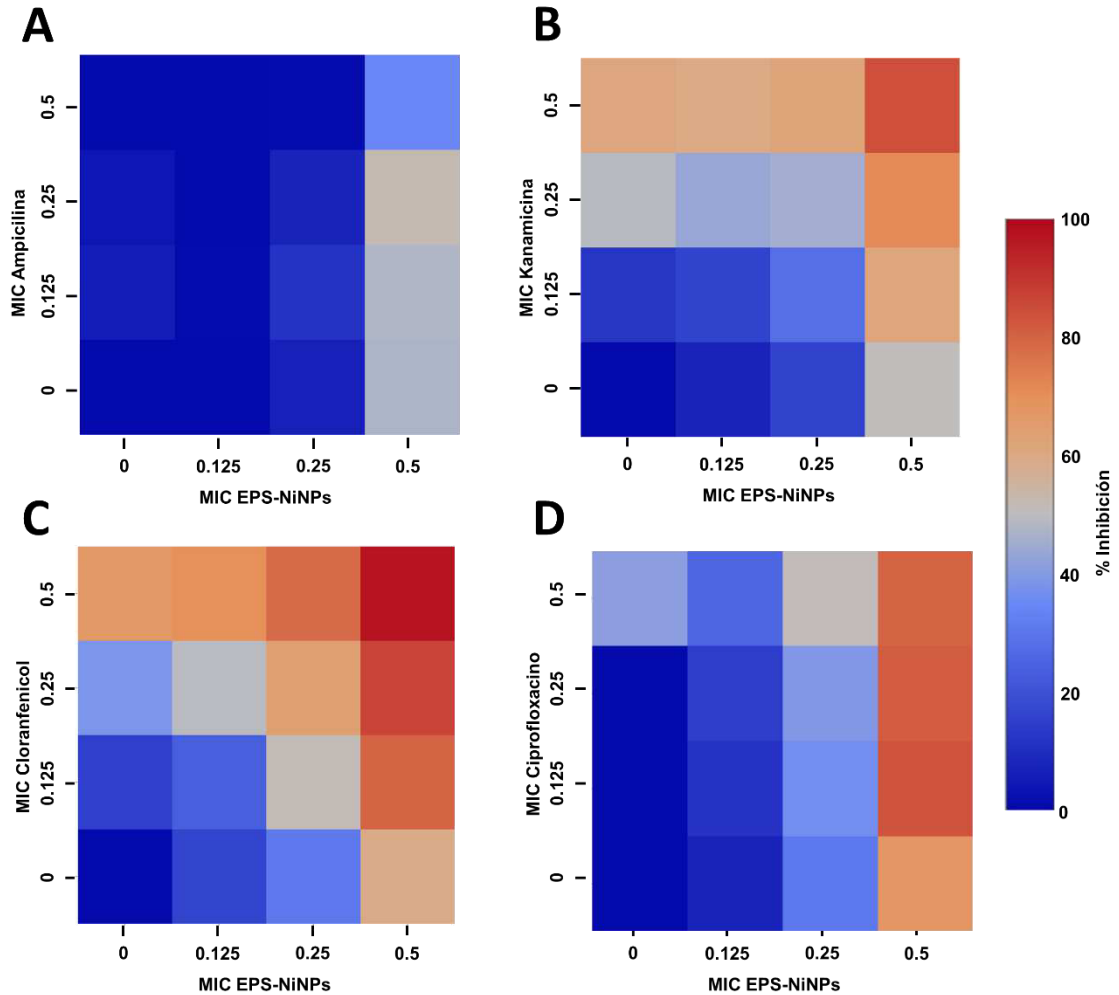
**Figura 24. Análisis de las interacciones antibiótico-compósito EPS-NiO contra la cepa clínica de *Staphylococcus aureus* resistente.** Mapa de calor del efecto antagonístico (<0), aditivo (=0) y sinérgico (>0) de las combinaciones antibiótico-compósito realizadas. La barra de color indica el grado de interacción que representa el gradiente de colores. El *eje x* muestra las fracciones de la MIC del compósito y el *eje y* muestra las fracciones de la MIC de los antibióticos ampicilina (A), kanamicina (B), cloranfenicol (C) y ciprofloxacino (D).

En los ensayos donde se combinó el compósito sintetizado con el antibiótico cloranfenicol se observaron buenas interacciones, así como un buen efecto inhibitorio. Cuando se utilizaron las combinaciones contra *SaR* (figura 23C) se observó que ocho de las nueve combinaciones presentaron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a sus respectivos controles, únicamente la combinación donde se utilizó 0.125 MIC de cada componente no presentó



diferencia con los controles. Se encontró un efecto inhibitorio del 95% al utilizar 0.5 MIC de cada componente, y un 80% al utilizar 0.5 y 0.25 MIC del compuesto y del antibiótico, respectivamente.

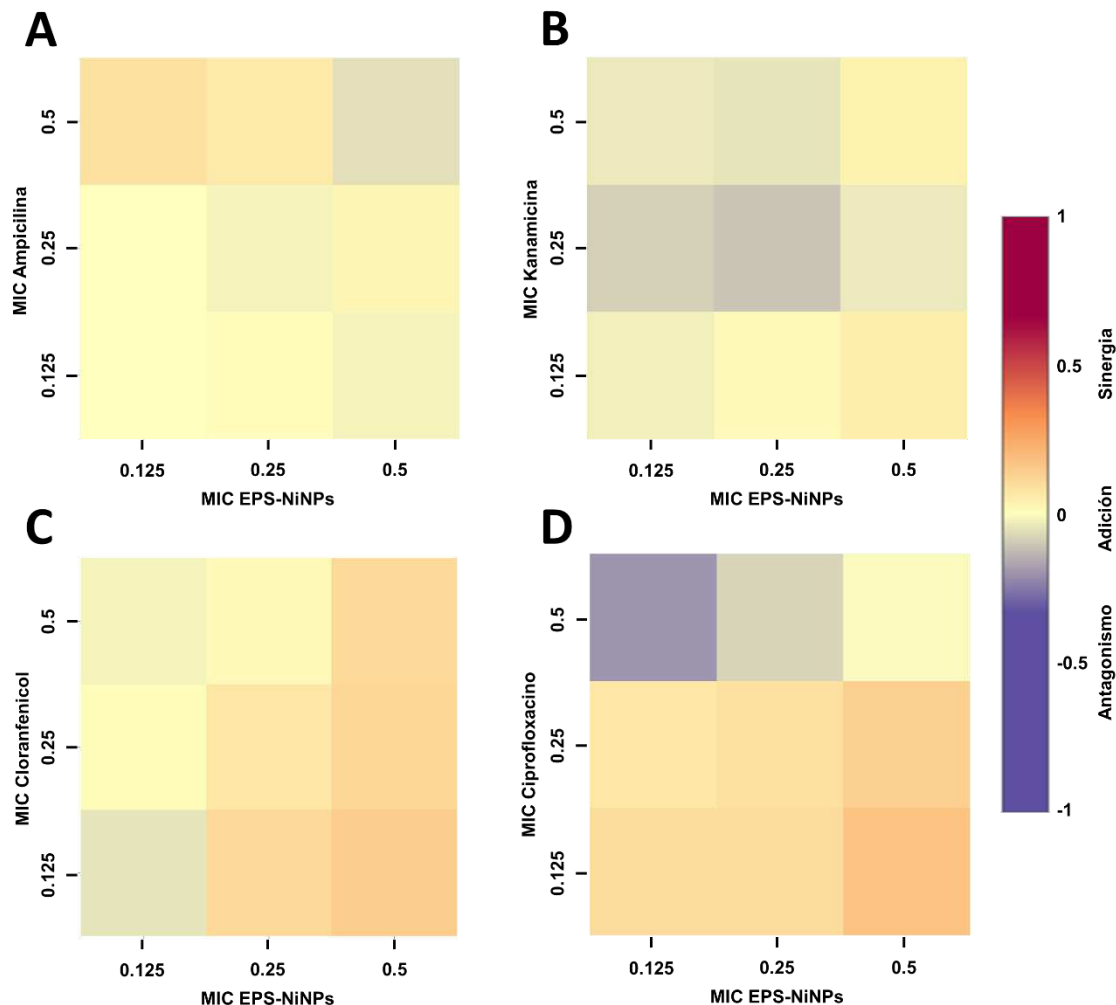
Para estas combinaciones se encontró que la mayoría son de naturaleza sinérgica (figura 24C), con excepción de aquella donde no se observó diferencia con respecto a los controles utilizados. Al realizar estos ensayos combinatorios contra la cepa *PaR* (figura 25C), observamos inhibiciones similares a las encontradas con *SaR*. Dos de las nueve combinaciones no presentaron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con sus controles. De las siete combinaciones restantes, las que presentaron mejor inhibición fueron aquellas donde se combinó 0.5 MIC del compuesto con las diferentes concentraciones de cloranfenicol, aumentando su efecto inhibitorio al incrementar la concentración del antibiótico, siendo 80, 86 y 97% de inhibición para las fracciones con 0.125, 0.25 y 0.5 MIC de cloranfenicol, respectivamente. Las interacciones de estas combinaciones mostraron naturaleza antagónica para las dos que no presentaron diferencia significativa (figura 26C), mientras que las siete combinaciones restantes resultaron sinérgicas para las concentraciones utilizadas en este estudio.



**Figura 25.** Efecto inhibitorio de fracciones de MIC de antibióticos potenciados por el compuesto EPS-NiO contra la cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa* resistente. Mapas de calor de los porcentajes de inhibición causados por las combinaciones de antibiótico-compósito utilizadas. La barra de color indica el porcentaje de inhibición de crecimiento que representa el gradiente de colores. El eje x muestra las fracciones de la MIC del compuesto y el eje y muestra las fracciones de la MIC de los antibióticos ampicilina (A), kanamicina (B), cloranfenicol (C) y ciprofloxacino (D).

Quando se utilizó el compuesto en combinación con el antibiótico ciprofloxacino se encontraron diferentes comportamientos para ambas cepas. Al realizar los ensayos contra *SaR* (figura 23D) solo se observó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en una combinación, donde se combinó 0.5 MIC de ciprofloxacino con 0.125 MIC del compuesto, causando un porcentaje de inhibición menor al encontrado en el control del antibiótico. Mientras que las

demás combinaciones no presentaron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a sus controles. Al analizar la naturaleza de estas interacciones se encontró que todas son de carácter antagónico (figura 24D). Mientras que en los ensayos realizados contra *PaR* se observó un comportamiento diferente. En las tres combinaciones donde se utilizó 0.5 MIC del compuesto con las diferentes fracciones de MIC del antibiótico se presentó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a sus controles (figura 25D), obteniendo un porcentaje de inhibición de 83, 81 y 80% con 0.125, 0.25 y 0.5 MIC de ciprofloxacino, respectivamente; mientras que el resto de las combinaciones no presentan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Al analizar las interacciones se encontró un comportamiento constante (figura 26D); al combinar una fracción de la MIC del compuesto con la fracción baja del antibiótico se obtiene una interacción sinérgica, pero a medida que se aumenta la concentración del antibiótico la interacción se desplaza hacia los valores antagónicos, siendo esta interacción la encontrada en las tres combinaciones donde se utiliza 0.5 MIC del antibiótico.



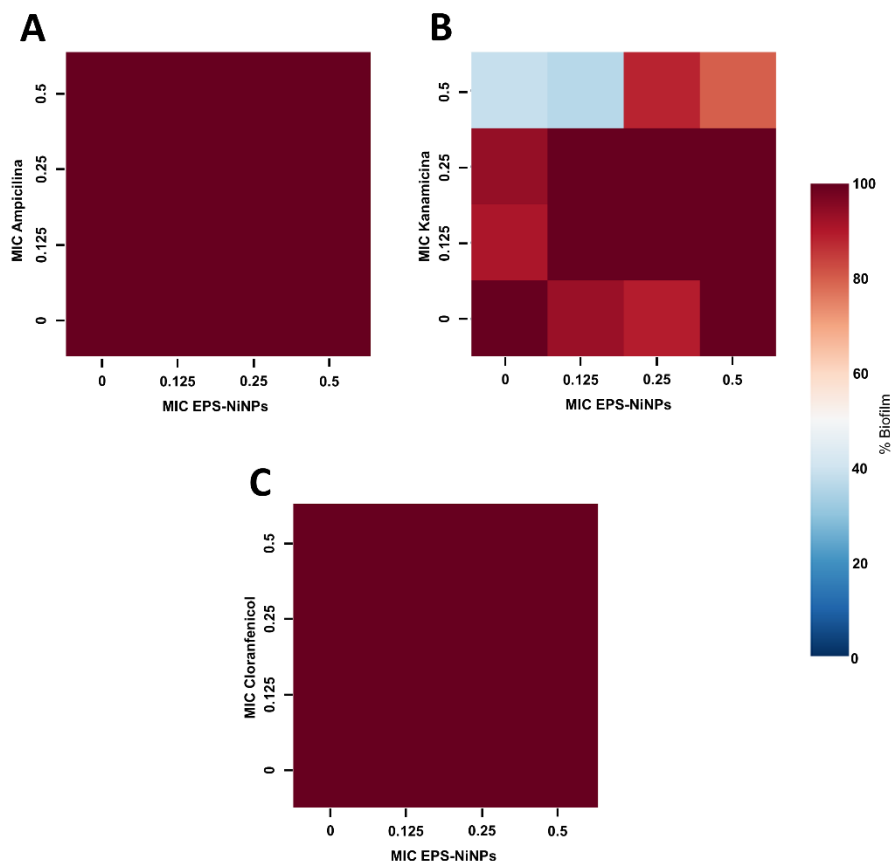
**Figura 26. Análisis de las interacciones antibiótico-compósito EPS-NiO contra la cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa* resistente.** Mapa de calor del efecto antagónico (<0), aditivo (=0) y sinérgico (>0) de las combinaciones antibiótico-compósito realizadas. La barra de color indica el grado de interacción que representa el gradiente de colores. El *eje x* muestra las fracciones de la MIC del compósito y el *eje y* muestra las fracciones de la MIC de los antibióticos ampicilina (A), kanamicina (B), cloranfenicol (C) y ciprofloxacino (D).

### 5.9 Efecto de los antibióticos y su combinación con compósitos con nanopartículas sobre la producción de biofilm

Se analizó la producción de biofilm utilizando combinaciones de manera similar al ensayo de inhibición de crecimiento. En esta ocasión se utilizaron ampicilina, kanamicina y cloranfenicol, dejando fuera del ensayo al antibiótico

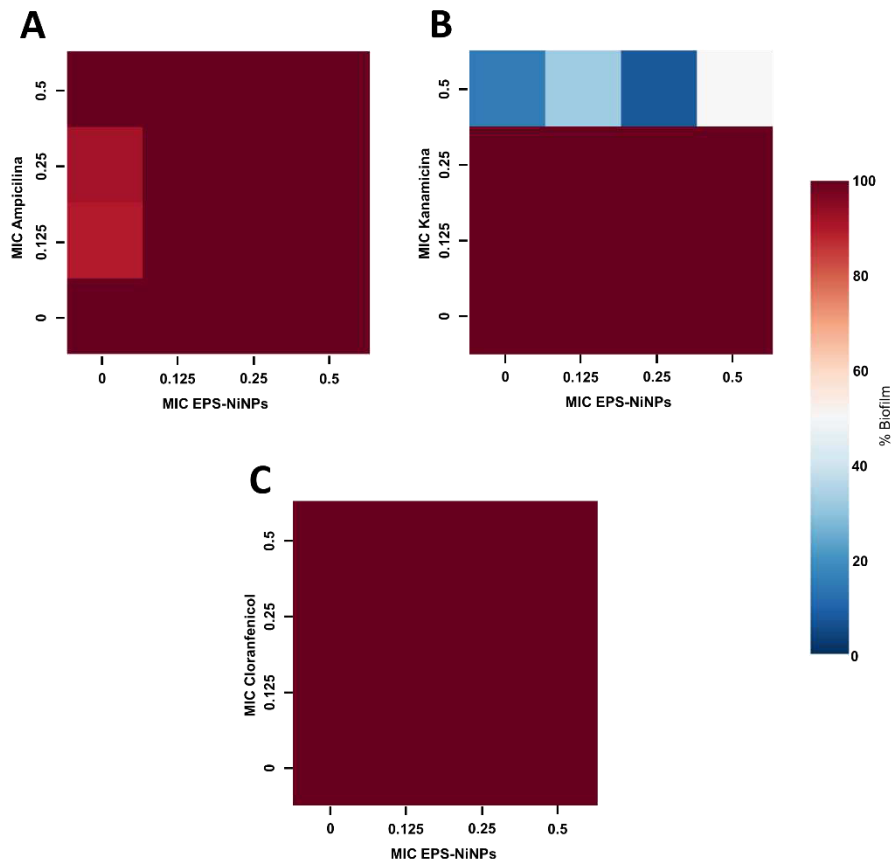
ciprofloxacino por su tendencia a formar combinaciones antagónicas con los compósitos sintetizados.

Las combinaciones se realizaron a las mismas concentraciones que en el ensayo de inhibición de crecimiento, 0.125, 0.25 y 0.5 veces la MIC de cada compuesto. Sin embargo, a diferencia de lo que se observó en dichos ensayos, ambas cepas bacterianas aumentaron la producción de biofilm tanto con los compuestos individuales como en las combinaciones de concentraciones subinhibitorias, como se muestra en las figuras 27 y 28, resultando en condiciones de antagonismo entre los compósitos sintetizados y los antibióticos en cuanto a la disminución de la producción de biofilm.



**Figura 27. Producción de biofilm de la cepa clínica de *Staphylococcus aureus* resistente al utilizar fracciones de MIC de antibióticos en combinación con el compósito EPS-NiO.** Mapas de calor de los porcentajes de la producción de biofilm causados por las combinaciones de antibiótico-compósito

utilizadas. La barra de color indica el porcentaje de producción de biofilm que representa el gradiente de colores. El eje *x* muestra las fracciones de la MIC del compuesto y el eje *y* muestra las fracciones de la MIC de los antibióticos ampicilina (A), kanamicina (B) y cloranfenicol (C).

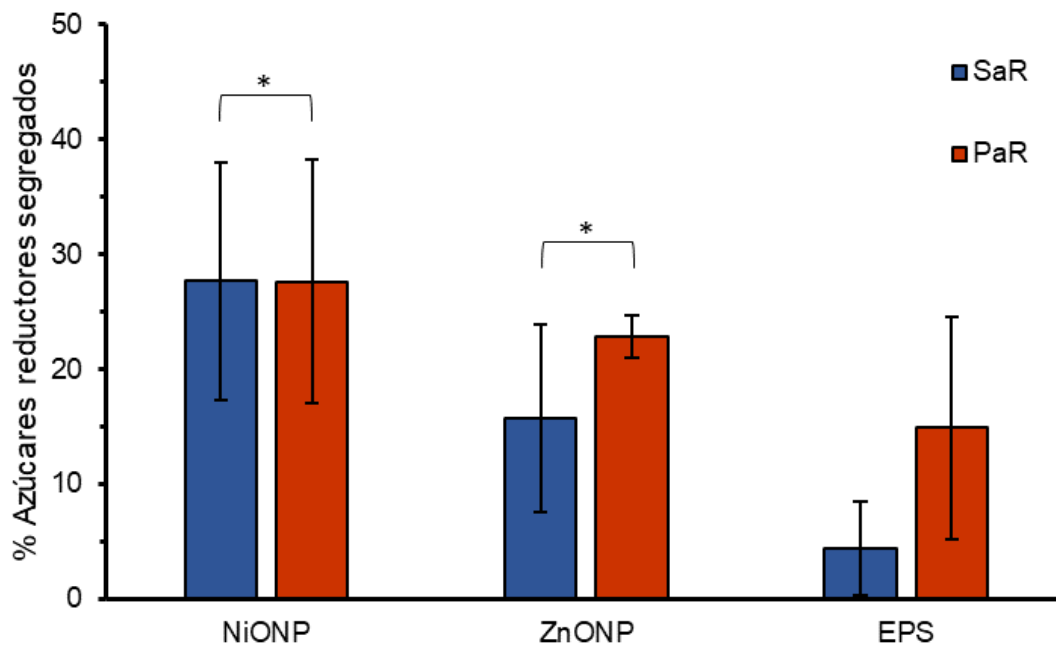


**Figura 28. Producción de biofilm de la cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa* resistente al utilizar fracciones de MIC de antibióticos en combinación con el compuesto EPS-NiO.** Mapas de calor de los porcentajes de la producción de biofilm causados por las combinaciones de antibiótico-compuesto utilizadas. La barra de color indica el porcentaje de producción de biofilm que representa el gradiente de colores. El eje *x* muestra las fracciones de la MIC del compuesto y el eje *y* muestra las fracciones de la MIC de los antibióticos ampicilina (A), kanamicina (B) y cloranfenicol (C).

### 5.10 Efecto de los compósitos sobre la integridad de la membrana celular bacteriana

Con el fin de conocer una posible causa de la inhibición del crecimiento de las cepas debido a la exposición con los compósitos se determinaron los

azúcares reductores en el sobrenadante. Considerando al control sin tratamiento como 0% de azúcares segregados, cuando se trató a *SaR* con cada compuesto se observó un incremento en los azúcares reductores segregados al medio de 27.69, 15.74 y 4.34 % causado por los compósitos que contienen NiONPs, ZnONPs y el EPS sin modificar, respectivamente (figura 29). Ambos compósitos presentaron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control sin tratamiento, mientras que el EPS no presentó diferencia. Al tratar a *PaR* con los compuestos, se observaron resultados similares, con incremento de 27.63, 22.85 y 14.88% de azúcares segregados al utilizar el compósito con NiONPs, ZnONPs y el EPS sin modificar, respectivamente (figura 29). Nuevamente, ambos compósitos mostraron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el control sin tratamiento, mientras que el EPS no mostró esta diferencia.



**Figura 29. Efecto de los compósitos con NiONPs y ZnONPs, y de EPS sobre la segregación de azúcares reductores al medio de cultivo.** Porcentaje de azúcares reductores segregados al medio por *SaR* y *PaR* causado por ambos compósitos sintetizados y el EPS a una concentración de 3 mg/mL considerando el control sin tratamiento como 0%. Las barras de error representan la desviación estándar. \* indica la diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) del control sin tratamiento. Cada experimento fue realizado por triplicado.

## CAPÍTULO 6

### DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En las últimas décadas, la síntesis de nanopartículas ha sido objeto de diversos estudios. Una de las nuevas tendencias es la síntesis mediante diferentes procesos químicos en los que se reduce al máximo la producción de contaminantes, es decir, las llamadas síntesis verdes. En el presente trabajo se propone el uso de un exopolisacárido, producido por la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L, como agente estabilizador, el cual ayudará a disminuir la generación de residuos potencialmente tóxicos para el medio ambiente.

Se realizó la caracterización de los grupos funcionales presentes en el EPS por medio de FTIR. La banda ancha que se encuentra entre 3600-3200  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye al grupo OH- de los alcoholes, la banda observada a 2900  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye al estiramiento del carbono  $\text{sp}^3$ . El pico observado en 1650 se atribuye a un estiramiento del grupo C=O (87). Las bandas que se observan alrededor de 1420  $\text{cm}^{-1}$  se atribuyen a la flexión C-H. Las bandas alrededor de 1250-1050  $\text{cm}^{-1}$  se atribuyen a las vibraciones de estiramiento del enlace C-O-C en derivados de azúcares (92). Estos resultados muestran que el EPS está compuesto principalmente por azúcares y carboxilatos, lo cual concuerda con lo reportado Vazquez-Rodriguez *et al.* (93). El análisis de las nanopartículas obtenidas con los tres metales y recubiertas con EPS mostró la presencia de las mismas bandas observadas en el EPS solo; sin embargo, se apreciaron cambios en su intensidad. Los cambios observados en los espectros FTIR de las compósitos pueden ser explicados por distintos fenómenos que ocurren durante la síntesis de las nanopartículas en relación con la estabilización de estas. La banda correspondiente al C=O se encontró en una longitud de onda un poco menor debido a la conjugación del polímero con las nanopartículas. También se observó que la intensidad de las bandas C-H fueron menores, lo cual sugiere la presencia de interacciones por puentes de hidrógeno, características de los polisacáridos



(3). Un cambio en su frecuencia de vibración ( $\text{cm}^{-1}$ ) y la intensidad de las bandas, se debe a una disminución en la fuerza de los enlaces de los grupos funcionales al coordinarse con el átomo metálico, así como la formación de puentes de hidrógeno con el átomo de oxígeno de las nanopartículas (94–96). Por otro lado, las bandas correspondientes al enlace C-O-C presentaron menor intensidad, mientras que el pico correspondiente al enlace C-O, alrededor de  $1300 \text{ cm}^{-1}$ , presentó una mayor intensidad que antes de la reacción con los metales. El cambio en estas bandas puede ser causado por la participación del EPS en la síntesis. Debido a que la reacción de síntesis se desarrolla en un medio acuoso, la presencia de oxígeno, disuelto o como parte de la estructura de EPS, juega un papel importante en la síntesis, ya que las nanopartículas de estos metales tienen a oxidarse con facilidad en su síntesis (97,98). De esta forma, el EPS puede estar actuando como proveedor de átomos de O, involucrando su estructura y grupos funcionales para la estabilización de las nanopartículas, causando un cambio en la intensidad de las distintas bandas correspondientes (99,100). Estos cambios sugieren que algunos de los azúcares presentes en el EPS están involucrados en la síntesis de las NPs en conjunto con el agente reductor utilizado (101).

Una vez caracterizado el EPS, se realizó la síntesis de NPs de Cu empleando a este como agente estabilizador. El análisis del espectro UV-Vis mostró la presencia de un SPR a los 580 nm. Argueta-Figueroa *et al.* (102) reportan un pico de absorción para NPs de Cu a los 589 nm, obteniendo NPs de tamaño promedio de 3.9 nm. Rajesh *et al.* (103) utilizando PVP como agente estabilizante y  $\text{NaBH}_4$  como reductor para la síntesis de NPs de Cu observaron que, conforme se incrementaba el pH de la reacción, de 6 a 10, las NPs sintetizadas disminuían en tamaño, de 18 a 9 nm, al igual que la longitud de onda de su respectivo SPR, de 590 a 575 nm. Considerando que nuestro SPR fue de 580 nm, a un pH de 9 en la reacción de síntesis, en base a lo anteriormente mencionado se esperaría obtener nanopartículas con un tamaño entre los 3 y 20 nm. Sin embargo, después de secar y resuspender las NPs de Cu obtenidas, se observó que el SPR cambió de 580 nm a 612 nm. Posteriormente, las NPs de Cu

se observaron mediante SEM, notando que las NPs obtenidas en este estudio, presentaron una forma geométrica poligonal, aunque no uniforme, de un tamaño promedio de 145 nm. Estos resultados concuerda con un estudio, realizado por Link & El-Sayed (104), quienes reportaron que al aumentar el tamaño de partícula se observa un cambio en el SPR, encontrando el pico de máxima absorción a una longitud de onda mayor. De esta forma se observó que durante el proceso de secado las NPs obtenidas aumentan en tamaño, por un probable proceso de sinterización, el cual puede ocurrir al elevar la temperatura en una dispersión de nanopartículas (52).

En relación a la estabilidad de las NPs de Cu, es importante mencionar que no fueron estables en solución acuosa (en el medio de cultivo) y que uno de los principales problemas al trabajar con este tipo de nanopartículas de este metal es su gran sensibilidad al oxígeno, causando serios problemas en su estabilidad y resistencia a la oxidación (98). El uso de estabilizantes poliméricos ayuda a mantener estables las nanopartículas de cobre, sin embargo, esto es dependiente de los grupos funcionales que conformen dicho polímero. Kanninen *et al.* (98) observaron que la resistencia a la oxidación por aire aumentaba al utilizar un estabilizante con grupos tiol, o con ácido oleico; aunque también reportan que un exceso de grupos tiol causaba desestabilización de las nanopartículas. En otro estudio realizado por Miao *et al.* (105) se observó que los grupos funcionales del EPS, extraído de un lodo microbiano, pueden acelerar la disolución de las nanopartículas debido a su afinidad por los iones  $\text{Cu}^{2+}$  en un ambiente acuoso. Esto explicaría por qué las nanopartículas sintetizadas en el presente trabajo no se mantuvieron estables en el medio de cultivo utilizado, ya que, como reportó Vázquez-Rodríguez *et al.* (93), el EPS utilizado está compuesto solo por azúcares.

Las siguientes nanopartículas sintetizadas fueron las NPs de Zn estabilizadas con EPS. La determinación del SPR en el momento de la síntesis mostró que la absorbancia para estas NPs, a diferencia de las NPs de Cu, no presentó un pico de absorbancia muy definido para el SPR, sino que se la

absorbancia se presentó en forma de meseta, alrededor de los 330-360 nm. Sin embargo, después del lavado, secado y de resuspenderlas se observó un SPR más definido a los 347nm, lo cual pudo ser causado por productos secundarios originados durante la síntesis y que en conjunto absorbieran a estas longitudes de onda, los cuales fueron descartados del compósito con los lavados realizados a este. Otros autores han observado los picos de absorción para el SPR de nanopartículas de ZnO entre los 334-375 nm (106,107), como lo reportado por Sangeetha *et al.* (108), quienes sintetizaron nanopartículas de ZnO con diferentes concentraciones de *aloe vera* como agente reductor, observando SPR de entre 358 y 375 nm y tamaños de 25 a 40 nm. De acuerdo con estos reportes y al pico de absorbancia observado a 347 nm, se esperaría que las NPs de nuestro compósito posean un tamaño menor a 25 nm.

Para confirmar el tamaño y la distribución de las nanopartículas obtenidas en el EPS se utilizó la técnica TEM. Las micrografías obtenidas mostraron nanopartículas con variedad de tamaños las cuales se encuentran dentro de la red del EPS. Resultados similares fueron observados por Sathiyarayanan *et al.* (71), quienes al sintetizar nanopartículas de Au con EPS extraído de *Bacillus megaterium* y analizarlas mediante TEM observaron aglomerados de NPs de Au distribuidas dentro de este polímero. El patrón de difracción de electrones muestra algunos anillos difusos, provocados por la matriz polimérica, así como anillos punteados característicos de materiales policristalinos (109). Estos anillos corresponden a los planos [1,0,0], [0,0,2], [1,0,1], [1,1,0], [1,0,3], [2,0,0], [1,1,2], [2,0,1], [2,1,0], [3,0,0] y [2,1,3] de ZnO con geometría hexagonal (JCPDS No. 36-1451) (110), similar a lo reportado por Talam *et al.* (106) y Aneesh *et al.* (111) para la caracterización de las nanopartículas de ZnO que sintetizaron. El análisis por EDS demostró la presencia de Zn, C y O, confirmando la síntesis de las nanopartículas de Zn (en forma de ZnO) dentro de la matriz polimérica del EPS.

Para las nanopartículas de Ni se utilizaron las mismas técnicas de caracterización utilizadas para las NPs de Zn. Se midió el espectro UV-Vis para

corroborar la presencia de su SPR, el cual se presentó en 348 nm, la presencia del plasmón para nanopartículas de Ni ha sido reportado entre los 320-360 nm (112–114). Además de este pico de absorbancia, antes de los lavados se observó un pico de absorbancia a los 400 nm, el cual corresponde la absorbancia característica de los iones de Ni(II) (110). Este pico desapareció después de lavar y secar el compuesto, lo cual evidencia la ausencia de los iones de Ni(II) libres. Las micrografías obtenidas por TEM mostraron que las nanopartículas de Ni sintetizadas se distribuyen tanto dentro como en la periferia del EPS. A través del patrón de difracción se observaron anillos difusos y de puntos, los cuales se adjudican al plano [1,0,1] de NiO con geometría romboédrica (JCPDS No. 44-1159), estos resultados concuerdan con lo reportado por Kalyani & Kalaiselvi(91) y Hotovy *et al.* (115) sobre la caracterización de materiales de NiO. Finalmente, el análisis por EDS mostró la presencia de Ni, O y C, lo que confirma que las nanopartículas de Ni (en forma de NiO) se sintetizaron en la matriz polimérica del EPS.

Las nanopartículas han sido reconocidas como materiales con propiedades prometedoras en el campo de la medicina. Diferentes nanopartículas metálicas, como TiO<sub>2</sub>, Ag, ZnO, CuO, MgO, etc., han sido reportadas como agentes antimicrobianos (116). Los exopolisacáridos también han sido objeto de estudio por esta clase de actividad, aunque sus efectos antimicrobianos pueden modificarse debido a las variaciones existentes en su producción. Onbasli *et al.* (117) reportó la variación de la actividad antimicrobiana de un EPS extraído de *P. aeruginosa* cultivada bajo diferentes concentraciones de nutrientes, observando diferencias en su actividad entre *E. coli* (gramnegativa) y *B. subtilis* (grampositiva), así como condiciones de síntesis donde no hubo actividad antimicrobiana. En el presente trabajo se probó la actividad antimicrobiana de los compósitos sintetizados, así como del EPS sin reaccionar. Este último, a pesar de que está reportado que es capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus* ATCC 6538 (93), no presentó actividad antimicrobiana contra ninguno de los aislados clínicos resistentes utilizados en este trabajo. Esto se

puede deber a la naturaleza del EPS o a las condiciones de su síntesis, como se mencionó anteriormente.

El tratamiento de cepas grampositivas y gramnegativas con los compósitos mostraron diferencias en el crecimiento bacteriano y la formación de biofilm. El efecto antibacteriano de las nanopartículas de ZnO sobre la cepa grampositiva, *SaR*, fue independiente de la concentración, mientras que para la cepa gramnegativa *PaR*, el crecimiento bacteriano no fue inhibido en ninguna de las concentraciones utilizadas. Diversos autores han reportado diferencias en el efecto antibacteriano del ZnO, mostrando que las cepas grampositivas son más sensibles que las gramnegativas (118–120). Por otro lado, se ha observado que el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de ZnO aumenta cuando el tamaño de partícula disminuye. Hosseinkhani *et al.* (121) observaron que al disminuir el tamaño de partícula utilizado también disminuía la población bacteriana de *Shigella dysenteriae*. De manera similar, Emami-Karvani *et al.* (122) observaron que la actividad antimicrobiana de nanopartículas de ZnO era mayor cuando el tamaño de partícula utilizado era pequeño, mientras que el polvo a granel de ZnO no presentaba efecto alguno. Sin embargo, en el presente trabajo se observó que al incrementar la concentración del compósito, aumentó el crecimiento de *P. aeruginosa* demostrando que no hubo actividad antibacteriana. Este efecto puede estar asociado con la distribución de las nanopartículas dentro de la matriz del exopolisacárido, ya que, a diferencia de las NPs de NiO, al encontrarse muy próximas entre sí dentro de la matriz del EPS pueden formar aglomerados al momento de incrementar su concentración, lo cual impediría su interacción con las bacterias y con esto su efecto antimicrobiano. Este efecto también puede explicar que *S. aureus* no sea inhibido al incrementar la concentración del compósito de ZnO. Asimismo, a pesar de que se ha reportado actividad antibiofilm de nanopartículas de ZnO contra *P. aeruginosa* (123) y *S. aureus* (124), en el presente trabajo no se observó actividad antibacteriana incluso utilizando concentraciones en las que se observó inhibición del crecimiento. De manera similar a los resultados de inhibición, la razón de no haber observado

efecto puede estar relacionado con el acomodo que poseen las nanopartículas en el compósito, comportamiento observado también por Akhil *et al.* (125), evaluaron la actividad antibiofilm de nanopartículas de ZnO sintetizadas con diferentes polímeros utilizados como estabilizadores. Sus resultados mostraron que a concentraciones donde los compósitos presentaban buena actividad antimicrobiana la actividad antibiofilm no resultó tan efectiva, e incluso dependiendo del polímero estabilizador utilizado, esta actividad era menor que la presentada por nanopartículas de ZnO sin polímero.

A diferencia de lo observado con ZnO, el tratamiento de cepas resistentes con el compósito que contiene nanopartículas de NiO mostró inhibición del crecimiento bacteriano de tipo concentración-respuesta. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Argueta-Figueroa *et al.* (102) quienes evaluaron el efecto antimicrobiano de nanopartículas de Cu, Ni y bimetálica Cu-Ni en cepas de *E. coli*, *S. aureus* y *Streptococcus mutans* y mostraron que el efecto antimicrobiano de las diferentes nanopartículas fue muy similar entre las cepas grampositivas y gramnegativas. Además, observaron el mismo comportamiento al determinar la actividad antibiofilm del compósito, donde el porcentaje de biofilm formado disminuyó al aumentar la concentración de este. Resultados similares fueron reportados por Saleem *et al.* (126) cuando probaron la actividad antimicrobiana y antibiofilm de nanopartículas de NiO sintetizadas utilizando extractos de *Eucalyptus globulus*. Ellos observaron inhibición del crecimiento en cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* resistentes a antibióticos y una sepa de *S. aureus* sensible a meticilina, donde la densidad óptica de los cultivos disminuyó al incrementar la concentración de las nanopartículas. Así mismo, observaron este comportamiento en la inhibición del biofilm formado por las cuatro cepas, donde no se presenta una amplia diferencia en su actividad antibiofilm en las diferentes cepas, similar a lo encontrado en nuestros experimentos, donde se observó inhibición del biofilm formado por las cepas clínicas a concentraciones donde el compósito es capaz de inhibir su crecimiento.

Junto con la tendencia en el desarrollo y comercialización de nanomateriales se requiere darle una gran importancia a la seguridad de estos y de sus métodos de síntesis, en cuestión de la salud pública y del medio ambiente. De esta manera, el objetivo de las síntesis mediante metodologías verdes tiene como finalidad incrementar la biocompatibilidad de estos materiales, ya que muchos de los metales de transición utilizados llegan a causar efectos adversos en organismos vivos. Para cada organismo, el correcto funcionamiento de sus órganos es de vital importancia para permanecer en un estado de salud balanceado. Esto es logrado en mayor parte por el hígado y el riñón. De este último, las nefronas constituyen la unidad estructural y funcional básica, ya que llevan a cabo distintas funciones para mantener la homeostasis del cuerpo. En el presente trabajo se evaluó la toxicidad *in vivo* de los distintos compósitos mediante la determinación de parámetros de función renal. Se observó que la administración vía oral de una dosis diaria durante 3 días, a una concentración del doble de la encontrada como inhibitoria, no produjo diferencias significativas en los parámetros de función renal utilizados como marcadores de toxicidad en el presente estudio. Se ha reportado que la toxicidad de las nanopartículas, así como su efecto antimicrobiano, puede variar dependiendo los métodos de síntesis, el tamaño de partícula, la distribución de las partículas. Por lo tanto, se tienen diferentes efectos para nanopartículas del mismo metal sintetizadas por metodologías diferentes. La dosis de cada compósito utilizada en este trabajo, equivalente a 24 mg/kg de peso, la cual se encuentra por debajo de las diferentes dosis letales 50 (LD<sub>50</sub>) reportadas en la literatura. Zemlyanova *et al.* (127) reportaron una LD<sub>50</sub> en ratas de 5000 mg/kg de peso para NiO nanodisperso. Kovriznych *et al.* (128) reportan una LC<sub>50</sub> (concentración letal 50) de nanopartículas de NiO de 100 mg/kg de peso utilizando el pez zebra como organismo modelo. Para nanopartículas de ZnO Patra *et al.* (129) reportan un nivel donde no se observan efectos adversos (NOAEL) de 1000 mg/kg en ratones. De manera similar, Seok *et al.* (130) reportaron un NOAEL de 268.4 mg/kg de peso al día para ratas. Mientras que para exopolisacáridos, Ramírez *et al.* (131) reportó un NOEAL utilizando 400 mg/kg de peso de un EPS extraído de

una cepa de *Rhodotorula minuta*. Por lo tanto, nuestros resultados muestran que los compósitos sintetizados en este trabajo no poseen efectos adversos renales en los animales de estudio utilizados.

La resistencia a antibióticos es un problema que se desarrolló a partir del uso de fármacos en el tratamiento de enfermedades infecciosas, cuyo impacto se ha incrementado en los últimos años y se considera como uno de los más grandes inconvenientes para su tratamiento (132). Una de las estrategias adoptadas para combatir esta problemática es utilizar compuestos adyuvantes con el propósito de retrasar/combater la resistencia a antibióticos al atacar a la célula microbiana por diferentes medios, además de obtener combinaciones que presenten un efecto sinérgico entre sus componentes (133). Con el fin de obtener este efecto se realizaron combinaciones del compósito con NiONPs sintetizado con cuatro diferentes antibióticos en concentraciones menores a su MIC. La mayoría de las combinaciones del compósito con ampicilina y cloranfenicol mostraron efectos antimicrobianos sinérgicos en la cepa *SaR*. En contraste, la combinación con kanamicina mostró pocas interacciones sinérgicas; mientras que al utilizarse ciprofloxacino se encontró un efecto antagónico en la mayoría de las combinaciones. Por otro lado, al realizar las mismas combinaciones del compósito con antibióticos en la cepa *PaR*, se observaron comportamientos diferentes. El compósito por sí mismo presentó un efecto antimicrobiano en la cepa gramnegativa, mientras que su combinación con los diferentes antibióticos no se observó un gran número de combinaciones sinérgicas como en los ensayos con la cepa grampositiva. Al utilizarse con ampicilina la mitad de las combinaciones presentaron efecto sinérgico, mientras que, al utilizarse con kanamicina, la mayoría de las combinaciones presentaron un efecto antagónico. Al utilizarse con cloranfenicol la mayor parte de las combinaciones presentó sinergia; sin embargo, las combinaciones realizadas con ciprofloxacino, contrario a lo observado en las pruebas en *SaR*, la mayoría presentaron efecto sinérgico en la cepa gramnegativa. Se ha reportado previamente el efecto sinérgico de estos metales de transición (en forma iónica) combinados con el antibiótico  $\beta$ -



lactámico ampicilina, así como el aminoglucósido kanamicina, en la inhibición del crecimiento de cepas grampositivas y gramnegativas tanto sensibles como resistentes a los mismos (82). De manera similar, se ha reportado que el uso de nanopartículas en combinación con diferentes antibióticos incrementa el efecto antimicrobiano de estos últimos. Jyoti *et al.* (134) utilizaron nanopartículas de Ag para incrementar el efecto antimicrobiano de distintos antibióticos  $\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos en una variedad de cepas grampositivas y gramnegativas, demostrando un incremento en la actividad antimicrobiana, en la mayoría de las combinaciones, mientras que solo en algunas no se observó efecto alguno. Khurana *et al.* (135) utilizaron combinaciones de nanopartículas de Ag o Cu con tetraciclina o kanamicina, contra *B. subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* observando que la combinación puede, ya sea, incrementar o disminuir la actividad antimicrobiana de los antibióticos al utilizarse en combinación con las NPs. Los diferentes comportamientos de las combinaciones del compuesto con los antibióticos en las diferentes cepas pueden deberse a las diferencias entre las mismas, como es el caso de la sensibilidad a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos entre las cepas grampositivas y gramnegativas, tal como se observó en la sensibilidad de las cepas ATCC reportadas (véase tabla 4), así como en el trabajo reportado por Garza-Cervantes (82), siendo en este trabajo la bacteria grampositiva 256 veces más sensible que la gramnegativa. Además de la interacción antibiótico-compósito, como podría ser el caso de las combinaciones con ciprofloxacino, el cual se ha reportado que es capaz de formar complejos con distintos metales de transición, tanto en forma iónica (136–138) como en nanopartículas (139), que pueden incrementar o disminuir su actividad antimicrobiana. Esto sumado a la distinta sensibilidad de las cepas de estudio al compuesto sería la diferencia entre la actividad antimicrobiana observada, ya que la cepa gramnegativa fue más sensible al compuesto de nanopartículas de NiO, necesitando una menor concentración para su inhibición, reduciendo así la posibilidad de formación de un complejo entre los componentes, además de la ya mencionada diferencia entre la pared celular de las bacterias utilizadas. Por otra parte, la producción de biofilm no se vio afectada por las combinaciones

utilizadas, en los ensayos realizados con ambas cepas resistentes la producción se mantuvo e incluso se aumentó en varias de las combinaciones, como fue el caso de las combinaciones con kanamicina. Esto puede deberse al tipo de exposición que las cepas tuvieron con los compósitos y el antibiótico, ya que en los ensayos de inhibición el método de prueba requiere agitación continua, mientras que en la producción de biofilm el método requiere que el cultivo se mantenga estático, lo que podría causar precipitación de los compósitos. Además se ha observado que diversos antibióticos al ser utilizados a concentraciones sub-inhedorias causan un aumento en la producción de biofilm en diferentes cepas de los géneros *Staphylococcus* y *Pseudomonas* (140–142), esto sumando con la posible precipitación de los compósitos podría causar el efecto observado de antagonismo observado en los ensayos combinatorios para la inhibición de producción de biofilm.

En cuanto el posible efecto por el cual los compósitos causan la inhibición del crecimiento y de la producción de biofilm, se realizó un ensayo para medir la cantidad de compuestos intracelulares solubles en el medio de cultivo, al ser una medida de la integridad de la membrana celular de la bacteria expuesta a agentes antimicrobianos. Se ha reportado que el uso de polisacáridos (143) y polisacáridos modificados (144) en cultivos bacterianos causa liberación de productos intracelulares, como proteínas solubles. Además, las nanopartículas cargadas positivamente tienen mayor interacción electrostática con la membrana celular cargada negativamente (145), aunque se han reportado que partículas cargadas negativamente se pueden también adsorber en sistemas con carga negativa como la membrana celular, por diferentes mecanismos como endocitosis no-específica o mediada por proteínas (146). En este trabajo observamos la liberación de azúcares reductores solubles de la bacteria, aumentando su concentración en el medio de cultivo al exponer las cepas a los compósitos sintetizados. Como se indica con el análisis de potencial zeta el EPS posee una carga neta negativa, algo comúnmente observado para los EPS microbianos (147,148), con un valor de -76.1 mV. Un cambio en el potencial zeta de los compósitos nos indicaría la carga neta de las nanopartículas sintetizadas.

Al observar el potencial zeta de los compósitos, se observó que la carga neta para ambos se mantiene negativa, pero para el compósito de NiONPs se observó un cambio de -76.1 a -8.6 mV, sugiriendo que estas nanopartículas poseen carga positiva. Esto podría explicar la razón por la cual este compósito causa una mayor liberación de azúcares reductores al medio de cultivo, así como un mayor efecto inhibitorio. Por todo esto, se considera que la membrana celular podría ser uno de los objetivos antimicrobianos de los compósitos sintetizados.

Con base a lo observado en el presente trabajo de tesis, se observa que estos compósitos poseen potencial para su uso como agentes antimicrobianos contra infecciones causadas por microorganismos resistentes a antibióticos. Sin embargo, poco se sabe sobre su efectividad contra una infección establecida en un organismo vivo. Por lo tanto, estudios sobre su actividad antimicrobiana en distintos modelos de infección *in vivo* podrían abrir camino en el correcto uso de los compósitos antimicrobianos como los obtenidos en el presente trabajo.

## CAPÍTULO 7

### CONCLUSIONES

- Se extrajo un exopolisacárido a partir del sobrenadante de un cultivo de la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L con las modificaciones, planteadas en el presente trabajo, al método reportado.
- Se sintetizaron nanopartículas que contienen los metales Cu, Ni y Zn utilizando el exopolisacárido de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L como agente estabilizador y ácido ascórbico como agente reductor.
- Se identificó que las nanopartículas de Cu sintetizadas en el exopolisacárido de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L fueron inestables en soluciones acuosas y soluciones amortiguadas a un pH de 7. Además, que el metal se encontró completamente en estado reducido.
- Por otro lado, se identificó que las nanopartículas de NiO y ZnO sintetizadas en el exopolisacárido de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L solo fueron estables en soluciones amortiguadas a pH de 7.
- El compósito NiO-EPS posee la capacidad de inhibir el crecimiento y la producción de biofilm de las cepas clínicas *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* a concentraciones de 3 y 2 mg/mL, respectivamente.

- El compósito ZnO-EPS posee la capacidad de inhibir el crecimiento de la cepa clínica *Staphylococcus aureus* a partir de 1 mg/mL, pero no posee la capacidad de inhibir el crecimiento de la cepa clínica *Pseudomonas aeruginosa*, ni la producción de biofilm de ambas cepas a las concentraciones utilizadas.
- Los compósitos NiO-EPS y ZnO-EPS no presentaron toxicidad *in vivo* al administrarse vía oral en ratas Wistar de acuerdo con los parámetros de daño renal evaluados en el presente trabajo.
- El compósito NiO-EPS posee la capacidad de potenciar de manera significativa y sinérgica el efecto inhibitorio de los antibióticos ampicilina, kanamicina y cloranfenicol contra la cepa clínica *Staphylococcus aureus*.

El compósito NiO-EPS posee la capacidad de potenciar de manera significativa y sinérgica el efecto inhibitorio de los antibióticos kanamicina, cloranfenicol y ciprofloxacino para inhibir el crecimiento de la cepa clínica *Pseudomonas aeruginosa*.

- El compósito NiO-EPS no posee la capacidad de inhibir la formación de biofilm de ninguna de las cepas clínicas al utilizarse en combinación con los antibióticos ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o ciprofloxacino a concentraciones sub-inhedorias.
- El incremento la concentración de azúcares reductores en el medio de cultivo sugiere que la membrana celular está involucrada en el efecto antimicrobiano de los compósitos sintetizados.

## CAPÍTULO 8

### ANEXOS



Aguascalientes. Ags., a 17 de julio de 2019

**DR. JOSÉ RUBÉN MORONES RAMÍREZ**  
**PROFESOR INVESTIGADOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

#### **ASUNTO: ACEPTACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Por medio del presente, me permito informarle que el trabajo titulado: "**Evaluación de toxicidad oral de bio-compósitos de nanopartículas NiO y ZnO estabilizadas con Exopolisacárido de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L**" que forma parte del proyecto de doctorado titulado "Uso de exopolisacárido de *Rhodotorula Mucilaginosa* UANL-001L como agente estabilizador en la síntesis de nanopartículas metálicas para la obtención de compuestos híbridos con actividad antimicrobiana y antibiofilm" a su cargo, ha sido revisado y autorizado por el Comité de Ética de nuestra institución.

Sin más que agregar por el momento, le envío un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**



**Dr. Bruno Antonio Marichal Cancino**  
**RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE NEUROFARMACOLOGÍA**  
**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA**  
**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**

Dr. Teódulo Quezada Tristán

Presidente de la Comisión para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio

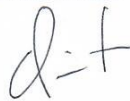
Presente.

Por este conducto me permito informarle que se revisó el proyecto titulado "**Uso de exopolisacárido de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L como agente estabilizador en la síntesis de nanopartículas metálicas para la obtención de compuestos híbridos con actividad antimicrobiana y antibiofilm**", del alumno **Javier Alberto Garza Cervantes** y cuyo responsable tutor de movilidad CONACYT, es el **Dr. Bruno Antonio Marichal Cancino** jefe del Departamento de Fisiología y Farmacología del Centro de Ciencias Básicas de nuestra Universidad. Una vez evaluada su metodología en cuanto al cuidado y uso de animales de laboratorio, particularmente ratas Wistar macho (anexo la metodología), se llegó a la conclusión de que sí cumple con los lineamientos establecidos en los reglamentos correspondientes.

Sin otro particular por el momento reciba un cordial saludo, en Aguascalientes Ags, a 1 de Julio de 2019.

Atentamente

"Se Lumen Proferre"



Dr. José Luis Quintanar Stephano

Miembro del Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio

Centro de Ciencias Básicas

## CAPÍTULO 9

### BIBLIOGRAFÍA

1. Wittmann C, Liao J. Industrial biotechnology. Volume 1, Microorganisms. 2016. 792 p.
2. Béguin P. An introduction to polysaccharide biotechnology [Internet]. Vol. 80, Biochimie. 1998 [cited 2017 Oct 16]. p. 347. Available from: <https://www.crcpress.com/An-Introduction-to-Polysaccharide-Biotechnology-Second-Edition/Harding-Tombs-Adams-Paulsen-Inngjerdigen-Barsett/p/book/9781482246971>
3. Sathiyarayanan G, Dineshkumar K, Yang Y-H. Microbial exopolysaccharide-mediated synthesis and stabilization of metal nanoparticles. Crit Rev Microbiol [Internet]. 2017;1–22. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1040841X.2017.1306689>
4. Bernal P, Llamas MA. Promising biotechnological applications of antibiofilm exopolysaccharides. Microb Biotechnol [Internet]. 2012 Nov [cited 2017 Sep 18];5(6):670–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22905927>
5. Moscovici M. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. Front Microbiol. 2015;6(SEP):1012.
6. Sutherland IW. Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides. In: Cambridge Studies in Biotechnology 9 [Internet]. Cambridge Studies in Biotechnology 9. 1990. 1–163 p. Available from: <http://books.google.com/books?hl=de&lr=&id=WV1ngzp7e0UC&pgis=1>
7. Poli A, Anzelmo G, Nicolaus B. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: Production, characterization and biological activities. Vol. 8, Marine Drugs. 2010. p. 1779–802.



8. Grigorova D, Pavlova K, Panchev I. Preparation and preliminary characterization of exopolysaccharides by yeast *Rhodotorula acheniorum* MC. *Appl Biochem Biotechnol* [Internet]. 1999;81(3):181–91. Available from:  
<http://link.springer.com/article/10.1385%2FABAB%3A81%3A3%3A181>
9. Pavlova K, Koleva L, Kratchanova M, Panchev I. Production and Characterization of an Exopolysaccharide by Yeast. *World J Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2004 Jun [cited 2017 Sep 13];20(4):435–40. Available from:  
<http://link.springer.com/10.1023/B:WIBI.0000033068.45655.2a>
10. Rendueles O, Kaplan JB, Ghigo J-M. Antibiofilm polysaccharides. *Environ Microbiol* [Internet]. 2013 Feb 1 [cited 2017 Sep 18];15(2):334–46. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-2920.2012.02810.x>
11. Gandra S, Barter DM, Laxminarayan R. Economic burden of antibiotic resistance: How much do we really know? *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(10):973–9.
12. Wohlleben W, Mast Y, Stegmann E, Ziemert N. Antibiotic drug discovery. *Microb Biotechnol*. 2016;9(5):541–8.
13. Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*. 2000;406(6797):775–81.
14. KONG K, Schneper L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *Apmis*. 2010;118(1):1–36.
15. Autiero I, Costantini S, Colonna G. Modeling of the bacterial mechanism of methicillin-resistance by a systems biology approach. *PLoS One*. 2009;4(7):e6226.
16. Maruthi Chittapragada SR, Ham YW. Aminoglycosides: molecular insights on the recognition of RNA and aminoglycoside mimics. *Perspect Medicin Chem*. 2009;3:21.

17. Mingeot-Leclercq M-P, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(4):727–37.
18. Scientific T. Analysis of the aminoglycoside antibiotics kanamycin and amikacin matches USP requirements [Internet]. 2011. Available from: <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/109787-AN267-IC-KanamycinAmikacin-HPAEPAD-18Jan2011-LPN2663-R2.pdf>
19. Sarkozy G. Quinolones: a class of antimicrobial agents. *Vet Med.* 2001;46(9/10):257–74.
20. Clark DP, Dunlap P, Madigan M, Martinko J. *Brock Biology of Microorganisms.* Scientific Publisher, Beijing; 2009.
21. Salud OM de la. OMS | Resistencia a los antibióticos [Internet]. [www.who.int](http://www.who.int). World Health Organization; 2015 [cited 2016 Sep 9]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/es/>
22. Bell BG, Schellevis F, Stobberingh E, Goossens H, Pringle M. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2014;14(1):13. Available from: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-14-13>
23. Walsh C, Wright G. Introduction: antibiotic resistance. *Chem Rev.* 2005;105(2):391–4.
24. Yenofsky RL, Fine M, Pellow JW. A mutant neomycin phosphotransferase II gene reduces the resistance of transformants to antibiotic selection pressure. *Proc Natl Acad Sci.* 1990;87(9):3435–9.
25. Tan Y-T, Tillett DJ, McKay IA. Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria. *Mol Med Today.* 2000;6(8):309–14.
26. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes,

- challenges and responses. *Nat Med*. 2004;10:S122–9.
27. Spellberg B, Powers JH, Brass EP, Miller LG, Edwards JE. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2004;38(9):1279–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15127341>
  28. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013;11(3):297–308.
  29. Amabile-Cuevas C. Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *J Infect Dev Ctries* [Internet]. 2010;4(3):126–31. Available from: <http://www.jidc.org/index.php/journal/article/download/20351451/358>
  30. Kim T, Oh PI, Simor AE. The economic impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian hospitals. *Infect Control*. 2001;22(02):99–104.
  31. CDC Office of Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013 [Internet]. *CDC Threat Report*. 2013 [cited 2016 Sep 30]. Available from: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
  32. Khan ST, Musarrat J, Al-Khedhairi AA. Countering drug resistance, infectious diseases, and sepsis using metal and metal oxides nanoparticles: Current status. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2016;146:70–83.
  33. Stulberg DL, Penrod MA, Blatny RA. Common bacterial skin infections. *Am Fam Physician*. 2002;66(1):119–28.
  34. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Vol. 15, *Clinical Microbiology Reviews*. 2002. p. 167–93.
  35. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. Vol.

- 11, Cellular Microbiology. 2009. p. 1034–43.
36. Fux CA, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Costerton JW. Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2003;1(4):667–83. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15482163](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15482163)
37. Jefferson KK, Goldmann DA, Pier GB. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(6):2467–73.
38. Gillis RJ, White KG, Choi K-H, Wagner VE, Schweizer HP, Iglewski BH. Molecular basis of azithromycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2005;49(9):3858–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16127063>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1195439>
39. Stewart PS, William Costerton J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001;358(9276):135–8.
40. Holban AM, Gestal MC, Grumezescu AM. Control of biofilm-associated infections by signaling molecules and nanoparticles. *Int J Pharm*. 2016;510(2):409–18.
41. Heatley NG. A method for the assay of penicillin. *Biochem J* [Internet]. 1944 Jan 1 [cited 2017 Oct 23];38(1):61–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16747749>
42. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 2016;6(2):71–9.
43. Marks LR, Clementi EA, Hakansson AP. Sensitization of *Staphylococcus aureus* to methicillin and other antibiotics in vitro and in vivo in the presence of HAMLET. 2013;

44. Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis LL. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. Vol. 25, *Clinical Microbiology Reviews*. 2012. p. 450–70.
45. Hyle EP, Lipworth AD, Zaoutis TE, Nachamkin I, Bilker WB, Lautenbach E. Impact of inadequate initial antimicrobial therapy on mortality in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: variability by site of infection. *Arch Intern Med*. 2005;165(12):1375–80.
46. Anderson ET, Young LS, Hewitt WL. Antimicrobial synergism in the therapy of gram-negative rod bacteremia. *Chemotherapy*. 1978;24(1):45–54.
47. Pillai SK, Moellering RC, Eliopoulos GM. Antimicrobial combinations. *Antibiot Lab Med*. 2005;5:365–440.
48. Hegreness M, Shores N, Damian D, Hartl D, Kishony R. Accelerated evolution of resistance in multidrug environments. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(37):13977–81.
49. Silpa S. Nanotechnology-Present Revolutionary Biotechnology. *Int J Pharma Res Heal Sci* [Internet]. 2016 [cited 2017 Sep 12];4(4):1261–7. Available from: <http://www.pharmahealthsciences.net/pdfs/volume4-issue42016/2.vol4-issue4-2016-MS-15310-review2.pdf>
50. Kanmani P, Lim ST. Synthesis and structural characterization of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its antimicrobial activity against food and multidrug resistant pathogens. *Process Biochem*. 2013;48(7):1099–106.
51. Mohanraj V, Chen Y, Chen M&. Nanoparticles – A Review. *Trop J Pharm Res* [Internet]. 2006;5(June):561–73. Available from: <http://www.tjpr.freehosting.net>

52. Cao G, Wang Y. Nanostructures and Nanomaterials [Internet]. WORLD SCIENTIFIC; 2011 [cited 2017 Oct 27]. Available from: <http://www.worldscientific.com/worldscibooks/10.1142/7885>
53. Mody V V, Siwale R, Singh A, Mody HR. Introduction to metallic nanoparticles. *J Pharm bioallied Sci.* 2010 Oct;2(4):282–9.
54. Hajipour MJ, Fromm KM, Akbar Ashkarran A, Jimenez de Aberasturi D, Larramendi IR de, Rojo T, et al. Antibacterial properties of nanoparticles. Vol. 30, *Trends in Biotechnology.* 2012. p. 499–511.
55. Makarov V V, Love AJ, Sinitsyna O V, Makarova SS, Yaminsky I V, Taliansky ME, et al. “Green” nanotechnologies: Synthesis of metal nanoparticles using plants. *Acta Naturae.* 2014 Jan;6(20):35–44.
56. Raveendran P, Fu J, Wallen SL. Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2003;125(46):13940–1.
57. Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. Vol. 6, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* 2010. p. 257–62.
58. Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim S-K. Actinobacteria mediated synthesis of nanoparticles and their biological properties: A review. *Crit Rev Microbiol* [Internet]. 2016;42(2):209–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2014.917069>
59. Emam HE, Ahmed HB. Polysaccharides templates for assembly of nanosilver. *Carbohydr Polym.* 2016;135:300–7.
60. Shah U, Gani A, Ashwar BA, Shah A, Ahmad M, Gani A, et al. A review of the recent advances in starch as active and nanocomposite packaging films. *Cogent Food Agric* [Internet]. 2015;1(1). Available from: <https://www.cogentoa.com/article/10.1080/23311932.2015.1115640>
61. Sosa IO, Noguez C, Barrera RG. Optical Properties of Metal

Nanoparticles with Arbitrary Shapes. *J Phys Chem B* [Internet]. 2003;107(26):6269–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jp0274076>

62. Allahverdiyev AM, Kon KV, Abamor ES, Bagirova M, Rafailovich M. Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011 Nov;9(11):1035–52.
63. Grass G, Rensing C, Solioz M. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(5):1541–7.
64. Gericke M, Pinches A. Biological synthesis of metal nanoparticles. *Hydrometallurgy*. 2006;83(1–4):132–40.
65. Kuppusamy P, Yusoff MM, Maniam GP, Govindan N. Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications - An updated report. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2014;473–84.
66. Park Y, Hong YN, Weyers A, Kim YS, Linhardt RJ. Polysaccharides and phytochemicals: a natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles. *IET Nanobiotechnology*. 2011 Sep;5(3):69.
67. Chen CW, Chen MQ, Serizawa T, Akashi M. In-situ formation of silver nanoparticles on poly(N-isopropylacrylamide)-coated polystyrene microspheres. *Adv Mater*. 1998 Oct;10(14):1122–+.
68. Musa A, Ahmad MB, Hussein MZ, Mohd Izham S, Shameli K, Abubakar Sani H. Synthesis of Nanocrystalline Cellulose Stabilized Copper Nanoparticles. *J Nanomater*. 2016;2016:1–7.
69. Valle J, Da Re S, Henry N, Fontaine T, Balestrino D, Latour-Lambert P, et al. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Pnas* [Internet]. 2006;103(33):12558–63. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/103/33/12558>

70. Golberg K, Emuna N, Vinod TP, van Moppes D, Marks RS, Arad SM, et al. Novel Anti-Adhesive Biomaterial Patches: Preventing Biofilm with Metal Complex Films (MCF) Derived from a Microalgal Polysaccharide. *Advanced Materials Interfaces*. 2016 May;1500486.
71. Ganesan Sathiyarayanan, Venkatasamy Vignesh, Ganesan Saibaba, Annadurai Vinothkanna, Krishnamoorthy Dineshkumar MBV and JS. Synthesis of carbohydrate polymer encrusted gold nanoparticles using bacterial exopolysaccharide : a novel and greener approach †. *RSC Adv*. 2014;4:22817–27.
72. Bae A-H, Numata M, Yamada S, Shinkai S. New approach to preparing one-dimensional Au nanowires utilizing a helical structure constructed by schizophyllan. *New J Chem* [Internet]. 2007 May 10 [cited 2017 Oct 6];31(5):618. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b615757b>
73. Abdel-Mohsen AM, Abdel-Rahman RM, Fouda MMG, Vojtova L, Uhrova L, Hassan AF, et al. Preparation, characterization and cytotoxicity of schizophyllan/silver nanoparticle composite. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2014 Feb 15 [cited 2017 Oct 6];102:238–45. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861713011806>
74. Chen X, Yan J-K, Wu J-Y. Characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles prepared with a fungal exopolysaccharide in water. *Food Hydrocoll*. 2015;53:69–74.
75. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005;16(10):2346.
76. Rai R, Bai J. Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. [cited 2017 Oct 26]; Available from: <http://www.formatex.info/microbiology3/book/197-209.pdf>
77. Shahverdi AR, Fakhimi A, Shahverdi HR, Minaian S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics



against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2007 Jun 1 [cited 2017 Oct 26];3(2):168–71. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963407000469>

78. Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Yadav R, Kalaichelvan PT, Venketesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine*. 2010;6(1):103–9.
79. Garza MTG, Perez DB, Rodriguez AV, Garcia-Gutierrez DI, Zarate X, Cardenas MEC, 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):e0148430.
80. Vazquez-Rodriguez JA. Estudio de las propiedades antimicrobianas de exopolisacáridos producidos por *Rhodotorula mucilaginosa*. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León; 2016.
81. Garza-Cervantes JA, Chávez-Reyes A, Castillo EC, García-Rivas G, Ortega-Rivera OA, Salinas E, et al. Synergistic antimicrobial effects of silver/transition-metal combinatorial treatments. *Sci Rep*. 2017;7(1).
82. Garza-Cervantes JA. Uso de metales de transición en ensayos combinatorios metal-antibiótico para la re-sensibilización de bacterias resistentes. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2016.
83. O'Toole GA. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *J Vis Exp* [Internet]. 2011;(47). Available from: <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=2437>
84. Trinder P. Determination of Glucose in Blood using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor. *Ann Clin Biochem*. 1966;6(24).
85. GORNALL AG, BARDAWILL CJ, DAVID MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem*. 1949;177(2):751–66.

86. Rartels H, Böhmer M. Eine mikromethode 7air kreatininbestimmung. *Clin Chim Acta*. 1971;32(1):81–5.
87. Fabiny DL, Ertingshausen G. Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the CentrifChem. *Clin Chem*. 1971;17(8):696–700.
88. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2001;48(suppl 1):5–16. Available from: [http://jac.oxfordjournals.org/content/48/suppl\\_1/5.full.pdf](http://jac.oxfordjournals.org/content/48/suppl_1/5.full.pdf)
89. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*. 1959;
90. Chauhan J. Synthesis and Characterization of Ni and Cu Doped ZnO. *J Nanomed Nanotechnol* [Internet]. 2017 [cited 2018 May 3];8(2):2157–7439. Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/synthesis-and-characterization-of-ni-and-cu-doped-zno-2157-7439-1000429.pdf>
91. Kalyani P, Kalaiselvi N. Various aspects of LiNiO<sub>2</sub> chemistry: A review. Vol. 6, *Science and Technology of Advanced Materials*. 2005. p. 689–703.
92. Garza MTG, Perez DB, Rodriguez AV, Garcia-Gutierrez DI, Zarate X, Cardenas MEC, 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).
93. Vazquez-Rodriguez A, Vasto-Anzaldo XG, Barboza Perez D, Vázquez-Garza E, Chapoy-Villanueva H, García-Rivas G, et al. Microbial Competition of Rhodotorula mucilaginosa UANL-001L and E. Coli increase biosynthesis of Non-Toxic Exopolysaccharide with Applications as a Wide-Spectrum Antimicrobial. *Sci Rep* [Internet]. 2018 Dec 15 [cited 2018 Mar 1];8(1):798. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-17908-8>
94. Shuhong Y, Meiping Z, Hong Y, Han W, Shan X, Yan L, et al. Biosorption

- of Cu<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> and Cr<sup>6+</sup> by a novel exopolysaccharide from *Arthrobacter ps-5*. *Carbohydr Polym.* 2014;
95. Vignesh V, Sathiyarayanan G, Sathishkumar G, Parthiban K, Sathishkumar K, Thirumurugan R. Formulation of iron oxide nanoparticles using exopolysaccharide: Evaluation of their antibacterial and anticancer activities. *RSC Adv.* 2015;
  96. Si S, Kotal A, Mandal TK, Giri S, Nakamura H, Kohara T. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles in the presence of polyelectrolytes. *Chem Mater.* 2004;
  97. Davar F, Fereshteh Z, Salavati-Niasari M. Nanoparticles Ni and NiO: Synthesis, characterization and magnetic properties. *J Alloys Compd.* 2009;
  98. Kanninen P, Johans C, Merta J, Kontturi K. Influence of ligand structure on the stability and oxidation of copper nanoparticles. *J Colloid Interface Sci.* 2008;
  99. Mitić Ž, Nikolić GS, Cakić M, Premović P, Ilić L. FTIR spectroscopic characterization of Cu(II) coordination compounds with exopolysaccharide pullulan and its derivatives. *J Mol Struct.* 2009;
  100. Boury B, Plumejeau S. Metal oxides and polysaccharides: An efficient hybrid association for materials chemistry. *Green Chemistry.* 2015.
  101. Kang F, Alvarez PJ, Zhu D. Microbial Extracellular Polymeric Substances Reduce Ag<sup>+</sup> to Silver Nanoparticles and Antagonize Bactericidal Activity. *Environ Sci Technol [Internet].* 2014;48(1):316–22. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es403796x>
  102. Argueta-Figueroa L, Morales-Luckie RA, Scougall-Vilchis RJ, Olea-Mejía OF. Synthesis, characterization and antibacterial activity of copper, nickel and bimetallic Cu-Ni nanoparticles for potential use in dental materials. *Prog Nat Sci Mater Int.* 2014;24(4):321–8.

103. Rajesh KM, Ajitha B, Ashok Kumar Reddy Y, Suneetha Y, Sreedhara Reddy P. Synthesis of copper nanoparticles and role of pH on particle size control. *Mater Today Proc* [Internet]. 2016;3(6):1985–91. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221478531630133X>
104. Link S, El-Sayed MA. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *J Phys Chem B* [Internet]. 1999 [cited 2017 Oct 26];103(21):4212–7. Available from: [https://webshares.northseattle.edu/pkazarinoff/!!!Nano\\_230!!!/UV-Vis Spectrometry Characterization/Au NP Size vs. UV-Vis absorption.pdf](https://webshares.northseattle.edu/pkazarinoff/!!!Nano_230!!!/UV-Vis Spectrometry Characterization/Au NP Size vs. UV-Vis absorption.pdf)
105. Miao L, Wang C, Hou J, Wang P, Ao Y, Li Y, et al. Enhanced stability and dissolution of CuO nanoparticles by extracellular polymeric substances in aqueous environment. *J Nanoparticle Res*. 2015;
106. Talam S, Karumuri SR, Gunnam N. Synthesis, Characterization, and Spectroscopic Properties of ZnO Nanoparticles. *ISRN Nanotechnol* [Internet]. 2012;2012:1–6. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/372505/>
107. Kumar SS, Venkateswarlu P, Rao VR, Rao GN. Synthesis, characterization and optical properties of zinc oxide nanoparticles. *Int Nano Lett* [Internet]. 2013;3(1):30. Available from: <http://www.inl-journal.com/content/3/1/30>
108. Sangeetha G, Rajeshwari S, Venckatesh R. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by aloe barbadensis miller leaf extract: Structure and optical properties. *Mater Res Bull*. 2011;46(12):2560–6.
109. Suvorova EI, Buffat PA. Electron diffraction from micro- and nanoparticles of hydroxyapatite. *J Microsc*. 1999;196(1):46–58.
110. Ibrahim MAM, Al Radadi RM. Role of Glycine as a Complexing Agent in Nickel Electrodeposition from Acidic Sulphate Bath. *Int J Electrochem Sci* [Internet]. 2015 [cited 2018 Apr 2];10:4946–71. Available from: [www.electrochemsci.org](http://www.electrochemsci.org)

111. Aneesh PM, Vanaja KA, Jayaraj MK. Synthesis of ZnO nanoparticles by hydrothermal method. Proc SPIE [Internet]. 2007 [cited 2018 Apr 2];6639(6639):66390–66390. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/a137/d4dce27dfac320128c976f0e68409e363a5d.pdf>
112. Salavati-Niasari M, Davar F, Fereshteh Z. Synthesis of nickel and nickel oxide nanoparticles via heat-treatment of simple octanoate precursor. J Alloys Compd. 2010;494(1–2):410–4.
113. Salavati-Niasari M, Mir N, Davar F. A novel precursor in preparation and characterization of nickel oxide nanoparticles via thermal decomposition approach. J Alloys Compd. 2010;493(1–2):163–8.
114. Dharmaraj N, Prabu P, Nagarajan S, Kim CH, Park JH, Kim HY. Synthesis of nickel oxide nanoparticles using nickel acetate and poly(vinyl acetate) precursor. Mater Sci Eng B Solid-State Mater Adv Technol. 2006;128(1–3):111–4.
115. Hotovy I, Huran J, Spiess L. Characterization of sputtered NiO films using XRD and AFM. J Mater Sci. 2004;39(7):2609–12.
116. Parham S, Wicaksono DHB, Bagherbaigi S, Lee SL, Nur H. Antimicrobial Treatment of Different Metal Oxide Nanoparticles: A Critical Review. J Chinese Chem Soc [Internet]. 2016 Apr [cited 2018 May 28];63(4):385–93. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jccs.201500446>
117. Onbasli D, Aslim B. Determination of antimicrobial activity and production of some metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* B1 and B2 in sugar beet molasses. African J Biotechnol [Internet]. 2008;7(24):4614–9. Available from: <http://www.academicjournals.org/AJB>
118. Premanathan M, Karthikeyan K, Jeyasubramanian K, Manivannan G. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med. 2011;

119. Brayner R, Ferrari-Iliou R, Brivois N, Djediat S, Benedetti MF, Fiévet F. Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Lett.* 2006;
120. Jin T, Sun D, Su JY, Zhang H, Sue HJ. Antimicrobial efficacy of zinc oxide quantum dots against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis*, and *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Sci.* 2009;
121. Hosseinkhani P, Zand AM, Imani S, Rezayi M, Rezaei Zarchi S. Determining the antibacterial effect of ZnO nanoparticle against the pathogenic bacterium, *Shigella dysenteriae* (type 1). *Int J Nano Dimens [Internet]*. 2011 Jun 1 [cited 2018 Sep 25];1(4):279–85. Available from: [http://www.ijnd.ir/article\\_3549.html](http://www.ijnd.ir/article_3549.html)
122. Emami-Karvani Z, Chehrazi P. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *African J Microbiol Res.* 2011;
123. Dwivedi S, Wahab R, Khan F, Mishra YK, Musarrat J, Al-Khedhairi AA. Reactive oxygen species mediated bacterial biofilm inhibition via zinc oxide nanoparticles and their statistical determination. Al-Ahmad A, editor. *PLoS One [Internet]*. 2014 Nov 17 [cited 2018 Sep 25];9(11):e111289. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0111289>
124. Seil JT, Webster TJ. Reduced *Staphylococcus aureus* proliferation and biofilm formation on zinc oxide nanoparticle PVC composite surfaces. *Acta Biomater [Internet]*. 2011 Jun 1 [cited 2018 Sep 25];7(6):2579–84. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706111001309>
125. Akhil K, Jayakumar J, Gayathri G, Khan SS. Effect of various capping agents on photocatalytic, antibacterial and antibiofilm activities of ZnO nanoparticles. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2016;160:32–42.
126. Saleem S, Ahmed B, Khan MS, Al-Shaeri M, Musarrat J. Inhibition of growth and biofilm formation of clinical bacterial isolates by NiO

- nanoparticles synthesized from Eucalyptus globulus plants. *Microb Pathog.* 2017;111:375–87.
127. Zemlyanova MA, Akafeva TI, Dovbysh AA, Smirnov SA. Studies and comparative evaluation of the functional and material cumulation of nano and microdisperse nickel oxide consumed by the peroral route. *Heal Risk Anal* [Internet]. 2015 Apr [cited 2018 Oct 3];(4):36–43. Available from: <http://journal.fcrisk.ru/eng/sites/journal.fcrisk.ru.eng/files/upload/article/151/health-risk-analysis-2015-4-5.pdf>
  128. Kovřížnych JA, Sotníková R, Zeljenková D, Rollerová E, Szabová E. Long-term (30 days) toxicity of NiO nanoparticles for adult zebrafish *Danio rerio*. *Interdiscip Toxicol.* 2014;
  129. Patra P, Mitra S, Debnath N, Goswami A. Biochemical-, biophysical-, and microarray-based antifungal evaluation of the buffer-mediated synthesized nano zinc oxide: An in vivo and in vitro toxicity study. *Langmuir.* 2012;
  130. Seok SH, Cho WS, Park JS, Na Y, Jang A, Kim H, et al. Rat pancreatitis produced by 13-week administration of zinc oxide nanoparticles: Biopersistence of nanoparticles and possible solutions. *J Appl Toxicol.* 2013;
  131. Ramirez MAJR, Estacio AC, Elegado FB, Ramirez L V. Acute Oral Toxicity (LD50) of Crude Exopolysaccharide from *Rhodotorula minuta* BIOTECH 2178 in ICR Mice. *J Sci Eng Technol* [Internet]. 2016 Dec 31 [cited 2018 Sep 4];4(0):11–20. Available from: <https://www.ijterm.org/index.php/jset/article/view/161>
  132. Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. In: *British Journal of Pharmacology.* 2008.
  133. Lima DAF dos S, Nascimento MMP do, Vitali LH, Martinez R. In vitro activity of antimicrobial combinations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46(3):299–303.

134. Jyoti K, Baunthiyal M, Singh A. Characterization of silver nanoparticles synthesized using *Urtica dioica* Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics. *J Radiat Res Appl Sci*. 2016;
135. Khurana C, Sharma P, Pandey OP, Chudasama B. Synergistic Effect of Metal Nanoparticles on the Antimicrobial Activities of Antibiotics against Biorecycling Microbes. *J Mater Sci Technol*. 2016;
136. Li RC, Nix DE, Schentag JJ. Interaction between ciprofloxacin and metal cations: its influence on physicochemical characteristics and antibacterial activity. *Pharm Res*. 1994;11(6):917–20.
137. Anacona JR, Toledo C. Synthesis and antibacterial activity of metal complexes of ciprofloxacin. *Transit Met Chem*. 2001;26(1–2):228–31.
138. López-Gresa MP, Ortiz R, Perelló L, Latorre J, Liu-González M, García-Granda S, et al. Interactions of metal ions with two quinolone antimicrobial agents (cinoxacin and ciprofloxacin): Spectroscopic and X-ray structural characterization. *Antibacterial studies. J Inorg Biochem*. 2002;
139. Banoee M, Seif S, Nazari ZE, Jafari-Fesharaki P, Shahverdi HR, Moballegheh A, et al. ZnO nanoparticles enhanced antibacterial activity of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2010;
140. Wang Q, Sun F-J, Liu Y, Xiong L-R, Xie L-L, Xia P-Y. Enhancement of biofilm formation by subinhibitory concentrations of macrolides in *icaADBC*-positive and -negative clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2010 Jun 1 [cited 2019 Jan 31];54(6):2707–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20231401>
141. Sritharadol R, Hamada M, Kimura S, Ishii Y, Srichana T, Tateda K. Mupirocin at Subinhibitory Concentrations Induces Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. *Microb Drug Resist* [Internet]. 2018 Nov [cited 2019 Jan 31];24(9):1249–58. Available from:



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29653478>

142. Jiang H, Li J. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur Respir J*. 2011;38(Suppl 55).
143. He F, Yang Y, Yang G, Yu L. Studies on antibacterial activity and antibacterial mechanism of a novel polysaccharide from *Streptomyces virginia* H03. *Food Control*. 2010;
144. Xing K, Chen XG, Kong M, Liu CS, Cha DS, Park HJ. Effect of oleoyl-chitosan nanoparticles as a novel antibacterial dispersion system on viability, membrane permeability and cell morphology of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Carbohydr Polym*. 2009;
145. Mansouri S, Cuie Y, Winnik F, Shi Q, Lavigne P, Benderdour M, et al. Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy. *Biomaterials* [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2019 Feb 2];27(9):2060–5. Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961205008628>
146. Patil S, Sandberg A, Heckert E, Self W, Seal S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials* [Internet]. 2007 Nov 1 [cited 2019 Feb 2];28(31):4600–7. Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961207005546>
147. González AG, Shirokova LS, Pokrovsky OS, Emnova EE, Martínez RE, Santana-Casiano JM, et al. Adsorption of copper on *Pseudomonas aureofaciens*: Protective role of surface exopolysaccharides. *J Colloid Interface Sci* [Internet]. 2010 Oct [cited 2019 Aug 27];350(1):305–14. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979710006764>
148. Jittawuttipoka T, Planchon M, Spalla O, Benzerara K, Guyot F, Cassier-Chauvat C, et al. Multidisciplinary Evidences that *Synechocystis* PCC6803

Exopolysaccharides Operate in Cell Sedimentation and Protection against Salt and Metal Stresses. Scheffers D-J, editor. PLoS One [Internet]. 2013 Feb 6 [cited 2019 Aug 27];8(2):e55564. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0055564>

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

**MC Javier Alberto Garza Cervantes**

**Candidato** para el grado de

**Doctor en Ciencias** con orientación en **Microbiología Aplicada**

**Tesis:** Uso del exopolisacárido de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L como agente estabilizador en la síntesis de nanopartículas metálicas para la obtención de compuestos híbridos con actividad antimicrobiana y antibiofilm.

**Edad:** 27 años

**Campo de estudio:** Desarrollo de agentes terapéuticos

**Biografía:**

Datos Personales: Nacido en San Nicolás de los Garza, Nuevo León, el día 29 de mayo de 1992, hijo de Javier Garza Martínez y Ana María Cervantes Villegas.

Educación: Egresado de la UANL, Químico Farmacéutico Biólogo en el 2014 y Maestro en Ciencias en Microbiología Aplicada en el 2016.