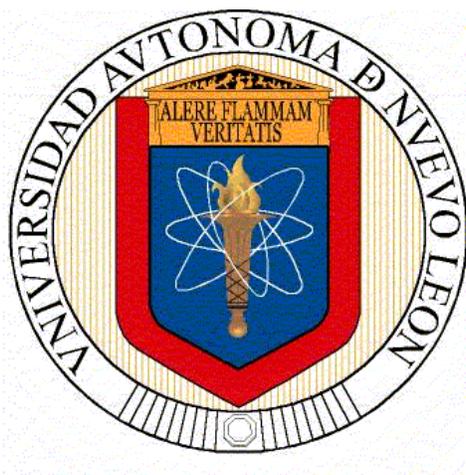


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



TESIS

**BIOPRODUCCIÓN DE MATERIALES HÍBRIDOS POLÍMERO-METÁLICOS CON
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE COMPETENCIA MICROBIANA.**

**POR
DANIEL BARBOZA PÉREZ**

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

JUNIO 2015

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1	8
1. INTRODUCCIÓN.....	8
CAPÍTULO 2	13
2. ANTECEDENTES.....	13
CAPÍTULO 3	17
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	17
3.1 Objetivo General	17
3.2 Objetivos Específicos	17
3.3 Hipótesis.....	17
CAPÍTULO 4	18
4. METODOLOGÍA	18
4.1 Materiales, reactivos y equipo	18
4.2 Procedimiento experimental general	20
4.3 Crecimiento de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	20
4.4 Optimización de la producción de exo-polisacárido	21
4.5 Extracción y purificación de exo-polisacárido	23
4.6 Caracterización del exo-polisacárido	25
4.7 Producción de nano-partículas de plata.....	26
4.8 Caracterización de las nano-partículas de plata.....	26
4.9 Recubrimiento de nano-partículas de plata.....	27
4.10 Pruebas de actividad antimicrobiana.....	27
CAPÍTULO 5	29
5. RESULTADOS.....	29
5.1 Optimización de la producción de exo-polisacárido.....	29
5.2 Caracterización de EPS.....	31
5.3 Producción y caracterización de nano-partículas	33
5.4 Recubrimiento de nano-partículas	40
5.5 Pruebas de actividad antimicrobiana.....	42
CAPÍTULO 6	45
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	45
6.1 Optimización de la producción de exo-polisacárido	45
6.2 Caracterización del exo-polisacárido	48

6.3	Producción y caracterización de nano-partículas	48
6.4	Pruebas de actividad antimicrobiana	53
CAPÍTULO 7		55
7.	CONCLUSIONES	55
CAPÍTULO 8		57
8.	PRESPECTIVAS	57
Referencias.....		58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores asignados al diseño experimental de competencia microbiana.....	21
Tabla 2. Composición del medio comercial YM (yeast mold).....	22
Tabla 3. Composición del medio YM (yeast mold) enriquecido.	22
Tabla 4. Composición del medio mineral elaborado.	23
Tabla 5. Composición del reactivo de Benedict.....	25
Tabla 6. Resultados del diseño experimental de competencia microbiana	29
Tabla 7. ANOVA del diseño experimental de competencia microbiana.....	30
Tabla 8. EPS producido por cada medio que se probó	31
Tabla 9. Resultados de la prueba Benedict.....	32
Tabla 10. Resultados del ensayo antimicrobiano realizado con nano-partículas que muestran máxima absorbancia a 266 nm.....	42
Tabla 11. Diferencia entre el cultivo control y el cultivo experimental (200 μ M).....	43
Tabla 12. Diferencia entre el cultivo control y el cultivo experimental (100 μ M).....	44
Tabla 13. Diferencia entre el cultivo control y el cultivo experimental (50 μ M).....	44
Tabla 14. EPS obtenido en base a distintos factores que se utilizaron para producirlo.	47
Tabla 15. Comparativa entre distintos trabajos sobre los efectos antimicrobianos de nano-partículas de plata.	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Nano-partículas de plata adheridas a la pared celular de <i>E. coli</i> , Morones (2005).	14
Figura 2. Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a la presencia de iones de plata Ag^+ , Eckhardt (2013).	14
Figura 3. Ilustración del proceso de formación de nano-partículas.	15
Figura 4. Espectro IR realizado al exo-polisacárido	31
Figura 5. Prueba Benedict realizada con el control de glucosa.	33
Figura 6. Prueba Benedict realizada con el exo-polisacárido.	33
Figura 7. Caracterización de los distintos tipos de nano-partículas de plata realizado por Huang T. y Hong X. (2010).	34
Figura 8. Comparativa entre las nano-partículas producidas con EPS (a) y lo reportado por Huang T. (2010) (b).	35
Figura 9. Barrido UV-Vis de las nano-partículas producidas con EPS.	35
Figura 10. Micrografía SEM de las nanopartículas con un pico a 266 nm.	36
Figura 11. Comparativa entre las nano-partículas utilizando EPS y glucosa (a) y lo reportado por Huan T. y Hong X. (2010) (b).	37
Figura 12. Barrido UV-Vis de las nano-partículas producidas con EPS y glucosa.	37
Figura 13. Micrografía SEM de nano-partículas producidas utilizando EPS y Glucosa a escala 400 nm.	38
Figura 14. Nano-partículas de plata producidas utilizando solamente glucosa como agente reductor; a) Solución acuosa de nano-partículas de plata, b) Barrido UV-Vis de las solución acuosa de nano-partículas de plata.	39
Figura 15. Micrografías SEM de AgNp's producidas con glucosa como agente reductor a escala de 5 μm (a) y 1 μm (b).	40
Figura 16. AgNp's recubiertas por el EPS; a) nano-partículas recubiertas en solución acuosa, b) Micrgrafía TEM de nano-patículas recubiertas.	41

Figura 17. Barrido UV-Vis realizado al sobrenadante después de extraer el EPS con nano-partículas.	41
Figura 18. Gráfica donde se muestra la diferencia entre el cultivo control y el cultivo experimental	43
Figura 19. Comparación entre AgNp's producidas con EPS + Glucosa (arriba) y aquellas producidas con glucosa solamente (abajo).	49
Figura 20. Gráfico de distribución de tamaño de nano-partículas de plata producidas utilizando EPS junto con glucosa como agente reductor.	50
Figura 21. Distintos materiales utilizados para controlar el tamaño de partícula: a) EPS, b) Matriz de carbón, c) PVP y d) BSA	51
Figura 22. Síntesis de AgNp's utilizando EPS + Glucosa como agente reductor (izq) y síntesis in situ por biomasa de hongo (der).	53

NOMENCLATURA

°C	Grados Celsius
μL	micro litro
μM	micro molar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AgNp's	Nano-partículas de plata
ATCC	American Type Culture Collection
CDC	Center for Disease Control
cm	Centímetro
D.O.	Densidad óptica
EPS	Exo-polisacárido
g	Gramo
L	Litro
LB	Luria Bertani
mL	mililitro
N.D.	No detectable
nm	nanómetro
UV-Vis	Espectro realizado en el rango de luz ultra violeta y visible
w/v	Relación peso/volumen

RESUMEN

Daniel Barboza Pérez

Fecha de Graduación: Junio, 2015

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: Bioproducción de materiales híbridos polímero-metálicos con actividad antimicrobiana mediante competencia microbiana

Número de páginas: 60

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

Área de Estudio: Nanomateriales

Propósito y Método del Estudio: Obtención de nano-partículas de plata a partir de biomateriales utilizando una síntesis que no utilice compuestos tóxicos y probar la capacidad antimicrobiana de las mismas.

Contribuciones y Conclusiones: Se logró la síntesis de nano-partículas de plata utilizando un biomaterial que ejerce control sobre el tamaño de partícula y al mismo las puede recubrir. Esta combinación tiene una capacidad antimicrobiana efectiva.

FIRMA DEL ASESOR: _____

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a antibióticos se refiere a la capacidad que poseen ciertos microorganismos para sobrevivir el tratamiento o exposición a algún antibiótico que induzca la muerte celular en otros microorganismos o que la haya inducido previamente en el mismo microorganismo. La resistencia puede ser hacia un solo tipo de antibiótico o varios al mismo tiempo¹.

Las causas de resistencia a antibióticos pueden ser atribuidas a factores humanos o naturales. Algunos de los factores naturales más relevantes se listan a continuación.

1. Una resistencia intrínseca del microorganismo a ciertos antibióticos.
2. Un proceso de adaptación. Dado la alta tasa de reproducción que presentan los microorganismos, en cuestión de horas se puede dar pie a que surjan generaciones nuevas de éstos. Esto presenta la oportunidad para que aparezcan mutaciones durante la replicación de ADN; algunas de las cuales pueden traer consigo la resistencia a antibióticos
3. El intercambio de ADN no genómico entre bacterias que se conoce como conjugación. Un proceso en el que ADN plasmídico que pudiera contener genes de resistencia a antibióticos es pasado de un microorganismo a otro².

4. Transposones. Estas son secuencias de ADN genómico que tienen la capacidad de migrar dentro del genoma; causando mutaciones que en algunos casos están asociadas a la resistencia a antibióticos³.

En el caso de factores humanos a continuación se mencionan algunos de los más importantes:

1. El mal uso de antibióticos; ya sea por un diagnóstico incorrecto por parte del médico o por no seguir la prescripción dada por el médico durante todo el tiempo indicado.
2. Malas prácticas por parte del personal hospitalario o de la industria de alimentos que por medio de contaminación cruzada pueden trasladar microorganismos que presenten resistencia a otras áreas del inmueble.
3. Disposición inadecuada de residuos o antibióticos, lo cual puede generar resistencia en los microorganismos presentes en el drenaje.
4. Falta de regulación por parte de algunos gobiernos donde los antibióticos se pueden conseguir sin necesidad de una receta médica⁴.

Ya que se mencionó las formas en que los microorganismos adquieren la resistencia a antibióticos, ahora se menciona brevemente los mecanismos de acción que otorgan dicha resistencia a antibióticos⁵.

- Enzimas que degradan al antibiótico.
- Enzimas análogas a las que son el blanco del antibiótico.

- Una mutación sobre el blanco del antibiótico que evita que este pueda actuar.
- Modificaciones post-traducción que reducen la afinidad del antibiótico.
- Expulsión del antibiótico.
- Disminución en la entrada del antibiótico al interior de la célula.
- Sobreproducción del blanco sobre el cual tiene efecto el antibiótico.

Sin embargo esto no es un problema que haya surgido recientemente; existen reportes que datan tan atrás como el año de 1940 cuando se encontró una penicilasa de procedencia bacteriana⁶. Poco después en el año de 1944 se descubrió una cepa mutante de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a la estreptomycinina en un paciente⁷.

A lo largo del siglo pasado se encontraron más microorganismos que presentan resistencia a antibióticos; entre ellos algunos que son reconocidos por su patogenicidad hacia el ser humano tales como *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* ssp. y *Salmonella* ssp. sin que prácticamente se encontrara una solución⁸.

Esto ha causado implicaciones negativas en la calidad de vida de aquellas personas que llegan a ser afligidas por una infección resistente a antibióticos; como lo reporta el Hospital de Chicago un paciente en estas condiciones puede estar internado de 1 a 2 semanas extras para ser tratado adecuadamente al momento de ser diagnosticado con una cepa resistente⁹.

Al mismo tiempo existe una implicación económica como resultado directo a esta problemática debido al gasto extra que representa tanto para el paciente como el hospital. El Centro para Control de Enfermedades, CDC por sus siglas en inglés, tiene reportado que los costos asociados a la resistencia a antibióticos ascienden a \$ 20 mil millones (dólares EUA) en gastos relacionados a la salud y \$ 35 mil millones (dólares EUA) en costos relacionados a la productividad tan solo en los Estados Unidos¹⁰. A nivel mundial, esta cifra, es obviamente mucho mayor.

Debido a lo anteriormente mencionado, es imperativa la obtención de una solución que puedan hacer frente a los microorganismos resistentes a antibióticos.

Es aquí donde entra el uso de la plata como agente antimicrobiano, que ha generado gran interés por su efectividad en los últimos 20 años¹¹. Sin embargo las propiedades antimicrobianas de la plata no es algo nuevo, se conocen desde la antigüedad ya que hay registros de deposición de monedas de plata en pozos de agua para mantenerlos limpios, uso de prótesis dentales de plata y el uso de gotas de AgNO_3 en los ojos de recién nacidos para evitar la transferencia de la gonorrea por parte de la madre al hijo¹².

Fue debido al descubrimiento de los antibióticos y su uso como tratamiento a partir de la década de 1940 cuando la plata cayó en desuso. Irónicamente la resistencia a antibióticos ha creado un redescubrimiento de la plata como agente antimicrobiano efectivo; siendo en la forma de nanopartículas donde se ha encontrado mayor efectividad¹³.

Se ha visto que el recubrimiento de nano-partículas metálicas para fines medicinales con polímeros biodegradables le otorga estabilidad a las partículas, así como la capacidad de ser liberadas gradualmente a lo largo del tiempo^{14, 22}. De tal forma que se tiene un sistema de entrega de fármacos que es biocompatible. Es por eso que para este proyecto se estudió la capacidad antibacteriana de nano-partículas de plata recubiertas por el exo-polisacárido producido por la levadura *Rhodotorula mucilaginosa*.

CAPÍTULO 2

2. ANTECEDENTES

Se sabe que la plata en forma de nano-partículas es de especial interés para combatir a los microorganismos; sobre todo aquellas partículas que presentan una máxima absorbancia en el barrido UV-Vis alrededor de 420 nm²³.

Se dice esto debido a los estudios que se han realizado que muestran que las nano-partículas de plata tienen efectos adversos sobre la estructura celular del microorganismo tales como:

- Adherencia de las partículas a la pared celular de la bacteria causan la inestabilidad de la misma, de tal forma que puede ocurrir la salida de componentes del citoplasma¹⁵.
- Se liberan iones de plata (Ag^+) los cuales interactúan con compuestos que contienen fósforo y azufre como lo son el ADN y algunas proteínas¹⁵.

La siguiente figura muestra un ejemplo de nano-partículas de plata adheridas a la superficie de la pared celular de *E. coli*.

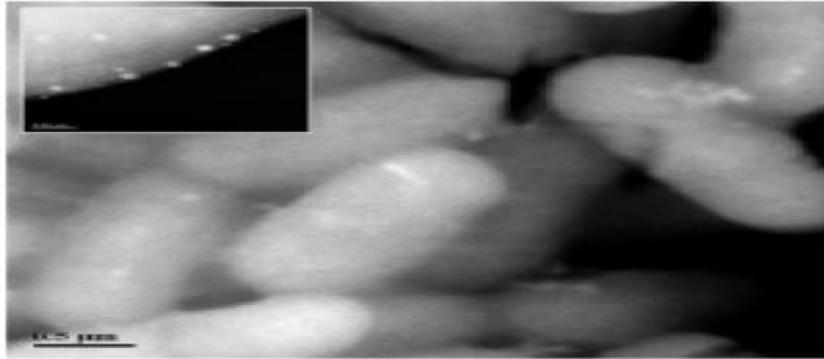


Figura 1. Nano-partículas de plata adheridas a la pared celular de *E. coli*, Morones (2005).

Abundando un poco más en las interacciones de la plata con el ADN y algunas proteínas, el efecto citotóxico ocurre por la liberación de iones de plata (Ag^+) que al interferir en la cadena de respiración celular genera abundantes especies reactivas de oxígeno, las cuales interfieren drásticamente con la maquinaria de replicación celular¹⁶. La siguiente figura muestra de manera general este proceso.

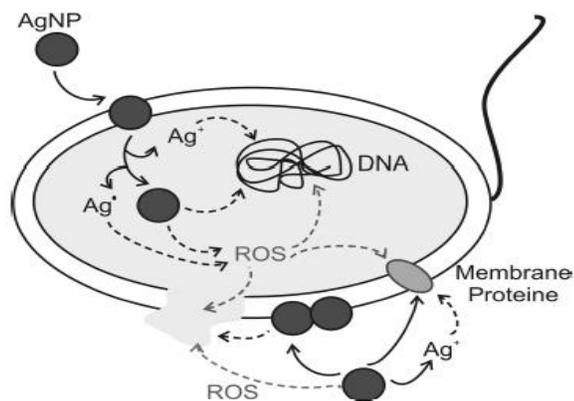


Figura 2. Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a la presencia de iones de plata Ag^+ , Eckhardt (2013).

La formación de nano-partículas de plata ocurre debido a una reducción, donde iones de plata Ag^+ suspendidos en una solución acuosa aceptan un electrón y cambian a un estado neutro (Ag^0). Al momento de perder la carga eléctrica que repelía a los iones, estos se pueden comenzar a agregar y formar partículas esféricas de tamaño nanométrico¹⁷. La siguiente figura ilustra este proceso.

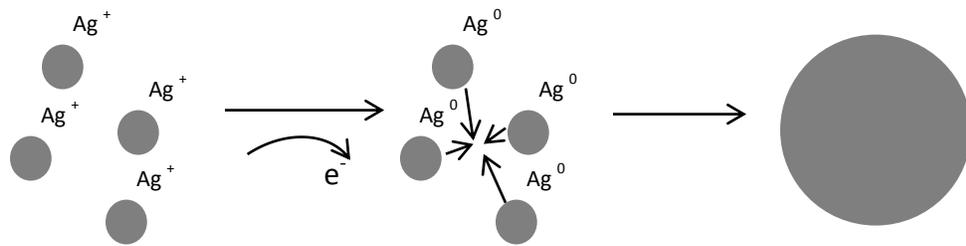


Figura 3. Ilustración del proceso de formación de nano-partículas.

Para que se lleve a cabo la reducción es necesario tener un donador de electrones, que funja como agente reductor. Los principales agentes reductores utilizados en la síntesis química de nano-partículas son la hidracina, derivados de la acrilamida, boro hidruro de sodio y dimetil formamida¹⁸. Todos estos compuestos representan un riesgo para la salud y el medio ambiente, por lo que es necesario encontrar alternativas no dañinas que puedan actuar como agente reductor.

Se ha reportado en la literatura que se han utilizado exo-polisacáridos de distintos microorganismos para la formación de nano-partículas metálicas, estos como su nombre lo indica son cadenas largas de monosacáridos que al ser de

origen biológico no representan riesgo al medio ambiente y pueden ser biodegradables¹⁹.

Un caso exitoso de nano-partículas formadas mediante el uso de exopolisacáridos el reportado por Kwon C. (2009). En el que se extrajo el exopolisacárido producido por el hongo *Sinorhizobium meliloti* y se utilizó como agente reductor en la formación de nano-partículas de plata¹⁸.

Además los exopolisacáridos no solo se están utilizando para la síntesis de nano-partículas, sino que también han cobra interés como agentes de entrega de fármacos debido a que se han podido encapsular algunas partículas metálicas en polímeros orgánicos tales como el quitosan. La ventaja que les otorga estos polímeros es que generan bio-disponibilidad y conforme se van degradando se va liberando poco a poco el compuesto encapsulado^{18,20}.

Por lo que para efectos de este proyecto, no solo se utilizó el exopolisacárido extraído de la levadura *R. mucilaginosa* para realizar una síntesis de nano-partículas utilizando sustancias que no sean dañinas al medio ambiente, sino que al mismo tiempo las recubrió y les otorgó bio-compatibilidad para tener un agente antimicrobiano efectivo.

CAPÍTULO 3

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1 Objetivo General

Utilizar el exo-polisacárido producido por la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* para la producción y recubrimiento de nano-partículas de plata.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar las condiciones de producción de exo-polisacáridos mediante *Rhodotorula mucilaginosa*.
- Utilizar el exopolisacárido obtenido como agente reductor para la producción y recubrimiento de nanopartículas (Ag).
- Estudiar la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas obtenidas.

3.3 Hipótesis

El exo-polisacárido producido por *Rhodotorula mucilaginosa* posee poder reductor para formar nano-partículas de plata y al mismo tiempo la capacidad de recubrirla.

CAPÍTULO 4

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales, reactivos y equipo

El material que se utilizó durante este proyecto es el siguiente:

- Micropipetas Eppendorf con volumen de 20-200 μL , 100-1000 μL y 1000-5000 μL .
- Puntillas de la marca Brand para las micropipetas que se mencionan en la viñeta anterior.
- Tubos marca Hatch de rosca.
- Tubos Falcon de 50 mL marca Corning.
- Matraces de 125 mL, 250 mL y 500 mL marca Pyrex.
- Cajas Petri Star™ dish de la marca Phoenix Biomedical.
- Paquete de Estadística Design Expert 7.0.0.
- Programa computacional para análisis de imagen ImageJ.

La levadura *Rhodotourla mucilaginoso* utilizada para la producción de EPS fue aislada del río Pesquería en el estado de Nuevo León, registrada con la clave UANL-001L por parte de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La cepa de *E. coli* utilizada en los ensayos de actividad antimicrobiana es proveniente de ATCC no. 25922.

La levadura fue crecida inicialmente en medio YM (Yeast Mold) Difco™ y posteriormente para el proceso de optimización de producción de EPS en un medio mineral con los siguientes reactivos:

- Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) Baker.
- Sulfato de magnesio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) Baker.
- Cloruro de sodio (NaCl) DEQ.
- Cloruro de calcio (CaCl) Baker.
- Cloruro de amonio (NH_4Cl) Merck.
- Sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Extracto de levadura EM®.
- Dextrosa DEQ.

En todos los ensayos llevados a cabo con *E. coli* el medio que se utilizó fue LB (Luria Bertani) Difco™.

El reactivo de Benedict consta de los siguientes componentes:

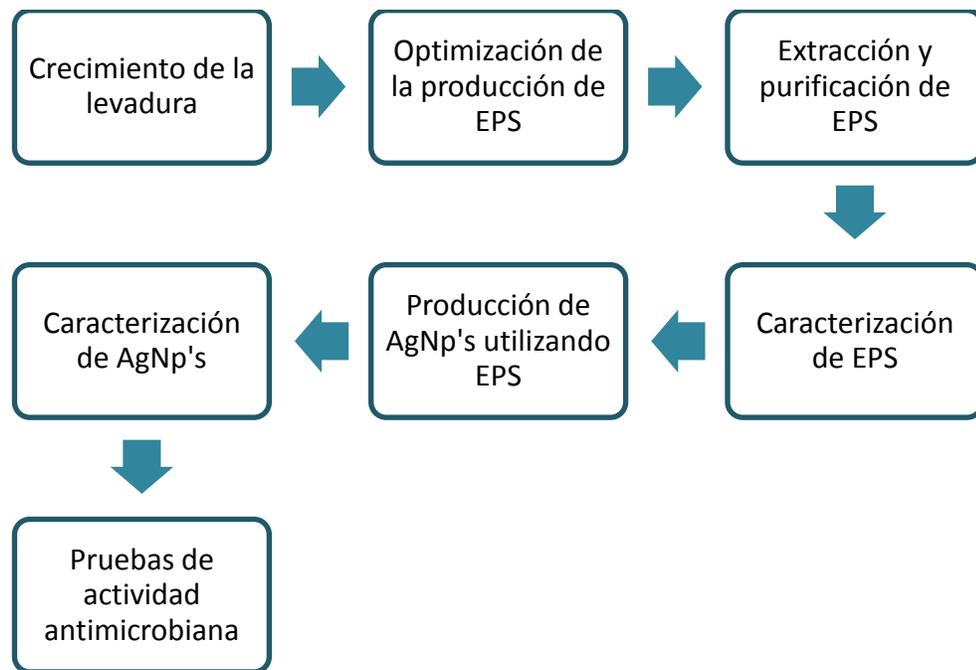
- Sulfato de cobre II (CuSO_4) Merck.
- Citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) Merck.
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3) Merck.

Los equipos utilizados fueron los siguientes:

- Incubadora SHEL-LAB modelo 1575
- Incubadora SHEL-LAB modelo SI-6
- Centrífuga ThermoElectron modelo Centrac-034

- Vortex Lab-Line modelo 1195
- Liofilizadora Labconco modelo Freezone-6
- Espectrofotómetro IR Shimadzu modelo Affinity-1

4.2 Procedimiento experimental general



4.3 Crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa*

El crecimiento de *R. mucilaginosa* se llevó a cabo en caldo YM (Yeast Mold). Se inoculó con un asa un volumen de 100 mL en un matraz de 250 mL y se incubó por un período de 72 horas a 28 °C a 140 rpm.

4.4 Optimización de la producción de exo-polisacárido

Para mejorar la producción de exo-polisacárido se probó primeramente mediante un sistema de competencia microbiano donde se creció la levadura junto con *E. coli* en medio YM en un volumen de 100 mL. Para esto se realizó un diseño de experimentos Placket-Burman con tres puntos centrales y como respuesta la cantidad de exo-polisacárido producido en peso seco. Los factores experimentales escogidos fueron la temperatura, concentración de glucosa e inóculo de *E. coli*. La siguiente tabla muestra los valores asignados a cada factor.

Tabla 1. Valores asignados al diseño experimental de competencia microbiana

Factor	Nivel experimental		
	-1	0	1
Temperatura (°C)	25	30	37
Inoculo de <i>E. coli</i> (ufc/mL)	1×10^6	3×10^6	5×10^6
Glucosa (g/L)	5	10	15

También se probó con distintos medios de cultivos que favorecieran la producción de EPS por parte de la levadura. En total se probaron tres medios de cultivo distintos. Primeramente se probó enriqueciendo caldo YM (yeast mold); un medio comercial que es selectivo para el crecimiento de hongos y levaduras. En la siguientes dos tablas se muestra primeramente la composición

del caldo YM (yeast mold) comercial y posteriormente la composición del caldo enriquecido con glucosa y extracto de levadura.

Tabla 2. Composición del medio comercial YM (yeast mold)

Sustrato	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	3.00
Extracto de malta	3.00
Peptona	5.00
Dextrosa	10.00

Tabla 3. Composición del medio YM (yeast mold) enriquecido.

Sustrato	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	5.00
Extracto de malta	3.00
Peptona	5.00
Dextrosa	20.00

Posteriormente se elaboró un medio de cultivo mineral que contuviera los elementos traza necesarios para el crecimiento de la levadura y se utilizó dextrosa como única fuente de carbono. A continuación se muestra la composición de este medio.

Tabla 4. Composición del medio mineral elaborado.

Sustrato	Concentración (g/L)
KH_2PO_4	1.00
NaCl	0.10
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.50
CaCl_2	0.10
NH_4Cl	2.00
Extracto de levadura	2.00
Dextrosa	20.00

El último paso de la optimización de producción de exo-polisacárido fue añadir sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), como se muestra en la tabla anterior, a una concentración de 0.05 g/L y se aumentó la concentración de dextrosa a 40 g/L.

4.5 Extracción y purificación de exo-polisacárido

Para la extracción de EPS primero se colocó la biomasa suspendida en el medio de cultivo en tubos falcon de 50 mL y se procedió a centrifugar a 4600 rpm por 20 minutos a 4 °C para separar la biomasa del medio de cultivo que es donde se encuentra disuelto el EPS. Después de centrifugar la biomasa forma un paquete celular en el fondo del tubo; y se decantó el medio de cultivo a otros tubos falcon a un volumen de 25 mL. Una vez que se decantó todo el medio de cultivo en tubos falcon a un volumen de 25 mL se añadió a cada tubo etanol al 96% hasta alcanzar un volumen de 50 mL y se agitó para asegurarse que el

etanol entró en contacto con todo el EPS disponible. Posteriormente se dejó reposar por 60 minutos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El etanol hace que precipite el exo-polisacárido al quitarle a este las interacciones con el agua, este se observará como una hebra en el medio de cultivo.

Una vez que han pasado los 60 minutos a -20°C se centrifugó a 4600 rpm por 15 minutos y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para sedimentar el EPS en forma de paquete celular y recuperarlo más fácilmente.

Una vez que se ha recuperado el EPS se procede a purificarlo para eliminar las trazas de medio de cultivo que este contenga, para esto se realizaron los siguientes pasos por triplicado:

1. Se resuspendió cada paquete celular en 10 mL de agua desionizada.
2. Se añadieron 3 mililitros de etanol al 96% por cada mililitro de agua desionizada que se utilizó para resuspender.
3. Se centrifugó a 4600 rpm por 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para formar un paquete celular.

La cantidad de EPS producido se determinó mediante peso seco. Para esto se liofilizó a $-53\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 0.002 mbar por un período de 24 horas.

4.6 Caracterización del exo-polisacárido

Para la caracterización del exo-polisacárido se llevó a cabo un ensayo de IR para determinar que grupos funcionales existen en él. De especial interés es el grupo carbonilo (C=O) ya que este tiene potencial reductor para la formación de nano-partículas de plata.

Junto con esta prueba también se realizó la prueba de Benedict para determinar azúcares reductores. Esto con el fin de saber de manera cualitativa mediante un cambio de color del reactivo de Benedict. Se prepararon 10 mL de reactivo de Benedict a las siguientes concentraciones:

Tabla 5. Composición del reactivo de Benedict.

Reactivo	g/L
CuSO ₄	17.3
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	173
Na ₂ CO ₃	100

El ensayo se llevó a cabo agregando 1 mL de reactivo a 2 mL de una solución 1% w/v de glucosa como control y de igual forma 1 mL de reactivo a 2 mL de una solución 1% w/v de EPS que se calentaron en a 100 °C por 5 minutos para que ocurriera el cambio de coloración en el reactivo que indica una reducción. El cambio de color se debe a la reducción de iones cúprico (Cu⁺²) a cuproso (Cu⁺) que posteriormente precipitan en forma de óxido cuproso (Cu₂O).

4.7 Producción de nano-partículas de plata

Se pesaron 42 mg de nitrato de plata (AgNO_3) y se disolvieron en 25 mL de agua desionizada, esto con el fin de obtener una solución a 10 mM AgNO_3 . A partir de esa solución es de donde se obtuvieron las nano-partículas de plata; para esto se agregó un agente reductor que diera inicio al proceso de nucleación que forma dichas nano-partículas. Se utilizaron dos métodos para la síntesis de nano-partículas que son los siguientes:

- Se agregaron 5 mg de EPS resuspendidos en 5 mL de agua desionizada a la solución acuosa de AgNO_3 10 mM y se calentó por dos horas a 80 °C y agitación constante.
- Se agregaron 5 mg de EPS resuspendidos en 5 mL de agua desionizada a una solución acuosa de AgNO_3 y dextrosa 10 mM y se calentó por dos horas a 80 °C y agitación constante.

4.8 Caracterización de las nano-partículas de plata.

La caracterización de las nano-partículas producidas se realizó mediante barridos de espectrometría UV-Vis utilizando celdas de cuarzo y como blanco agua desionizada.

También se realizaron micrografías de microscopía electrónica SEM y TEM para observar y determinar el tamaño de nano-partícula.

4.9 Recubrimiento de nano-partículas de plata

Para el recubrimiento de las nano-partículas se agregó etanol al 96% en una relación 1:1 volumen. De esta forma al precipitar el polímero éste arrastra consigo a las nano-partículas que se hayan formado.

4.10 Pruebas de actividad antimicrobiana

Las pruebas de actividad antimicrobiana se realizaron sobre *E. coli* en un volumen de 100 mL de medio de cultivo LB. Se partió inicialmente de un cultivo de *E. coli* incubado por 24 h a 37 °C y 150 rpm. De este cultivo se tomó un volumen de 1 mL para inocular un matraz con medio fresco y se incubó nuevamente hasta alcanzar una D.O. ₆₀₀ de 0.2; para asegurar que la bacteria estuviera en estado exponencial al momento de realizar los experimentos.

Una vez que se alcanzó la D.O. ₆₀₀ deseada se tomaron 100 µL de para inocular los matraces donde se realizaron los experimentos. Se tuvo un control negativo que constaba solamente de *E. coli* en medio LB y el matraz experimental que constaba de *E. coli* junto con nano-partículas de plata recubiertas de polímero (máx. abs. a 420 nm) a concentraciones de 200, 100 y 50 µM. Se tomaron muestras cada hora durante tres horas para determinar la cantidad de células vivas en cada matraz. Los ensayos realizados con nano-partículas que dieron máxima absorbancia a 266 nm en el barrido UV-Vis se utilizó solo la concentración de 200 µM y el muestreo fue cada dos horas por un período de seis horas.

La determinación de células vivas se hizo por el método de goteo en placa que es similar al método de extensión en placa. En este caso lo que se hace es tomar una muestra de 10 μ L y se deposita la gota sobre el agar, posteriormente se espera a que se absorba y se incuba por 24 h a 37°C. Se cuenta el número de colonias que crecieron y se aplica la siguiente fórmula para determinar el número de células presentes en cada matraz²¹.

$$\frac{UFC}{mL} = (No. colonias)(50)(Factor de dilución)$$

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS

5.1 Optimalización de la producción de exo-polisacárido.

En la parte de sistema de competencia microbiano los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 6. Resultados del diseño experimental de competencia microbiana

Glucosa	UFC/ mL	Temp °C	EPS mg
1	0	1	N.D.
0	1	1	N.D.
0	0	0	4.8
0	0	0	4.7
1	1	0	2.5
-1	0	1	2.2
1	-1	0	5
0	0	0	5.3
-1	-1	0	6.7
1	0	-1	8.8
0	-1	-1	7.2
0	1	-1	4.2
-1	0	-1	4.4
-1	1	0	1.3
0	-1	1	5

El control utilizado en el diseño de experimentos produjo una cantidad de 6.6 mg de EPS.

Tabla 7. ANOVA del diseño experimental de competencia microbiana.

Fuente	Grados de libertad	F	p > F
Modelo	3	12.63	0.0007
Glucosa	1	0.20	0.6665
Inóculo (<i>E.coli</i>)	1	17.15	0.0016
Temperatura	1	20.54	0.0009

De acuerdo a los datos arrojados por el ANOVA y tomando en cuenta un nivel de confianza del 95 %, se puede determinar que el modelo que se aplicó es significativo y que aquellas variables experimentales que tienen un efecto sobre la producción de exo-polisacárido son la temperatura y la cantidad de inóculo de *E.coli* en base a su valor de p que en todos los casos es menor a 0.05.

En lo que respecta a la optimización por medios de cultivo la siguiente tabla resume las cantidades obtenidas con cada medio elaborado.

Tabla 8. EPS producido por cada medio que se probó

Medio de cultivo	EPS g/L
YM enriquecido	50-60
Medio Mineral	225-250
Medio Mineral + Zn	650

5.2 Caracterización de EPS

Para determinar que grupos funcionales existen en el exo-polisacárido se llevó a cabo una espectrometría infrarroja. A continuación se muestra el espectro IR que se obtuvo.

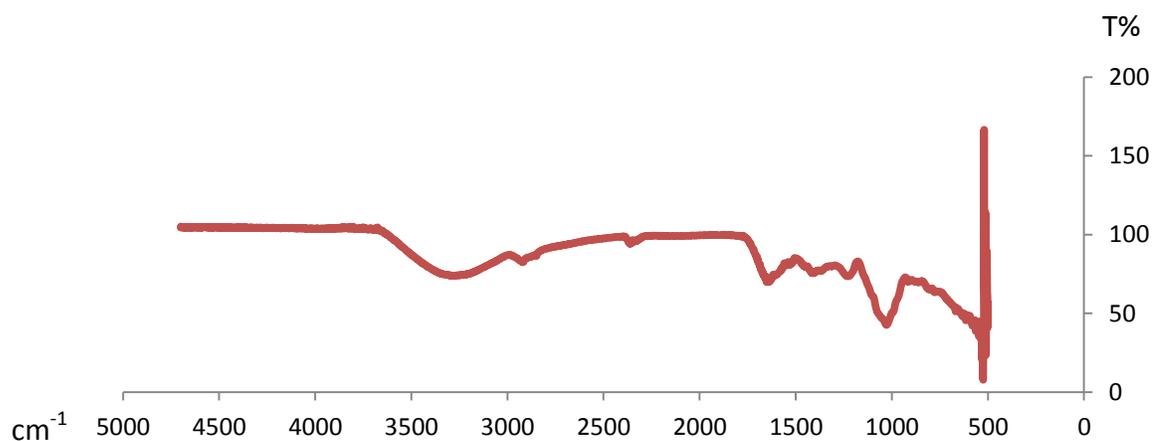


Figura 4. Espectro IR realizado al exo-polisacárido

Del espectro que se muestra se pueden identificar los siguientes grupos funcionales de acuerdo a su frecuencia característica.

- C-O a 1028 cm^{-1}
- CH a 1228 cm^{-1}
- C=O a 1652 cm^{-1}
- OH a 3272 cm^{-1}

De esta forma se induce que el exo-polisacárido posee cierta capacidad reductora debido a la presencia de grupos C=O; para determinar esto se realizó la prueba de azúcares reductores de Benedict la cual de manera cuantitativa indica la capacidad reductiva de la muestra en base a su coloración como se muestra a continuación.

Tabla 9. Resultados de la prueba Benedict

Coloración	Capacidad reductiva
Azul	Inexistente
Verde	Trazas reductivas, mínima
Amarillo	Capacidad moderada
Rojo-naranja	Alta

La prueba Benedict realizada con el exo-polisacárido nos indicó que este tiene poca capacidad reductiva debido a la coloración que adquirió a comparación con la glucosa como se puede observar en las siguientes figuras

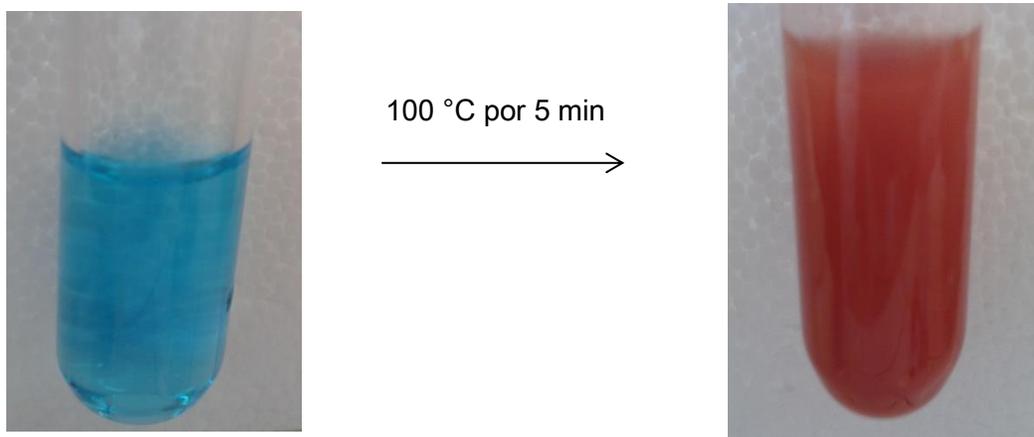


Figura 5. Prueba Benedict realizada con el control de glucosa.

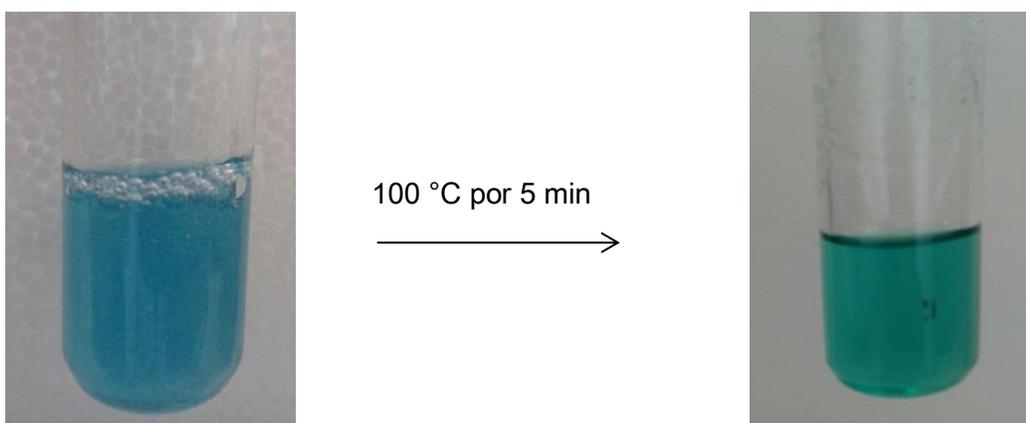


Figura 6. Prueba Benedict realizada con el exo-polisacárido.

Como se puede observar claramente el control con glucosa obtuvo una coloración rojiza mientras que la prueba realizada con el exo-polisacárido dio una coloración verde claro característica de compuestos con trazas reductivas.

5.3 Producción y caracterización de nano-partículas

La producción exitosa de nano-partículas se puede identificar fácilmente por la coloración que adquiere la solución acuosa en la que están. Esto es debido a que la luz que es reflejada por la superficie del plasmón de resonancia

de las nano-partículas en forma esférica (20-40 nm) corresponde al color amarillo; de tal forma que la presencia de este color es indicativa de la presencia de nano-partículas de plata.

Huang T. y Hong X. (2010) ya realizaron una caracterización de las distintas formas de nano-partículas y además realizaron una correlación entre el color y el tamaño de la partícula²³. A continuación se presenta la caracterización realizada por estos autores en los cuales se basó la parte de la caracterización de nano-partículas que se produjeron.

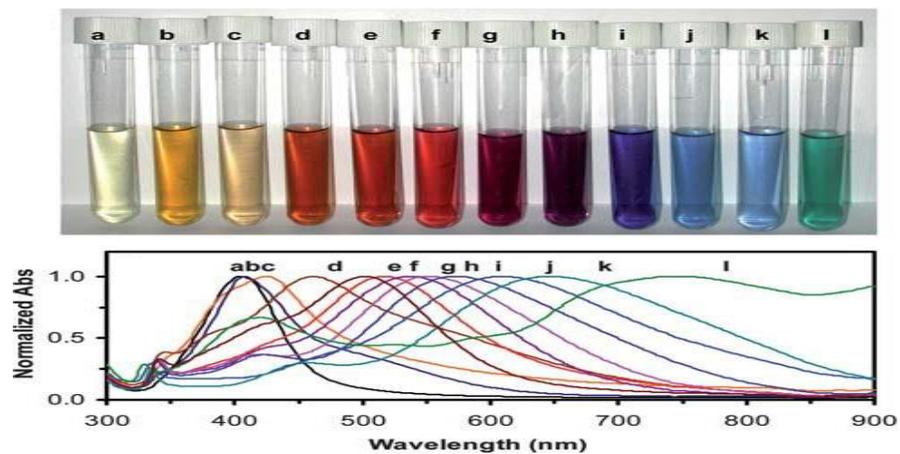


Figura 7. Caracterización de los distintos tipos de nano-partículas de plata realizado por Huang T. y Hong X. (2010).

De la figura anterior es importante recalcar que los primeros tres colores corresponden a nano-partículas esféricas de plata así como en la parte inferior se muestra los barridos en el espectro UV-Vis que corresponden a cada tipo de nano-partícula.

Primeramente se llevó a cabo la producción de nano-partículas de plata utilizando solamente el exo-polisacárido como agente reductor tal como se describe en el capítulo de metodología. El resultado obtenido se muestra en la siguiente figura.

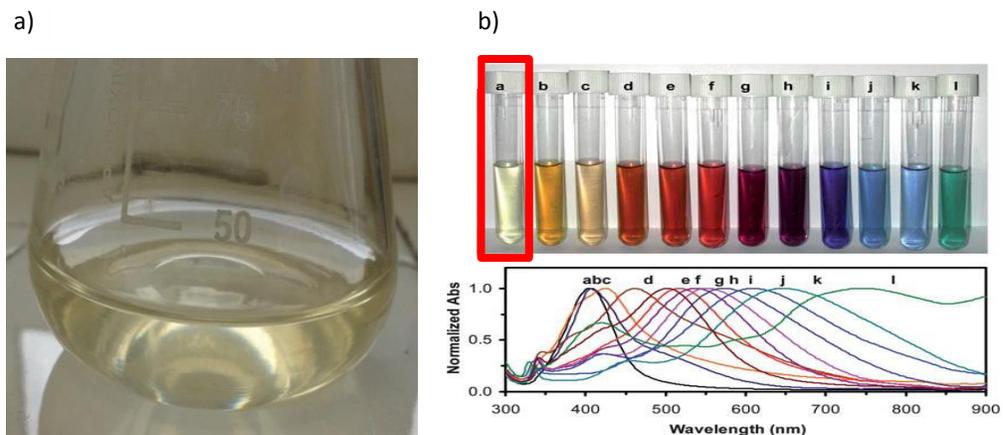


Figura 8. Comparativa entre las nano-partículas producidas con EPS (a) y lo reportado por Huang T. (2010) (b).

Como se puede apreciar en la figura anterior, se obtuvo una coloración amarillo pálido que corresponde a lo reportado en la literatura. A continuación se muestra el barrido de espectrometría UV-Vis de las nano-partículas obtenidas en la figura 9.

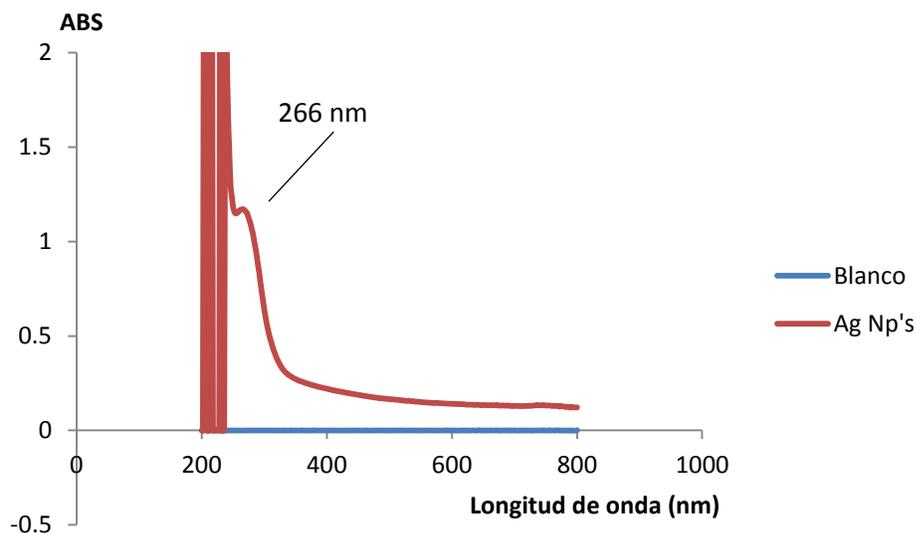


Figura 9. Barrido UV-Vis de las nano-partículas producidas con EPS.

En la figura anterior el pico que se observa es a una longitud de onda de 266 nm. Además se realizó una micrografía electrónica SEM donde se observa la predominancia de nano-partículas pequeñas de alrededor de 2 nm de diámetro; marcadas en rojo en la siguiente figura.

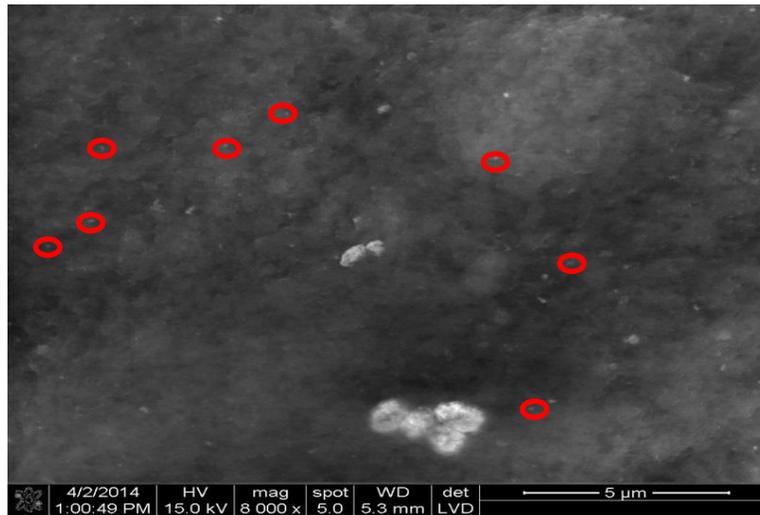


Figura 10. Micrografía SEM de las nanopartículas con un pico a 266 nm.

Las nano-partículas que se obtuvieron utilizando el exo-polisacárido junto con la glucosa como agente reductor fueron de un tamaño mayor; apreciable tanto por su coloración como por el pico presente en el barrido UV-Vis.

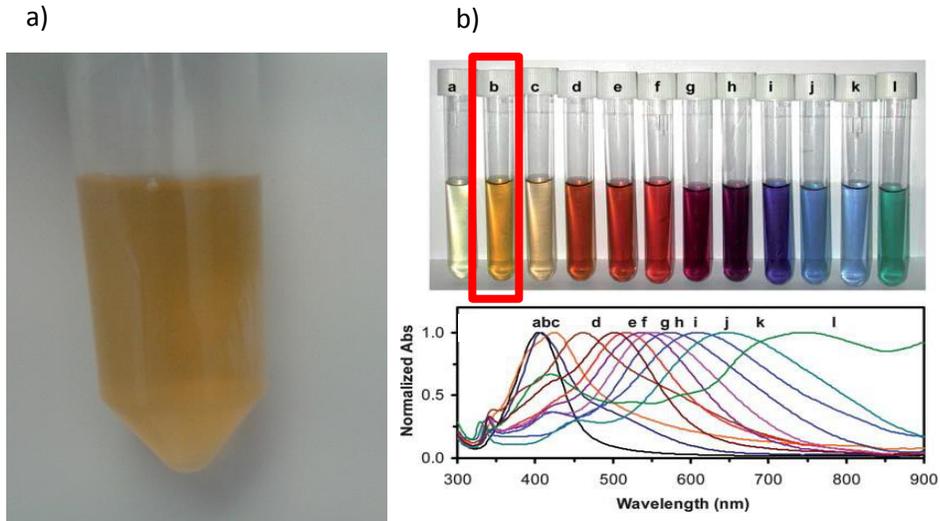


Figura 11. Comparativa entre las nano-partículas utilizando EPS y glucosa (a) y lo reportado por Huan T. y Hong X. (2010) (b).

Se puede observar claramente que la coloración es de un amarillo más intenso como se muestra con lo que está reportado en la literatura. A continuación se muestra el barrido UV-Vis de las partículas obtenidas en la fig. 12.

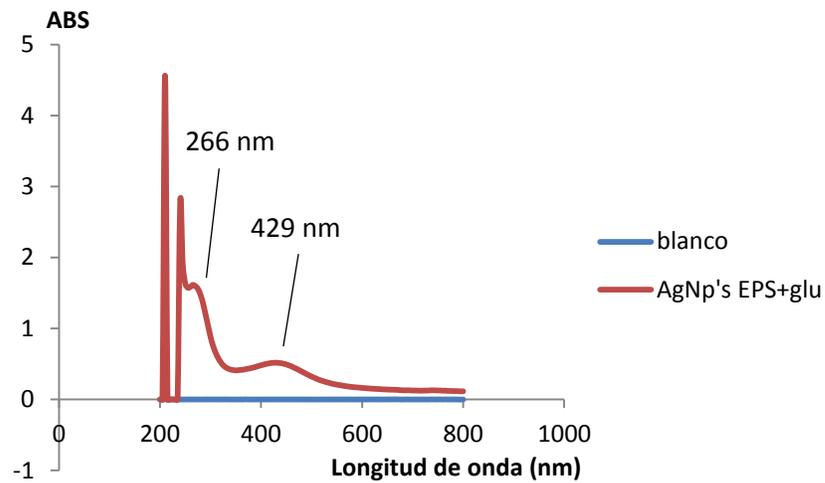


Figura 12. Barrido UV-Vis de las nano-partículas producidas con EPS y glucosa.

En la figura anterior se puede observar claramente dos picos. Uno a 266 nm y otro a 429 nm; la micrografía electrónica que se tomó a una muestra de estas partículas muestra un tamaño de partícula alrededor de 30 nm como se muestra en la siguiente figura.

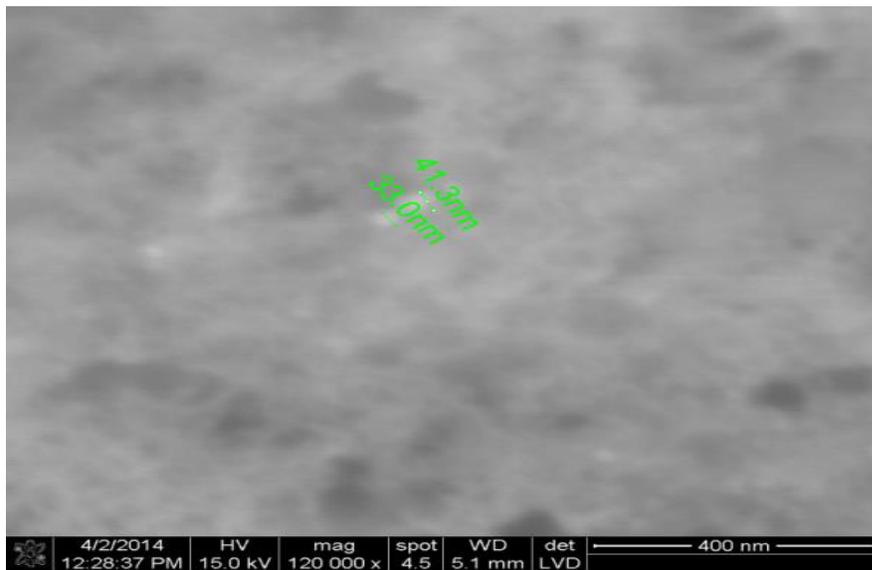


Figura 13. Micrografía SEM de nano-partículas producidas utilizando EPS y Glucosa a escala 400 nm.

También se produjeron nano-partículas de plata donde se utilizó solamente glucosa como agente reductor, la siguiente figura muestra la coloración obtenida y el barrido UV-Vis realizado a dichas partículas.

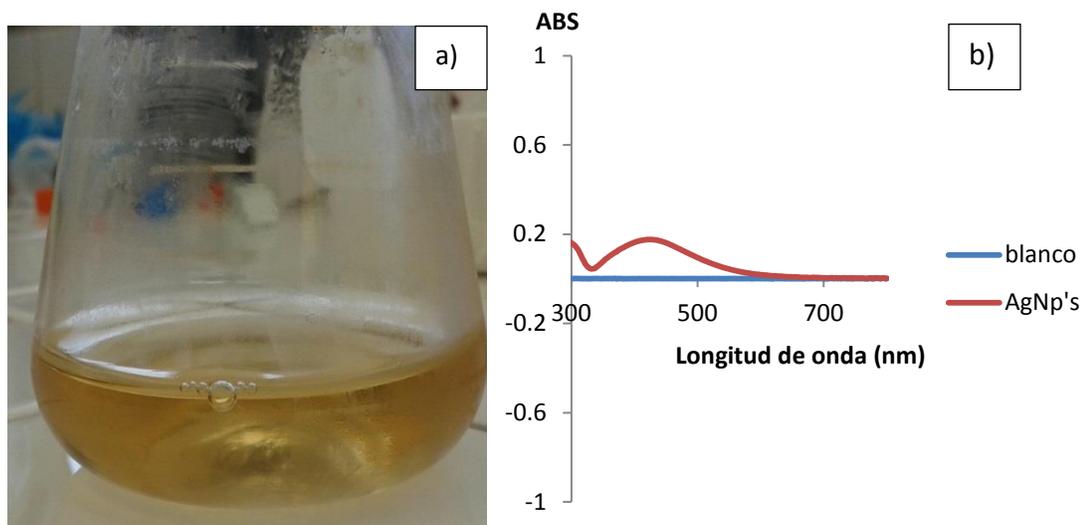


Figura 14. Nano-partículas de plata producidas utilizando solamente glucosa como agente reductor; a) Solución acuosa de nano-partículas de plata, b) Barrido UV-Vis de las solución acuosa de nano-partículas de plata.

De nueva cuenta se obtuvo la coloración amarillenta característica de las nano-partículas esféricas de plata así como un pico en el barrido UV-Vis que corresponde a 426 nm, sin embargo la longitud de onda que se muestra en el barrido es mayor que cuando se utiliza una combinación de glucosa y EPS como agente reductor. Esto indica que uniformidad de las partículas producidas es menor que las obtenidas anteriormente. Las micrografías de SEM que se muestran a continuación corroboran esto.

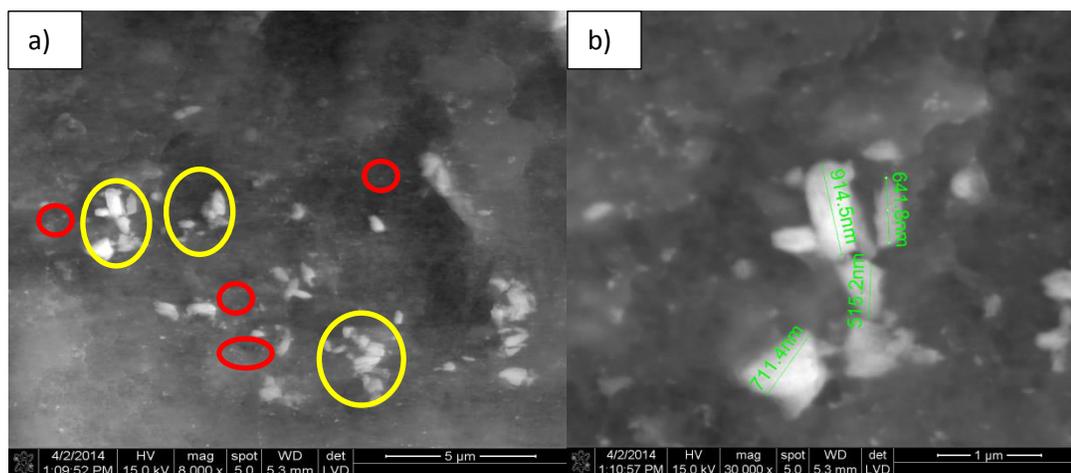


Figura 15. Micrografías SEM de AgNp's producidas con glucosa como agente reductor a escala de 5 μm (a) y 1 μm (b).

En la figura 15 se muestra señalado en rojo aquellas nano-partículas con diámetro de 20-40 nm que corresponde a un pico en el barrido UV-Vis de 420 nm. Señalado en amarillo están aglomerados de partículas de plata con un tamaño mayor cuyo diámetro se muestra en la parte derecha de la figura.

5.4 Recubrimiento de nano-partículas

Al momento de agregar etanol al 96 % el exo-polisacárido comienza precipitar y este se observa como una masa de color marrón, lo cual indica que ha arrastrado consigo las nano-partículas producidas y por lo tanto significa que están recubiertas por el EPS. Esto fue corroborado mediante microscopía electrónica. En la siguiente figura se muestra el proceso de recubrimiento y una micrografía que tomada a las nano-partículas recubiertas.

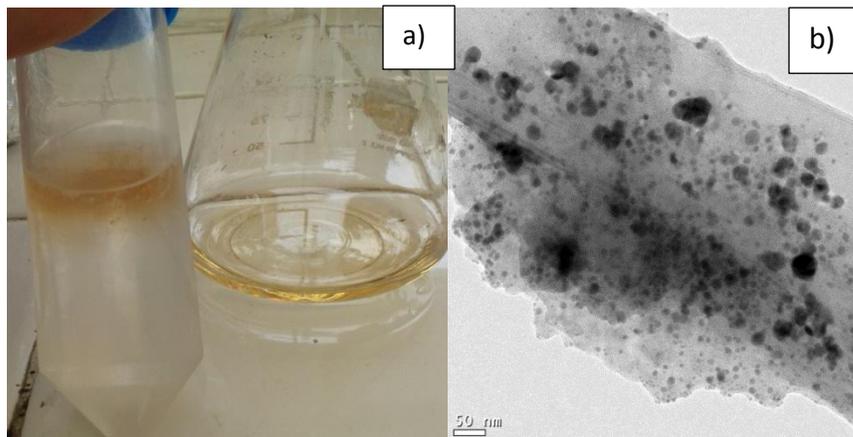


Figura 16. AgNp's recubiertas por el EPS; a) nano-partículas recubiertas en solución acuosa, b) Micografía TEM de nano-partículas recubiertas.

En la figura anterior se puede observar claramente que la solución acuosa de nano-partículas pierde por completo su coloración amarilla; lo cual indica que el EPS tiene la capacidad de recuperar el 100% de las nano-partículas que se formaron.

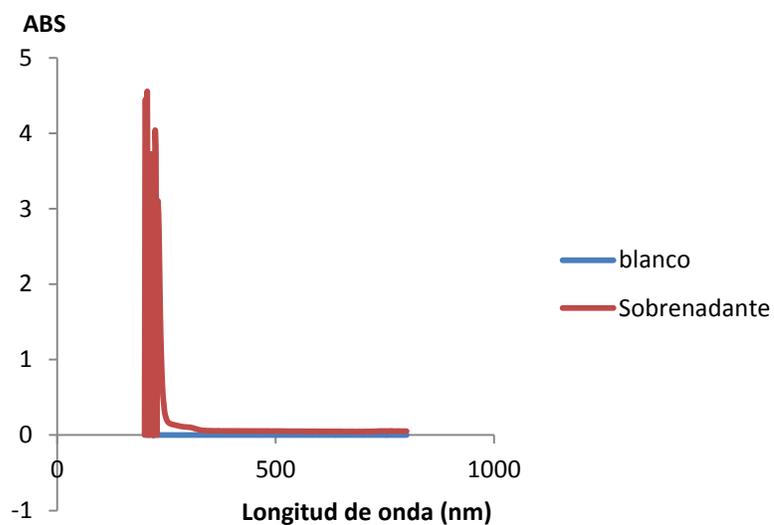


Figura 17. Barrido UV-Vis realizado al sobrenadante después de extraer el EPS con nano-partículas.

La figura 17 muestra que el barrido UV-Vis realizado al sobrenadante después de extraer las nano-partículas de plata queda prácticamente como una línea paralela al blanco, lo cual confirma que se recuperó el 100% de partículas producidas.

5.5 Pruebas de actividad antimicrobiana

Las primeras pruebas de actividad antimicrobiana que se realizaron fueron con aquellas partículas que muestran una absorbancia máxima UV-Vis a 266 nm. Hubo una disminución en la población bacteriana, las cantidades y porcentaje de disminución con respecto al control se muestra en la siguiente tabla y gráficamente en la figura 18.

Tabla 10. Resultados del ensayo antimicrobiano realizado con nano-partículas que muestran máxima absorbancia a 266 nm.

Tiempo (h)	Control (UFC totales)	Ag 200 μ M (UFC totales)	% reducción respecto al control
0	4×10^6	4×10^6	0
2	2×10^8	1.2×10^8	40
4	1.1×10^9	5.5×10^8	50
6	1×10^{10}	7×10^9	30

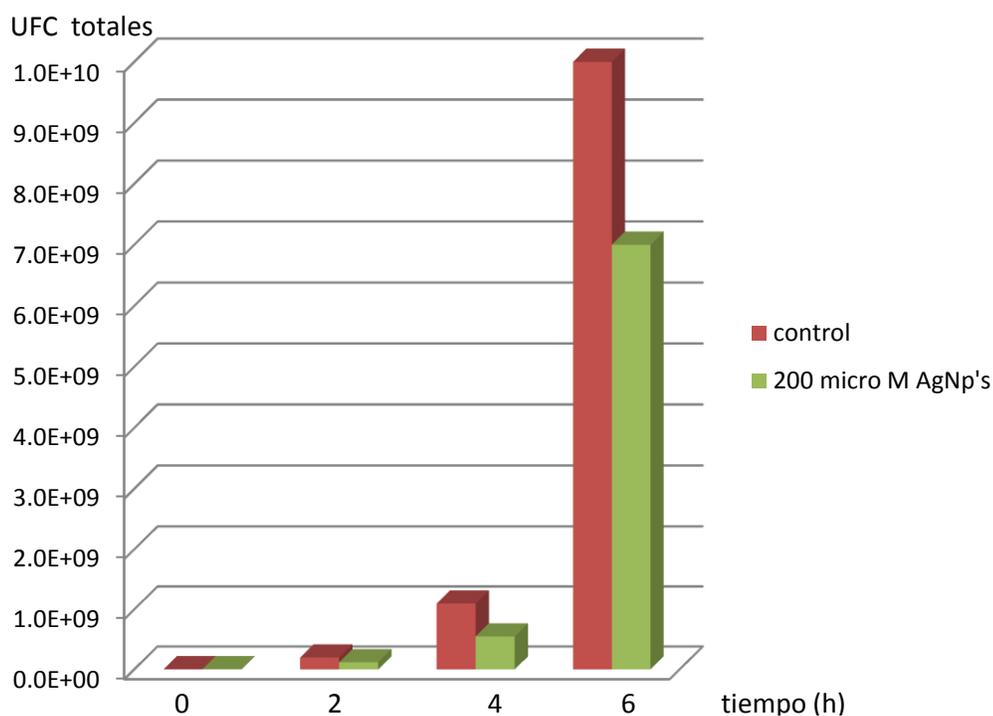


Figura 18. Gráfica donde se muestra la diferencia entre el cultivo control y el cultivo experimental

Para el caso de las nano-partículas que dieron un pico alrededor de 420 nm, se observó una disminución entre las poblaciones control y experimental muy marcada; las siguientes tablas muestran los datos obtenidos para 200, 100 y 50 μM en ese orden.

Tabla 11. Diferencia entre el cultivo control y el cultivo experimental (200 μM).

Tiempo (h)	Control (UFC totales)	Ag 200 μM (UFC totales)	% reducción respecto al control
0	4.5×10^6	4.5×10^6	0
1	2.00×10^7	6.5×10^6	67.5
2	2.00×10^8	2.00×10^6	99
3	2.05×10^9	9×10^5	99

Tabla 12. Diferencia entre el cultivo control y el cultivo experimental (100 μ M).

Tiempo (h)	Control (UFC totales)	Ag 100 μ M (UFC totales)	% reducción respecto al control	% reducción de la población del matraz experimental
0	4.50×10^6	4.50×10^6	0	0
1	1.50×10^7	1.05×10^6	93	76
2	1.10×10^8	1.30×10^6	98	71
3	4.08×10^8	7.5×10^5	99	86

Tabla 13. Diferencia entre el cultivo control y el cultivo experimental (50 μ M).

Tiempo (h)	Control (UFC totales)	Ag 50 μ M (UFC totales)	% reducción respecto al control	% reducción de la población del matraz experimental
0	3.50×10^6	3.50×10^6	0	0
1	1.25×10^7	3.50×10^6	72	0
2	2.50×10^8	2.50×10^6	99	28
3	5.00×10^8	8.00×10^5	99	77

CAPÍTULO 6

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Optimización de la producción de exo-polisacárido

En cuanto a la producción de exo-polisacárido mediante competencia microbiana; se esperaba observar que hubiera una interacción antagónica entre la bacteria *E. coli* y la levadura *R. mucilaginosa*, de tal manera que hubiera un estrés sobre la levadura que indujera la producción de EPS como respuesta a la situación adversa. Como se muestra en los resultados no hubo un incremento considerable en base al control utilizado que dio una producción de 6.6 mg. Es por esto que se determinó que la competencia microbiana con *E. coli* no es efectiva para la producción de exo-polisacárido. En cuanto al análisis estadístico, como se mencionó en el apartado de resultados, la temperatura y cantidad de inóculos son los factores que afectan la producción de exo-polisacárido; ya que la menor cantidad de polímero producido fue a temperatura que favorece el crecimiento de *E. coli* y cantidades de inóculo igual o mayor al de *R. mucilaginosa*. Mientras que la mayor cantidad de polímero se obtuvo a una temperatura que favorece a *R. mucilaginosa* y un inóculo inicial de *E. coli* igual al de *R. mucilaginosa*.

Sin embargo si esta reportado en la literatura el uso de interacciones microbianas para obtener cantidades altas de exo-polisacárido como el caso de

que reportan hasta 11.2 g/L de EPS al utilizar *Rhodotorula rubra*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* en un medio altamente enriquecido y largos períodos de incubación²⁴. Para efectos de este proyecto al comparar la producción obtenida por competencia microbiana y la producción obtenida por medios de cultivo enriquecido; se determinó que el sistema de competencia microbiana produce una cantidad de exo-polisacárido inferior a la que se obtiene por medios de cultivo.

Por eso se optó por tratar con medios enriquecidos para mejorar la producción de EPS. Como se muestra en los resultados el enriquecimiento del medio con glucosa tiene un impacto directo en la producción de EPS, dado que hay más biomasa que produzca EPS y al mismo tiempo más glucosa disponible para entrar a la síntesis de Leloir que interviene en la formación de exopolisacáridos.

En lo que respecta al incremento drástico en la producción de EPS debido al zinc; se sabe que la presencia de iones metálicos en el medio de cultivo tiene un efecto directo en el incremento de la producción de exopolisacáridos por parte de ciertos microorganismos, entre ellos *Rhodotorula mucilaginosa*, que son utilizados en la remoción de metales pesados en aguas contaminadas²⁵.

Aunque todavía no se entiende exactamente porque la presencia de metales incrementa la producción de exo-polisacáridos; se cree que se deba principalmente a una cuestión fisiológica del microorganismo²⁵. Una de las

teorías más aceptadas es que los metales pesados causan un efecto de estrés sobre los microorganismos los cuales comienzan a producir exo-polisacáridos como un sistema de protección ante la presencia de iones metálicos que son tóxicos a la célula; ya que los exo-polisacáridos contienen grupos carboxilos y aminoácidos que tienen la capacidad de quelar iones metálicos^{26, 27}. En base a esto se decidió utilizar Zn a 0.05 g/L como fuente de estrés celular, que es la mayor cantidad que se pudo agregar al medio antes de que haber problemas de disolución; y por lo tanto incrementar la producción de exo-polisacáridos en este proyecto.

A continuación se muestra una tabla comparativa con los resultados obtenidos en otras investigaciones.

Tabla 14. EPS obtenido en base a distintos factores que se utilizaron para producirlo.

Microorganismo	Fuente de carbono	Cantidad de fuente de carbono (g/L)	Tiempo de incubación	EPS obtenido (g/L)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Glucosa	20	72 h	0.650
<i>Rhodotorula Rubra</i> + <i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Lactosa	44	132 h	11.2
Consorcio microbiano de la Kombucha (<i>Saccharomyces</i> , <i>Bretanomyces</i> y <i>acetobacter</i>) ²⁸	Azúcar morena	280	144 h	2.66

Se puede observar que la cantidad de fuente de carbono y el tiempo de incubación son factores importantes, aunque también la producción de EPS depende mucho del microorganismo que se esté utilizando para producirlo; claramente apreciable por la diferencia de exo-polisacárido producido por los distintos consorcios microbianos que se muestran en la tabla anterior.

6.2 Caracterización del exo-polisacárido

Respecto a la caracterización del EPS, el espectro IR indica que existen grupos funcionales carboxilo; debido a la presencia de un pico a 1700 cm^{-1} . Si bien no se conoce que azúcares componen el exo-polisacárido, la presencia de grupos carboxilo da pie a la suposición de que haya presentes azúcares ácidos tales como ácido glucorónico, ácido galacturónico, etc²⁹.

En base a lo que se observó en el espectro IR, se dedujo que el exo-polisacárido poseía cierta capacidad reductiva, por lo que se llevó a cabo la prueba Benedict de azúcares reductores; que indicó que el EPS posee una capacidad reductiva limitada debido a la coloración verde que se obtuvo.

6.3 Producción y caracterización de nano-partículas

Debido al poco poder reductivo que mostró el exo-polisacárido, el tamaño de nano-partículas que se obtuvo es pequeño, rondando los 2 nm de diámetro. Sin embargo el tamaño óptimo de nano-partículas de plata que presentan

actividad antimicrobiana es aquel con diámetro de 20-40 nm; lo cual se observa como una absorbancia máxima a 420 nm en un barrido UV-Vis.

La siguiente figura muestra una comparación entre las nano-partículas que se produjeron utilizando EPS + glucosa y aquellas que se produjeron solamente glucosa.

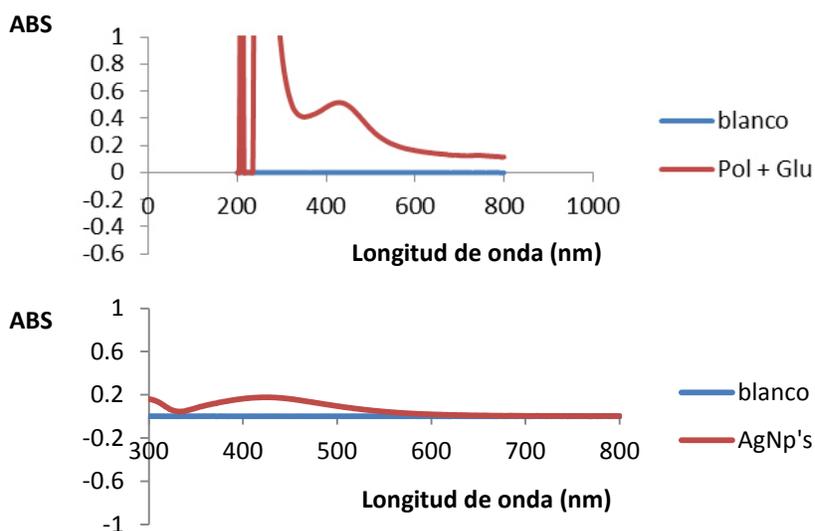


Figura 19. Comparación entre AgNp's producidas con EPS + Glucosa (arriba) y aquellas producidas con glucosa solamente (abajo).

Es por esta razón que se decidió agregar glucosa (10 mM) junto al EPS para producir partículas del tamaño deseado; lo cual se pudo lograr satisfactoriamente. Al comparar las nano-partículas producidas de esta forma con aquellas que se produjeron utilizando solamente glucosa, se puede apreciar que existe una mayor uniformidad de partículas debido a lo que se puede observar tanto en el barrido UV-Vis como en las micrografías SEM.

De esta forma, si bien el exo-polisacárido por sí mismo produce nano-partículas de tamaño pequeño y la glucosa por si misma forma nano-partículas de tamaño variado (344-550 nm); al combinar estos dos se puede lograr una uniformidad mucho mayor en el tamaño de partícula. De tal forma que el EPS ejerce cierto control sobre el tamaño de las nano-partículas que se están formando^{30,31}.

Esto se puede apreciar con la gráfica de distribución de partícula que se muestra en la figura 20; donde predominan las nano-partículas de 11-16 nm de diámetro seguidas de aquellas que tienen tamaño de 18-21 nm de diámetro. Tamaños que concuerdan con los barridos UV-Vis realizados.

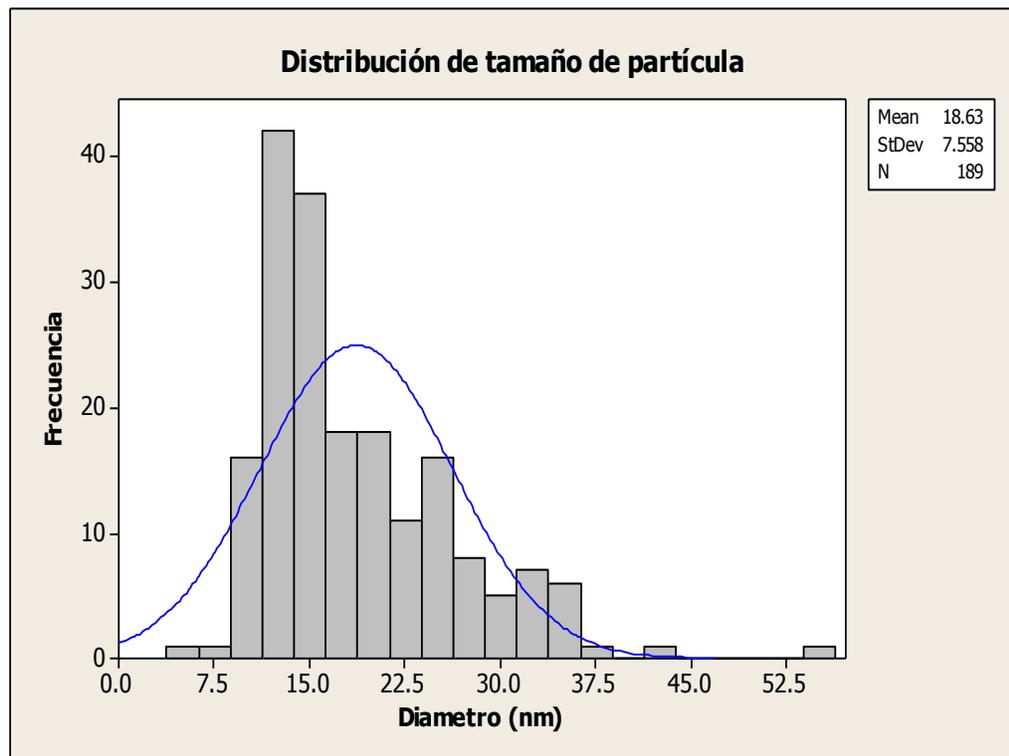


Figura 20. Gráfico de distribución de tamaño de nano-partículas de plata producidas utilizando EPS junto con glucosa como agente reductor.

Respecto a otros materiales que se han utilizado para controlar el tamaño de partícula, la siguiente figura muestra una comparativa.

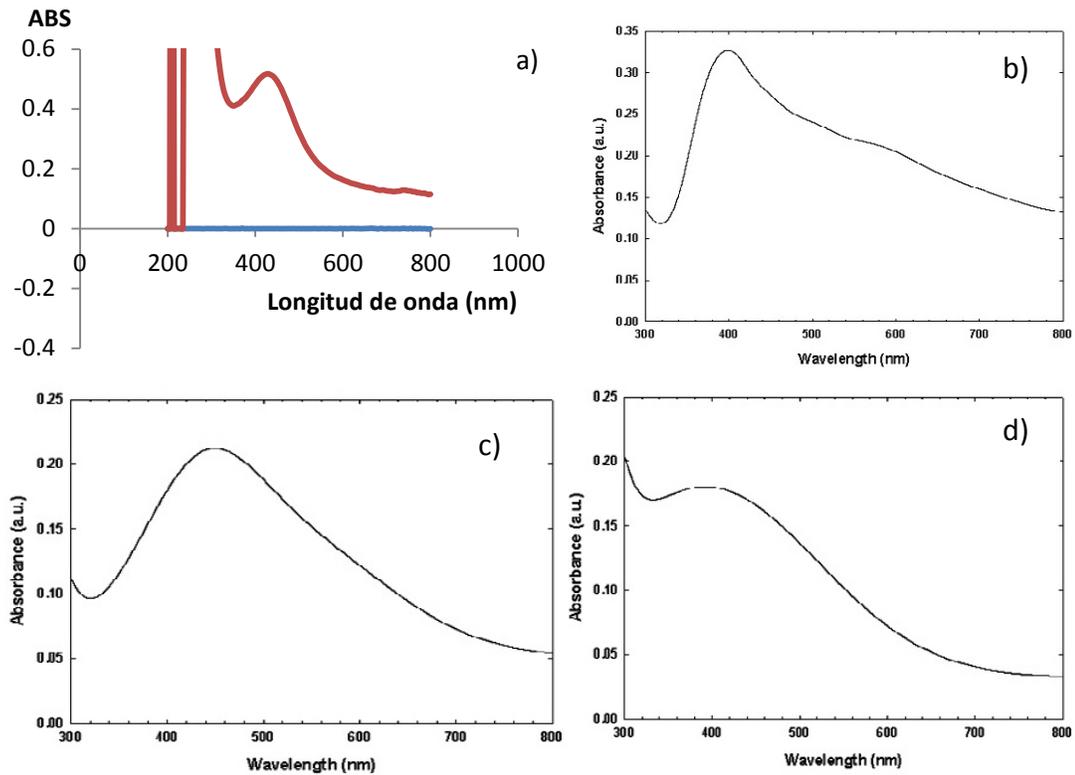


Figura 21. Distintos materiales utilizados para controlar el tamaño de partícula: a) EPS, b) Matriz de carbón, c) PVP v d) BSA

Lo que se muestra en la figura 20, es que el exo-polisacárido producido por *Rhodotorula mucilaginosa* ejerce mejor control sobre el tamaño de partícula que lo que ha sido utilizado en otros trabajos. Para esto se hace uso de Full Width at Half Maximum (FWHM) ó Anchura a Media Altura; que muestra la longitud de onda que existe (nm) a $\frac{1}{2}$ de la altura donde se muestra la máxima absorbancia. Debido a que cada tamaño de nano-partícula de plata absorbe a

distinta longitud de onda; mientras menor sea el valor de Anchura a Media Altura mayor uniformidad existe en el tamaño de partícula que se produjo.

A continuación se muestran los valores de Anchura a Media Altura obtenidos para cada material:

- EPS: 220 nm.
- Matriz de carbón: 560 nm.
- PVP: 300 nm.
- BSA: 340 nm.

Se puede apreciar claramente que el EPS que utilizado en este proyecto ejerce mejor control en el tamaño de partícula que los materiales utilizados en otros trabajos³².

Así mismo este método de combinación de EPS y glucosa muestra una mejor producción de nano-partículas que los de otros métodos donde también se utiliza un componente biológico; como lo es la biomasa de *Penicillium purpurogenum* para la producción in situ de nano-partículas de plata³². La siguiente figura muestra una comparación de los barridos UV-Vis de las AgNp's obtenidas por cada método.

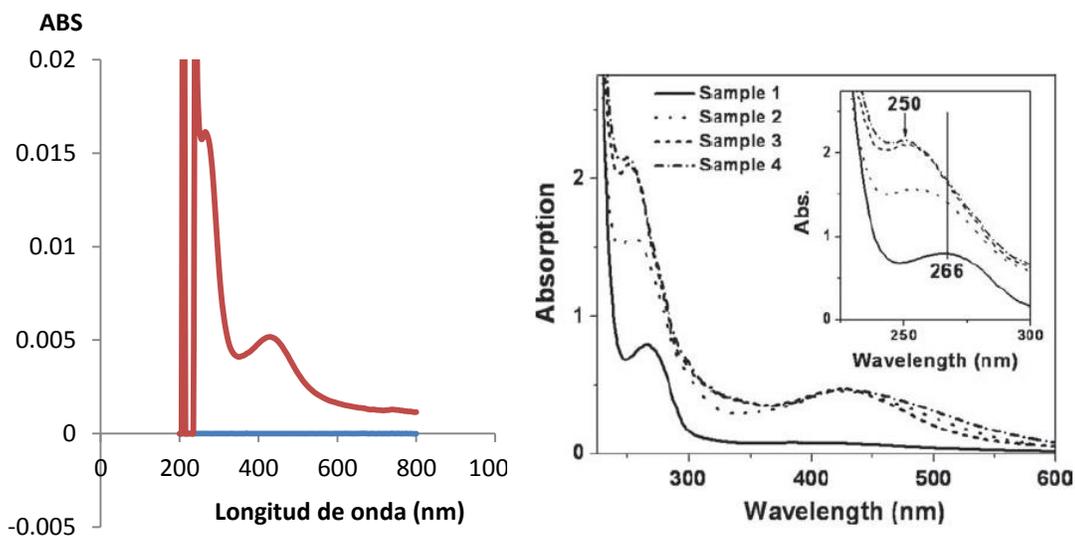


Figura 22. Síntesis de AgNp's utilizando EPS + Glucosa como agente reductor (izq) y síntesis in situ por biomasa de hongo (der).

6.4 Pruebas de actividad antimicrobiana

En las pruebas de actividad antimicrobiana se determinó que las nanopartículas que dieron un pico a 266 nm muestran lo que es un retraso en el crecimiento de la población bacteriana que mostró la mayor diferencia respecto al control a las 2 horas; donde el matraz experimental tenía el 50 % de la población bacteriana que había en el control. Todo esto a una concentración de AgNp's de 100 μ M.

En cuanto a las pruebas realizadas con aquellas partículas que presentaron un pico alrededor de 420 nm, en todas las concentraciones (50, 100 y 200 μ M) se observó una disminución de la población bacteriana respecto al control. A 50 μ M se observó un crecimiento retardado respecto al control a lo largo de las tres horas de incubación, mientras que a 100 y 200 μ M se puede hablar de efectos bacteriostáticos ya que a partir de la primera hora la población bacteriana en el matraz experimental se mantiene relativamente constante.

Similar a lo reportado en otros trabajos donde a concentraciones de 50 y 100 μM la población bacteriana se mantiene durante las primeras tres horas^{33, 34}.

Tabla 15. Comparativa entre distintos trabajos sobre los efectos antimicrobianos de nano-partículas de plata.

Autor	Tamaño de nano-partícula	Concentración de nano-partículas	Efecto observado
Daniel Barboza	422	50 μM	Crecimiento retardado
		100 μM	Indicio de bacteriostático
		200 μ	Indicio de bacteriostático
Agnihotria <i>et.al</i>	405	463 μM	Bacteriostático
		927 μM	Bacteriostático
Maiti, <i>et.al</i>	410	46.3 μM	Crecimiento retardado
		463 μM	Bactriostático

CAPÍTULO 7

7. CONCLUSIONES

- El sistema de competencia implementado con *E. coli* para incremento en la producción de EPS no fue eficiente ya que la cantidad obtenida por este medio no es considerablemente superior a lo obtenido en el control y en ocasiones es inferior.
- La optimización mediante medios de cultivo enriquecidos con glucosa y la posterior añadidura de Zn fue adecuada para lograr incrementar la producción de EPS.
- La cantidad de fuente de carbono que se agregue al medio tiene un impacto directo en la producción de EPS. Mientras mayor sea esta mayor será la producción de EPS; es decir es directamente proporcional.
- La presencia de Zn en el medio de cultivo tiene un efecto estresante sobre la célula la cual busca protegerse generando una barrera de EPS.
- El EPS por sí mismo tiene la capacidad de producir nano-partículas de plata pequeñas (2nm) debido a su limitado poder de reducción.
- El EPS muestra la capacidad de controlar el tamaño el tamaño de las partículas de plata que se forman cuando se utiliza glucosa como agente reductor, proveyendo mayor uniformidad de partícula que cuando se utiliza glucosa solamente como agente reductor.
- El EPS tiene la capacidad de recubrir y recuperar el 100% las nano-partículas de plata que se generen independientemente del método que se utilice para formarlas.

- Las nano-partículas de tamaño pequeño (máx. abs. 266 nm) retrasan el crecimiento de la población bacteriana.
- Las nano-partículas que muestran absorbancia máxima a 420 nm, tienen efectos bactericidas y bacteriostáticos sobre *E. coli* dependiendo de la concentración que se utilice.
- Si bien el EPS produce nano-partículas de tamaño pequeño, se demostró que en efecto si tiene poder reductivo y al mismo tiempo puede formar y recubrir nano-partículas de plata; por lo que se acepta la hipótesis planteada en el proyecto.

CAPÍTULO 8

8. PRESPECTIVAS

Para mejorar la producción de EPS mediante interacciones microbianas, se propone ya no buscar el antagonismo entre microorganismos como factor de estrés que genere un aumento en la producción de EPS; si no lo contrario. Esto es implementar un sistema en el que los microorganismos se beneficien mutuamente (simbiosis) o simplemente no se perjudiquen el uno al otro. Se podría intentar con co-cultivos de *R. mucilaginosa* y microorganismos del género *Pseudomonas*, el cual se sabe también produce altas cantidades de exo-polisacárido, en medios con altas concentraciones de un azúcar que sea la fuente de carbono.

También sería de interés realizar ensayos de toxicidad el EPS y nano-partículas de plata recubiertas por EPS sobre alguna línea celular de mamífero para saber si existe algún efecto adverso sobre células eucariotas por parte de alguno.

Referencias

1. S.M Purrello, R. D. (2014). Meticillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) update: New insights into bacterial adaptation and therapeutic targets. *Global Journal Of Antimicrobial Resistance*, 61-69.
2. (2013). L. Harvey B. Arnold K. A. Chris K. Monty B. Anthony P. Hidde A. Angelika S. P. Matthew, *Molecular Cell Biology* (pág 184). W.H. Freeman and Company.
3. Archana Iyer, E. B. (2013). Transposable elements in *Escherichia coli* antimicrobial resistance. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 415-423.
4. Reardon, S. (2014). Antibiotic Resistance Sweeping Developing World. *Nature*, 141-142.
5. Robert Schmieder, R. E. (2012). Insights into Antibiotic Resistance Through Metagenomic Approaches. *Future Microbiol.*, 73-89.
6. Gradmann, C. (2011). Magic bullets and moving targets: antibiotic resistance and experimental chemotherapy, 1900-1940. *Dynamis*, 305-321.
7. Pedro Eduardo Almeida da Silva, J. C. (2011). Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1417-1430.
8. Julian Davies, D. D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 417-433.
9. Rebecca R. Roberts, B. H. (2009). Hospital and Societal Costs of Antimicrobial-Resistant in a Chicago Teaching Hospital: Implications for Antibiotic Stewardship. *Clinical Infectious Diseases*, 1175-1184.
10. CDC. (2013). *Antibiotic Resistance Threats in the United States 2013*.
11. Ae Jung Huh, Y. J. (2011). "Nanobiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using materials in the antibiotics resistance era. *Journal of Controlled Release*, 128-145.
12. Fromm, K. M. (2011). Give silver a shine. *Nature Chemistry*, 970.

13. J. Ruben Morones, W. F. (2007). Environmentally Sensitive Silver Nanoparticles of Controlled Size. *Langmuir*, 8180-8186.
14. Menno L.W. Knetsch, L. H. (2011). New Strategies in the Development of Antimicrobial Coatings: The Example of Increasing Usage of Silver and Silver Nanoparticles. *Polymers*, 340-366.
15. Jose Ruben Morones, J. L. (2005). The bactericidal effect of silver. *Nanotechnology*, 2346–2353.
16. Sonja Eckhardt, P. S. (2013). Nanobio Silver: Its Interactions with Peptides and Bacteria, and Its Uses in Medicine. *Chemical Reviews*, 4708-4754.
17. Tsuji, X. T. (2010). Syntheses of Silver Nanowires in Liquid Phase. *Nanowires Science and Technology*, 25-42.
18. Chanho Kwon, B. P. (2009). Green Synthesis of Silver Nanoparticles by Sinorhizobial Octasaccharide. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 1651-1654.
19. Ganesan Sathiyarayanan, V. V. (2014). Synthesis of carbohydrate polymer encrusted gold nanoparticles using bacterial exopolysaccharide: a novel greener approach. *RSC Advances*, 22817-22827.
20. Sreejith Raveendran, A. C. (2013). Bacterial exopolysaccharide based nanoparticles for sustained drug delivery,. *Carbohydrate Polymers*, 22-32.
21. Hossein Naghili, H. T. (2013). Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Veterinary Research Forum*, 179-183.
22. Gemma Vilara, J. T.-P. (2012). Polymers and Drug Delivery Systems. *Current Drug Delivery*, 1-28.
23. Xu, T. H.-H. (2010). Synthesis and characterization of tunable rainbow colored colloidal silver. *Journal of Materials Chemistry*, 9867-9876.
24. E.D. Simova, G. F. (2004). Exopolysaccharides produced by mixed culture of yeast *Rhodotorula rubra* GED10 and yogurt bacteria (*Streptococcus thermophilus* 13a + *Lactobacillus bulgaricus* 2-11). *Journal of Applied Microbiology*, 512-519.

25. D. Purchase, L. S. (2009). Effects of temperature on metal tolerance and the accumulation of Zn and Pb by metal-tolerant fungi isolated from urban runoff treatment wetlands. *Journal of Applied Microbiology*, 1163–1174.
26. Fernando Navarrete, L. D. (2014). Response of *Xylella fastidiosa* to Zinc: Decreased Culturability, Increased Exopolysaccharide Production, and Formation of Resilient Biofilms under Flow Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 1097-1107.
27. Herbert H.P. Fang, L.-C. X.-Y. (2002). Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. *Water Research*, 4709-4716.
28. Yan Wu, Q. C. (2013). Optimization of Liquid Fermentation Process for Improved Exo-Polysaccharides Production by Kombucha ZJU1 . *Advance Journal of Food Science and Technology*, 217-224.
29. Pierre Lembre, Cécile Lorentz and Patrick Di Martino (2012). Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World, The Complex World of Polysaccharides, Dr. Desiree Nedra Karunaratne (Ed.), ISBN: 978-953-51-0819-1, Available from: <http://www.intechopen.com/books/the-complex-world-of-polysaccharides/exopolysaccharides-of-the-biofilm-matrix-a-complex-biophysical-world>
30. J. Prasad Rao, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 887-913.
31. Jose R. Morones, J. L.-B. (2005). Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*.
32. Nilotpala Pradhan, R. R. (2011). In Situ Synthesis of Entrapped Silver Nanoparticles by a Fungus—*Penicillium purpurogenum*. *Nanosci. Nanotechnol. Lett.*, 1-7.
33. Shekhar Agnihotria, S. M. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *Royal Society of Chemistry*, 3974–3983.
34. Swarnali Maiti, D. K. (2014). Antimicrobial activities of silver nanoparticles synthesized from *Lycopersicon esculentum* extract. *Journal of Analytical Science and Technology*, 1-7.