

Mtra. María Elena Contreras Garfias  
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
	26	02	2020		26	03	2020

**Datos del Alumno**

Nombre : <b>Noemi Betsabe Vázquez Tapia</b>	
Matrícula : <b>2142035650</b>	Licenciatura : <b>Química Farmacéutica Biológica</b>
Domicilio :	
Teléfono : <b>5570321450</b>	Celular : <b>5544857704</b>
Correo Electrónico : <b>noemibetsabe92@gmail.com</b>	CURP : <b>VATN920402MDFZPM08</b>

**Datos del Proyecto**

Nombre del Proyecto :							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : <b>Laboratorio de Biotransformaciones (N-201) en la Unidad Interdisciplinaria de Biotecnología</b>							
Dependencia : <b>Universidad Autónoma Metropolitana</b>							
Entidad Federativa : <b>Distrito Federal</b>							
Municipio :	Localidad :						
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	23	09	2019		26	02	2020

**PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES**

Sector: <b>1.- Educativo</b>	Tipo: <b>2.- Interno</b>
Orientación: <b>10.- Otros</b>	

**FIRMAS**

**Dra. Herminia Pérez Méndez No. Económico**

Asesor Interno  
Nombre, firma y No. Económico

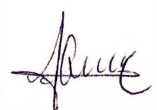


**Noemi Betsabe Vázquez Tapia**

Alumno  
Nombre, firma

**Dra. Rubria Marlen Martínez Casares No. Económico 41833**

Asesor Externo  
Nombre, firma y No. Económico



**M. en C. Alma E. Ibarra Cázares**

Vo. Bo. de la Comisión  
Nombre y firma de la persona que autoriza

**Logotipo de  
la Insitución**

México, D.F. a 09 de Diciembre del 2019

**Nombre del Jefe (a)  
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos  
Presente.**

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que el (la) alumno(a):

**Vázquez Tapia Noemi Betsabe**

Matrícula 2142035650 concluyó el proyecto de Servicio Social

Extracción de las sustancias poliméricas extracelulares de Nocardia corallina B-276 con crecimiento en medio de sales a diferentes pH

Que se realizó

en Laboratorio de Biotransformaciones (N-201) en la Unidad Interdisciplinaria de Docencia Investigación Servicio de la Universidad Autónoma Metr

Ubicado en: Calzada del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, 04960, Coyoacán, CDMX

Del 23 de septiembre del 2019 al 26 de marzo del 2020 bajo mi asesoría

Cubriendo un total de 480 horas.

ATENTAMENTE



**Dra. Rubria Marlen Martínez Casares**

Nombre y firma del asesor

Cédula profesional (**sólo asesor externo**)

**Mtra. María Elena Contreras Garfias**

c.c.p. Director (a) de la División de CBS UAM-X



Casa abierta al tiempo

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

México, D.F. a 09 de Diciembre de 2020

**DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO**  
**JEFA DEL DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**  
**PRESENTE**

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que el alumna Vázquez Tapia Noemi Betsabe con matrícula 2142035650 ha concluido el proyecto de servicio social: “Extracción de las sustancias poliméricas extracelulares de *Nocardia corallina* B-276 con crecimiento en medio de sales a diferentes pH”, perteneciente al proyecto genérico: Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos., el cual se realizó en Laboratorio de biotransformaciones (N-201) en la Unidad Interdisciplinaria de Docencia Investigación y Servicio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, del 23 de septiembre del 2019 al 26 de marzo del 2020, con una duración de 480 horas.

Agradeciendo su atención a la presente,  
queda de usted.

ATENTAMENTE

---

Dra. Rubria Marlen Martínez Casares  
No Ec. 41833

c.c.p. Mtra. María Elena Contreras Garfias. Directora de la DCBS



Casa abierta al tiempo

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

México, D.F. a 09 de Diciembre de 2020

**DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO**  
**JEFA DEL DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**  
**PRESENTE**

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que el alumna Vázquez Tapia Noemi Betsabe con matrícula 2142035650 ha concluido el proyecto de servicio social: “Extracción de las sustancias poliméricas extracelulares de *Nocardia corallina* B-276 con crecimiento en medio de sales a diferentes pH”, perteneciente al proyecto genérico: Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos., el cual se realizó en Laboratorio de biotransformaciones (N-201) en la Unidad Interdisciplinaria de Docencia Investigación y Servicio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, del 23 de septiembre del 2019 al 26 de marzo del 2020, con una duración de 480 horas.

Agradeciendo su atención a la presente,  
queda de usted.

ATENTAMENTE

---

Dra. Herminia Inés Pérez Méndez

6276



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD XOCHIMILCO**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

Nombre del proyecto.

“Extracción de las sustancias poliméricas extracelulares de *Nocardia corallina* B-276 con crecimiento en medio de sales a diferentes pH.”

ALUMNA.

Vázquez Tapia Noemi Betsabe Matrícula. 2142035650

ASESORAS.

Dra. Herminia Inés Pérez Méndez.

No Ec. 6276

Dra. Rubria Marlen Martínez Casares.

No Ec. 41833

Lugar de realización: Laboratorio de Biotransformaciones (N-201) en la Unidad Interdisciplinaria de Docencia Investigación y Servicio de la Universidad Autónoma Metropolitana.

Fecha inicio: 23 de septiembre del 2019

Fecha terminación: 26 de marzo del 2020.

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>7</b>
2.1	Sustancias poliméricas	7
2.2	Sustancias poliméricas extracelulares (SPE)	7
2.3	Importancia y aplicaciones de las SPE	10
2.4	Características de las SPE (PHA, PHB y PLA)	11
2.5	Fuentes de Obtención de las SPE	13
2.6	Importancia de las actinobacterias	14
2.7	Importancia de la <i>Nocardia corallina</i>	15
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>17</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
4.1	Objetivo general	18
4.2	Objetivos específicos	18
<b>5.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>19</b>
5.1	Crecimiento de <i>Nocardia corallina</i> B-276 a diferentes pH	19
5.1.1	Crecimiento en medio sólido de <i>Nocardia corallina</i> B-276 a pH 7 y 8.5	19
5.1.2	Crecimiento en medio líquido de <i>Nocardia corallina</i> B-276 a pH 7 y 8.5	19
5.2	Extracción de las SPE de <i>Nocardia corallina</i> B-276	20

5.2.1	Caracterización preliminar de las SPE por Cromatografía en Capa Fina (CCF)	22
5.3	Caracterización de las SPE (1-4) de <i>Nocardia corallina</i> B-276	22
5.3.1	Cuantificación de proteínas totales	22
5.3.3	Cuantificación de azúcares totales en las Biomosas y las SPE	23
5.3.2	Determinación por CCF y CLAR de los azúcares presentes en las SPE	24
5.3.2.1	Cromatografía de capa fina (CCF), para las SPE	24
5.3.2.2	Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), para las SPE	24
5.3.4	Identificación de las SPE por espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS)	25
5.3.5	Espectrometría de Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)	25
5.3.6	Resonancia magnética nuclear (RMN) $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$	25
6.	<b>RESULTADOS y DISCUSIÓN</b>	26
6.1	Crecimiento de <i>Nocardia corallina</i> B-276 a diferentes pH	26
6.1.1	Crecimiento en medio sólido de <i>Nocardia corallina</i> B-276 a pH 7 y 8.5	26
6.1.2	Crecimiento en medio líquido de <i>Nocardia corallina</i> B-276 a pH 7 y 8.5	26
6.2	Extracción de las SPE de <i>Nocardia corallina</i> B-276	27
6.2.1	Caracterización preliminar de las SPE por Cromatografía en Capa Fina (CCF)	28
6.3	Caracterización de las SPE de <i>Nocardia corallina</i> B-276	29
6.3.1	Cuantificación de proteínas totales	29
6.3.2	Determinación de azúcares presentes en las SPE	30

6.3.2.1 Cromatografía de capa fina (CCF)	30
6.3.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	32
6.3.3 Cuantificación de azúcares totales	34
6.3.4 Espectrometría de Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)	36
6.3.5 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS)	38
6.3.6 Resonancia magnética nuclear (RMN) $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$	39
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>42</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	<b>43</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>44</b>



# 1 INTRODUCCIÓN

El consumo de productos de plásticos a lo largo de los años ha producido una gran cantidad de residuos de este material, que se acumulan a través de vertederos, creando problemas ambientales considerables.<sup>1</sup> Por tal razón en los últimos años, ha aumentado la demanda de polímeros naturales (biopolímeros) para diversas aplicaciones industriales, lo que ha producido un gran interés en la búsqueda de nuevas sustancias poliméricas extracelulares (SPE).<sup>2</sup>

Los microorganismos producen biopelículas en los ecosistemas naturales como parte de su adaptación al medio, estas biopelículas son conjuntos microbianos complejos, unidos a las superficies y a una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) o exopolímeros producidos por estos microorganismos.<sup>3,4</sup> El término “biopelícula” fue mencionado y descrito por primera vez por Costerton y col.<sup>5</sup> y ha evolucionado desde entonces. Los microorganismos pueden desarrollarse como biopelículas en diferentes superficies sólidas ambientales como: medios acuáticos y terrestres, así como en tejidos vivos, dispositivos médicos y sistemas industriales.<sup>6,7</sup>

Existen numerosas características que distinguen a las células microbianas en las biopelículas. Estos incluyen, altas densidades de población, acceso a nutrientes en situaciones pobres en nutrientes o ricas en nutrientes y especialmente la presencia de una matriz de SPE.<sup>8</sup>

Las SPE confieren absorción de moléculas orgánicas e inorgánicas, mayor resistencia a los antimicrobianos y puede actuar como barrera de difusión, creando un microambiente que rodea las células para una actividad enzimática extracelular óptima.<sup>9</sup>

Las SPE de *Nocardia corallina* B-276 son relevantes ya que al tener propiedades novedosas pueden ser aplicadas en los campos alimentario, farmacéutico, biomédico y cosmético. Por lo cual, en el presente proyecto, se desarrolló una metodología para la extracción de sustancias poliméricas extracelulares (SPE)

de *Nocardia corallina* B-276 en diferentes medios (sales y peptona-carne) y a diferentes pH's (7.5 y 8.5).

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 Sustancias poliméricas

Un polímero es una sustancia constituida por moléculas caracterizadas por la secuencia de uno o varios tipos de unidades monoméricas. Un monómero se define como la sustancia capaz de formar enlaces covalentes con una secuencia de moléculas adicionales similares o distintas, siempre y cuando se tengan las condiciones óptimas en la reacción de polimerización. Estas moléculas deben distribuirse sobre un margen de pesos moleculares. Las diferencias en el peso molecular pueden atribuirse principalmente a las diferencias en el número de unidades monoméricas.

De acuerdo con el Reglamento REACH (Reglamento de la Unión Europea), un polímero se define como: una molécula que contiene una secuencia de al menos 3 unidades monoméricas con enlaces covalente con otra unidad monomérica u otro reactante.<sup>10</sup>

Mientras que los biopolímeros son producidos a partir de fuentes renovables y pueden ser completamente degradados, algunos ejemplos que cumplen con estos criterios son los poli (hidroxialcanoato)s (PHAs) y el poli (ácido láctico) (PLA), que a su vez son consideradas sustancias poliméricas extracelulares.<sup>11</sup>

### 2.2 Sustancias poliméricas extracelulares (SPE)

Las SPE son macromoléculas formadas por la polimerización de unidades idénticas o similares que se repiten dentro de la molécula y que además pueden contener sustituyentes no poliméricos de bajo peso molecular que alteran su estructura y propiedades fisicoquímicas. Por definición, las SPE se localizan sobre o fuera de la superficie celular, independientemente de cuál sea su origen, es decir, pueden ser sintetizadas en el interior celular y después ser secretadas activamente al exterior o pueden proceder de la lisis de otras células circundantes y absorción desde el ambiente exterior.<sup>12</sup>

Las variedades de SPE pueden clasificarse según dos criterios. El primero se define por la manera en que está asociado a la célula, mientras que el

segundo, deriva del método utilizado para extraer y separar las SPE de la célula, ver **Tabla 1**.<sup>13</sup>

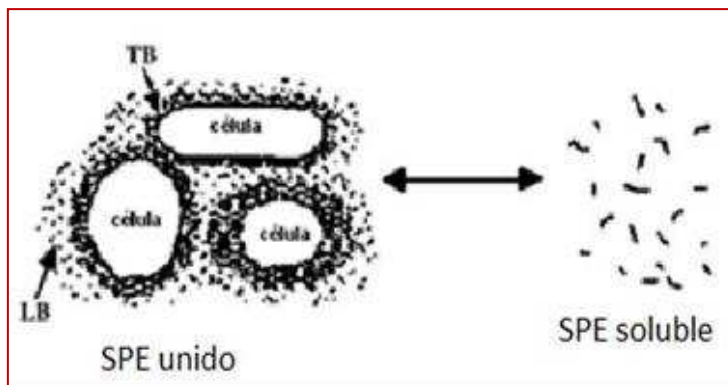
**Tabla 1.** Clasificación de las SPE de acuerdo con: la asociación a la célula y el estado fisicoquímico.

<b>Clasificación</b>	<b>SPE</b>	<b>Definición</b>
<b>Asociación a la célula</b>	Mucosa	Son los polímeros presentes en los sobrenadantes luego de centrifugar la biomasa. Se encuentra en forma soluble.
	Capsular	Son los polímeros unidos permanentemente a la membrana celular.
<b>Estado fisicoquímico</b>	Soluble	Son secretados por la célula y se encuentran en el ambiente circundante. Los componentes mayoritarios son las macromoléculas, coloides y mucosas.
	Unido	Está firmemente unido a la célula. Los componentes mayoritarios son los polímeros de cápsula, geles condensados, polímeros débilmente unidos y materia orgánica agregada.

Las SPE unidas a la célula se encuentran en las cercanías de la pared celular, mientras que la SPE soluble abarca a los polímeros que se encuentran disueltos en el medio. Generalmente, estos dos tipos de SPE se pueden separar por centrifugación, quedando en el sobrenadante la SPE soluble y en el pellet de las células la SPE unido.

La estructura de la SPE unido puede a su vez ser clasificada en: firmemente unido a las células (por sus siglas en inglés TB-EPS) y débilmente unido a las células (por sus siglas en inglés LB-EPS). El TB-EPS se encuentra estrechamente unido a la superficie de la célula mediante los grupos carboxilo dentro de la estructura polimérica y los hidroxilos presentes en los lipopolisacáridos. La capa unida débilmente a la pared celular (LB-EPS) forma

una cápsula difusa alrededor de la célula y puede ser fácilmente perdida en el medio de cultivo, ver **Figura 1**.<sup>14</sup>



**Figura 1.** Estructuras de las SPE unidas fuertemente a la célula (TB) y ligeramente unidas (LB).

La estructura química de las SPE varía y por lo tanto, puede incluir moléculas orgánicas de alto peso molecular, tales como polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y una proporción menor de otros componentes no poliméricos de bajo peso molecular.<sup>15</sup> Los constituyentes más frecuentes de las SPE se muestran en la **Tabla 2**.<sup>16</sup>

**Tabla 2.** Componentes principales de las SPE.

Componentes principales		Tipo de puente
<b>Polisacáridos</b>	Monosacáridos, ácidos urónicos, amino-azúcares	Glicosídicos
<b>Proteínas (polipéptidos)</b>	Amino-ácidos	Péptidos
<b>Ácidos nucleicos</b>	Nucleótidos	Fosfodiéster
<b>Fosfolípidos</b>	Ácidos grasos, glicerol, fosfatos, azúcares	Ésteres
<b>Substancias húmicas</b>	amino-ácidos, azúcares simples, compuestos fenólicos	Éter, tipo C-C Péptidos

### 2.3 Importancia y aplicaciones de las SPE

Los plásticos biodegradables son obtenidos a partir de las SPE de diferentes orígenes naturales incluyendo las fuentes microbianas, Los PHAs son los únicos bioplásticos completamente sintetizados por microorganismos.<sup>17</sup>

La importancia del desarrollo de plásticos biodegradables es debido a que la gran mayoría de los materiales plásticos producidos alrededor del mundo son degradables, lo que implica que su proceso de desecho represente un gran problema para la sociedad y para el medio ambiente, además de que este problema crece día a día de manera exponencial. Los bioplásticos poseen propiedades físicas y químicas similares o mejores a las de los plásticos sintéticos convencionales.<sup>18</sup> Estos polímeros ambientalmente degradables son una muy buena alternativa que está reemplazando a los polímeros de origen petroquímico.

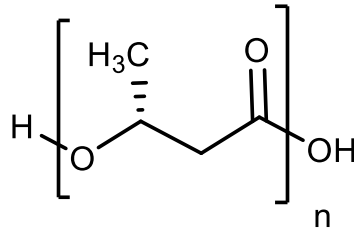
Además, las SPE son utilizadas en: productos biotecnológicos, en la acuicultura y en la farmacéutica como: agentes espesantes, estabilizantes, aglutinantes, bioemulsionantes, biosurfactantes, biosorbentes, biofloculantes, agentes antiincrustantes, antivirales, inmunoestimulantes e inmunomoduladores.<sup>19</sup> Las diversas utilidades dependen de las propiedades físicas y dinámicas mostradas por las SPE como: la adsorción, viscosidad, solubilidad y biodegradabilidad las cuales varían dependiendo de su composición macromolecular (polisacáridos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, sustancias húmicas) y conformación estructural.<sup>20</sup>

Los PHA y PHB son SPE microbianas que tienen buenas características para la producción de empaques.<sup>21</sup> Son compuestos termoplásticos, compatibles y completamente biodegradables, enantioméricamente puros, no tóxicos, insolubles en agua, inertes, estables al aire y presentan buena procesabilidad en equipo.<sup>22</sup> Tienen además potencial uso en ortopedia, en sistemas de entrega cardiovascular, así como en la producción de microesferas para sistemas de entrega de fármacos. Sin embargo, aún se deben mejorar los procesos de producción para obtener productos competitivos en el mercado.<sup>23</sup>

## 2.4 Características de las SPE (PHA, PHB y PLA)

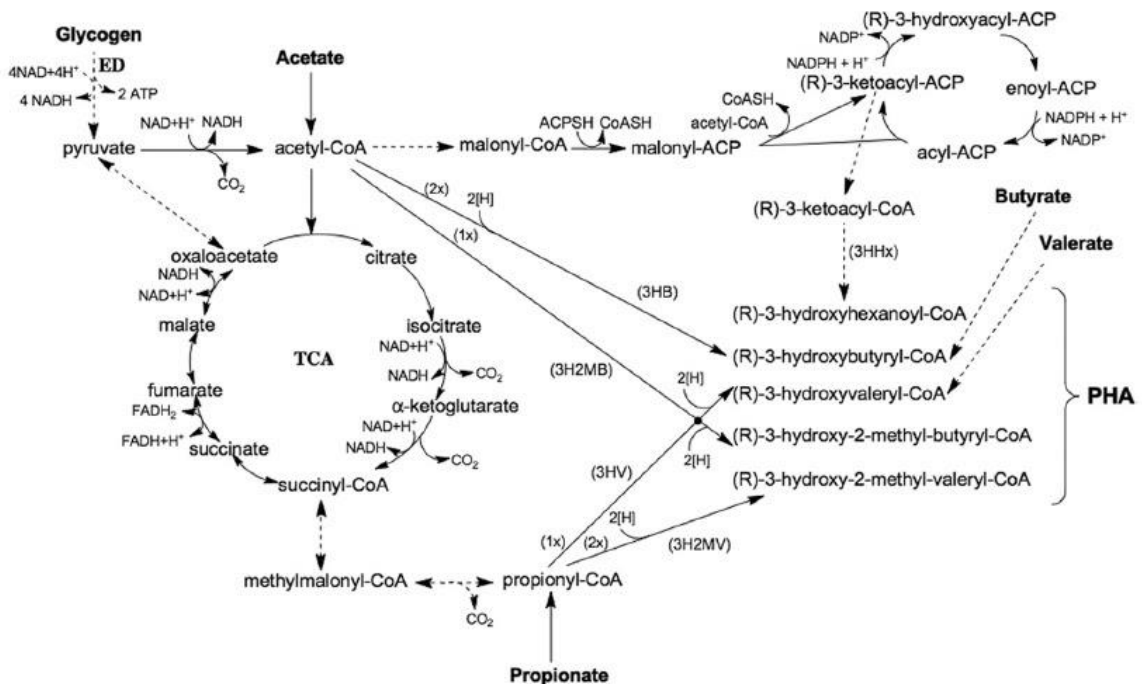
Los biopolímeros PHA y PLA son los más utilizados en la actualidad debido a sus excelentes propiedades físico-mecánicas y facilidad de biodegradarse.<sup>18</sup>

La composición monomérica de los biopolímeros de PHA (**Figura 2**) es muy variada, depende de las rutas metabólicas por las cuales fueron sintetizados y por la fuente de carbono externa que se usa como materia prima para dicha ruta.



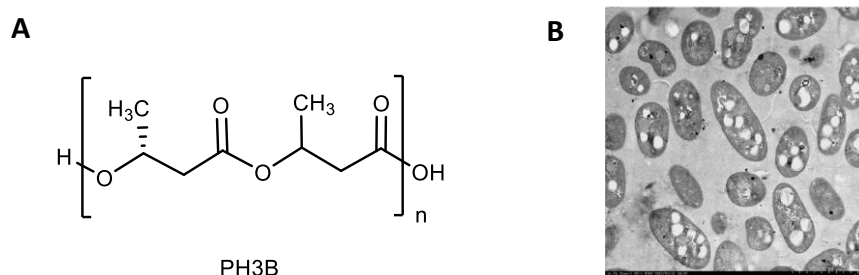
**Figura 2.** Estructura de los PHA's

Proviene básicamente de tres vías metabólicas: la degradación de azúcares mediante la obtención de Acetil CoA (**Esquema 1**), la degradación de ácidos grasos ( $\beta$ -oxidación) y/o biosíntesis de ácidos grasos.<sup>24</sup>



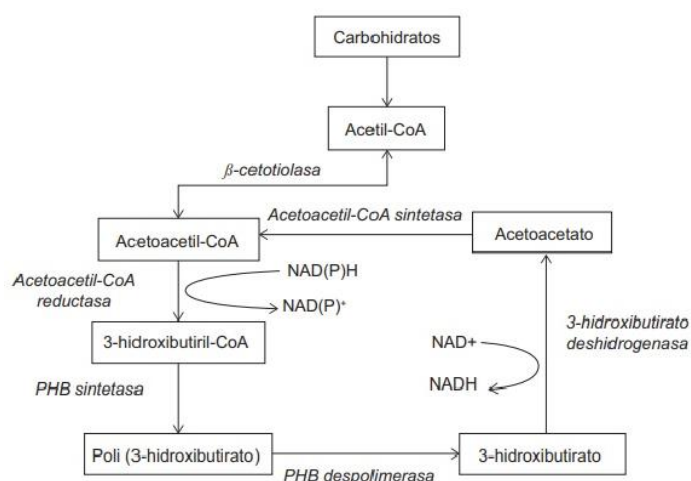
**Esquema 1.** Ruta metabólica para la síntesis intracelular de los PHA a partir de glucosa.

El poli-3-hidroxi-3-butirato (PH3B, **Figura 3A**) es el miembro más común de la familia de poliésteres de polihidroxicanoato (PHA) que forman cuerpos de inclusión en una amplia variedad de microorganismos, ver **Figura 3B**. Como producto intracelular, su separación del resto de la célula es un factor importante en la viabilidad económica y en su producción comercial, el cual tiene buenas propiedades mecánicas, físicas y químicas.<sup>24</sup>



**Figura 3.A)** Estructura de los PH3B y **B)** Micrografía electrónica de microorganismo (*P. mandelii* CBS-1) que contiene gránulos de PH3B.

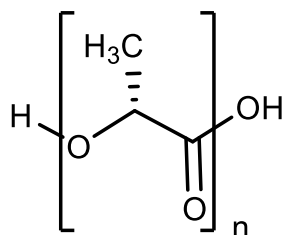
Existen numerosos métodos para la obtención de esta familia de productos a partir de carbohidratos(**Esquema 2**) mediante mecanismos biológicos o enzimáticos, especialmente para la obtención del homopolímero, poli-3-hidroxi-3-butirato, cuya masa molar suele estar comprendida entre 790.000 y 960.000 g.mol<sup>-1</sup>.<sup>25</sup>



**Esquema 2.** Ruta metabólica para la síntesis y degradación intracelular de PH3B a partir de carbohidratos. Se indican las principales enzimas implicadas en el proceso.



Por otra parte, el PLA es un polímero sintético termoplástico de la familia de los alfa hidroxiácidos o poliésteres alifáticos. El ácido láctico o 2-hidroxiopropiónico es un ácido orgánico que se halla en la naturaleza en forma de *L* (+) o *D* (-) ácido láctico (**Figura 4**). Es un material altamente versátil, que se hace a partir de recursos renovables al 100 % como: el maíz, la remolacha, el trigo, y otros productos ricos en almidón, además de residuos lignocelulósicos y en menor cantidad son obtenidos de algunos microorganismos.<sup>26</sup>



**Figura 4.** Estructura del PLA

### 2.5 Fuentes de Obtención de las SPE

Los biopolímeros naturales provienen de cuatro fuentes diferente como son: animal (colágeno/gelatina), marino (quitina/quitosan), plantas (lípidos y grasas e hidrocoloides: proteínas y polisacáridos) y microbiano (polihidroxiálcanoatos (PHA,) / ácido poliláctico (PLA)).

Los polihidroxiálcanoatos (PHA) son polímeros de hidroxialcanoatos, que se acumulan como carbono y/o material de almacenamiento de energía en varios microorganismos, generalmente bajo la condición de limitación nutricional en elementos como: N, P, S, O, Mg y en presencia de exceso de fuente de carbono. A su vez los microorganismos pueden acumular biopolímero hasta en un 90% de su peso seco. Se sabe que más de 300 microorganismos diferentes sintetizan y acumulan PHA intra y extracelularmente, algunos ejemplos se muestran en la **Tabla 3.**<sup>27</sup>

**Tabla 3.** Producción de PHA a partir de diferentes fuentes de carbono y cepas microbianas.

Microorganismo	Fuente de carbono	Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	PHA	
				g/L	%
<i>Alcaligeneslatus</i>	Sacarosa	18	143	71.5	50
<i>Azotobacterchroococcum</i>	Almidón	70	54	24.8	46
<i>Azotobactervinelandii</i>	Sacarosa	47	40	31.9	79.8
<i>Bacilluscereus EGU3</i>	Glucosa	20	0.8	0.5	66.6
<i>Methylobacteriummorganophilum</i>	Metanol	70	250	130	52
<i>Ralstoniaeutropha</i>	Glucosa	50	164	124.6	76
<i>Ralstoniaeutropha</i>	Glucosa/propiónico	46	158	116.9	74
<i>Ralstoniaeutropha</i>	Tapioca hidrolizada	59	106	61.4	58
<i>Ralstoniaeutropha</i>	Glucosa	74	281	230.4	82

Para el cultivo de bacterias con producción de PHA asociada al crecimiento, se pueden alcanzar productividades altas en un sistema alimentado en una sola etapa (proceso por lotes). La estrategia de alimentación es muy importante para obtener una densidad celular alta, se pueden usar fuentes de nitrógeno complejas para mejorar el crecimiento.<sup>27</sup>

## 2.6 Importancia de las actinobacterias en la producción de las SPE

Entre los diversos microorganismos industrialmente importantes y productores de biopolímeros se encuentran las actinobacterias. Las cuales son relevantes debido a la capacidad de producir una amplia gama de metabolitos secundarios bioactivos como: antibióticos, agentes antitumorales, agentes inmunosupresores,

enzimas, cosméticos, vitaminas, materiales nutricionales, herbicidas, pesticidas y biopolímeros.<sup>22</sup>

Las actinobacterias pertenecen a un grupo de bacterias muy diverso que se encuentran distribuidas en distintos ambientes en los cuales desempeñan, una función ecológica importante descomponiendo la materia orgánica del suelo. Estas bacterias se describen como microorganismos Gram positivos, en su mayoría aerobias, algunos grupos presentan desarrollo y crecimiento unicelular, aunque un buen número de especies presentan crecimiento micelar filamentoso formado por hifas enramadas no septadas.<sup>24</sup>

*Nocardia* es una actinobacteria que tiene un gran interés debido a sus capacidades inusuales para catalizar transformaciones y degradaciones de varias sustancias hidrófobas. Los miembros de estas bacterias también pueden sintetizar y acumular polihidroxicanoatos (PHA) después del cultivo en diferentes fuentes de carbono en condiciones limitantes de nitrógeno.<sup>25</sup>

#### 2.7 Importancia de *Nocardia corallina* B-276 en la producción de las SPE

Las especies de *Nocardia corallina* son bacilos grampositivos aerobios parcialmente acidorresistentes. Dentro del género la formación de filamentos y la ramificación están muy desarrolladas. Las especies de *Nocardia corallina* producen filamentos profundos y aéreos, también denominados hifas o micelios, de alrededor de 1  $\mu\text{m}$  de ancho. Las células de los filamentos profundos se separan en formas de rosario y los filamentos aéreos experimentan fragmentación para producir células similares a esporas unicelulares que se dispersan y forman aerosoles con facilidad.<sup>26</sup>

Las paredes de las cepas de *Nocardia corallina* poseen ácidos micólicos, denominados ácidos nocárdicos. Los ácidos micólicos son ácidos grasos largos  $\beta$ -hidroxilados y  $\alpha$ -ramificados, por lo común saturados o monoinsaturados. Los ácidos nocárdicos tienen alrededor de 50 carbonos de largo.

*Nocardia corallina* B-276 es un microorganismo capaz de catalizar una gran gama de reacciones como: oxido-reducciones, esterificaciones, hidrólisis, etc.<sup>26,30</sup> Las cuales son importantes en los procesos de biosíntesis de las sustancias poliméricas extracelulares.

El que presente estas actividades enzimáticas, aunado a que otras especies del mismo género han demostrado producir diferentes SPE, nos permiten inferir que *Nocardia corallina* B-276 será productora de las SPE.

### 3 JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de polímeros sintéticos es considerado uno de los grandes avances del siglo XX, debido a la multiplicación de sus posibilidades de uso, no solo en la industria sino en la vida cotidiana.<sup>27,28</sup> Sin embargo, estas ventajas pueden ser sus peores inconvenientes. La alta resistencia a la corrosión, al agua y a la descomposición bacteriana los convierte en residuos difíciles de eliminar y, consecuentemente, en un grave problema ambiental. Por ejemplo, el polietileno y el polipropileno (bolsas plásticas) pueden tardar hasta 500 años en descomponerse.<sup>29</sup> La versatilidad de este material ha ocasionado un incremento de su consumo y, por lo tanto, de la contaminación; sin embargo, el reciclado es una solución sobre el residuo ya generado, pero no es una alternativa efectiva para todos los plásticos. Los biopolímeros han sido una solución desde el origen del problema por su fácil descomposición.<sup>30</sup> Por lo cual la extracción de las sustancias poliméricas extracelulares de *Nocardia corallina* B-276 usando medio de sales a diferentes pH, es una posible opción para su producción en biopolímeros.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Extracción de las sustancias poliméricas extracelulares de *Nocardia corallina* B-276 usando medio de sales a diferentes pH.

### 4.2 Objetivos específicos

- 1.- Crecimiento de *Nocardia corallina* B-276 en medio de Sales a diferentes pH
- 2.- Extraer las sustancias poliméricas extracelulares por el método de centrifugación directa.
- 3.- Cuantificación de proteínas y azúcares totales mediante técnicas analíticas.
4. Análisis de azúcares por CLAR.
- 5.- Identificación de las sustancias poliméricas extracelulares mediante UV-Vis, IR-TF y técnicas microscópicas.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Crecimiento de *Nocardia corallina* B-276 a diferentes pH.

#### 5.1.1 Crecimiento en medio sólido de *Nocardia corallina* B-276 a pH 7 y 8.5

El crecimiento se llevó a cabo sembrando por estría masiva *Nocardia corallina* B-276 en cajas Petri estériles con dos diferentes medios:

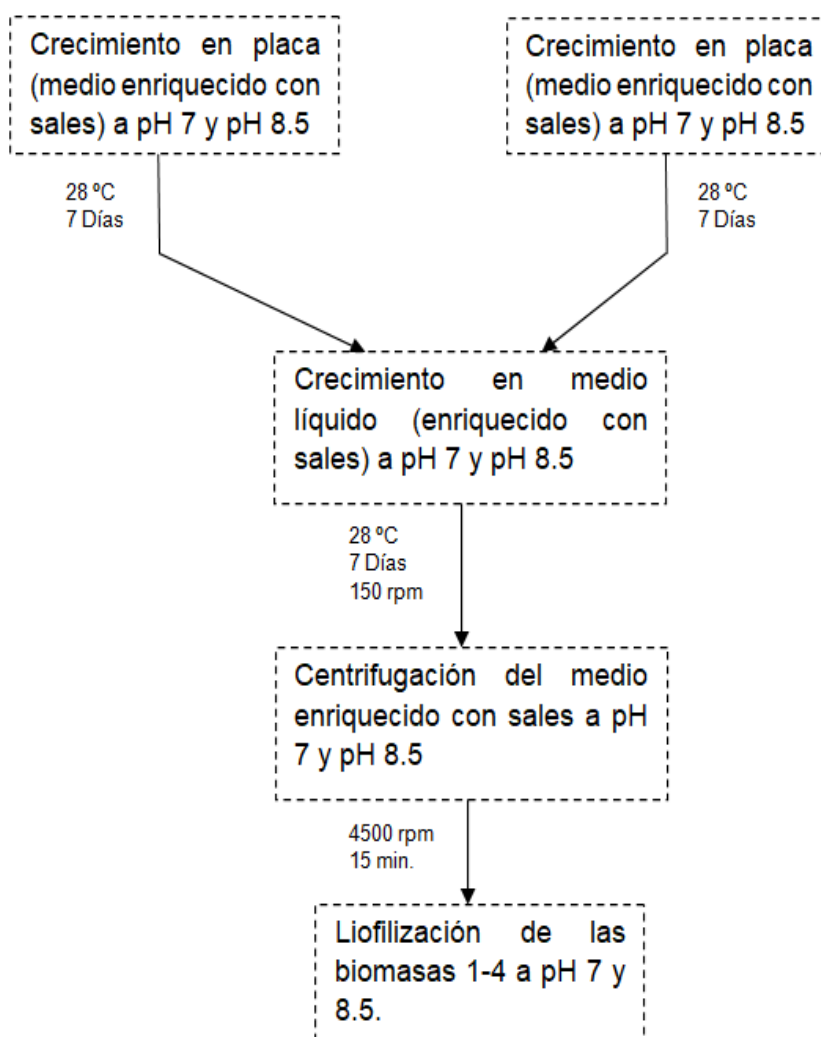
- a) En medio enriquecido con sales (glucosa 2.00 g/L, extracto de levadura 1.00 g/L, sulfato ferroso hepta hidratado 0.05 g/L, bifosfato de potasio 1.74 g/L, sulfato de amonio 2.00 g/L, sulfato de magnesio 1.50 g/L, agar 12.00 g/L), en agua destilada, (S).
- b) En medio peptona-carne (extracto de carne 3 g/L, peptona 5 g/L y agar 15 g/L), en agua destilada, (P).

El pH de los medios fueron ajustados con soluciones de potasa a 1%, 10%, 50%, fueron esterilizados a 120°C, colocados en cajas Petri hasta solidificarse, se realizaron pruebas de esterilidad de 24 horas a 37°C. Se sembró mediante estría masiva *Nocardia corallina* B-276 en los medios seleccionados (S1, 7.0, S2, 8.5, P3, 7.0 y P4, 8.5) e incubados durante una semana a 28-30°C.<sup>29</sup>

#### 5.1.2 Crecimiento en medio líquido de *Nocardia corallina* B-276 a pH 7 y 8.5

En matraces Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 125 mL del medio líquido enriquecido con sales (glucosa 2.00 g/L, extracto de levadura 1.00 g/L, sulfato ferroso heptahidratado 0.05 g/L, bifosfato de potasio 1.74 g/L, sulfato de amonio 2.00 g/L, sulfato de magnesio 1.50 g/L,) a pH de 7 y 8.5, se esterilizaron a 120°C. Se inocularon con la cepa de *Nocardia corallina* B-276, (con crecimiento en placas de agar con los medios (S1, S2, P3, y P4), se incubaron a 28-30°C, 150 rpm durante 7 días. Los medios se centrifugan a 4,500 rpm por 15 min.<sup>25</sup> Las biomasas obtenidas fueron dializadas (para eliminar metabolitos y sales de bajo peso molecular) usando una membrana de celulosa de 33 mm (Sigma-Aldrich) en un volumen de 60 mL de agua destilada durante 24 horas a

4°C. Posteriormente fueron liofilizadas.<sup>29</sup> Se clasificaron como: Biomasa 1 (S1), Biomasa 2 (S2), Biomasa 3 (P3) y Biomasa 4 (P4), ver **Diagrama 1**.



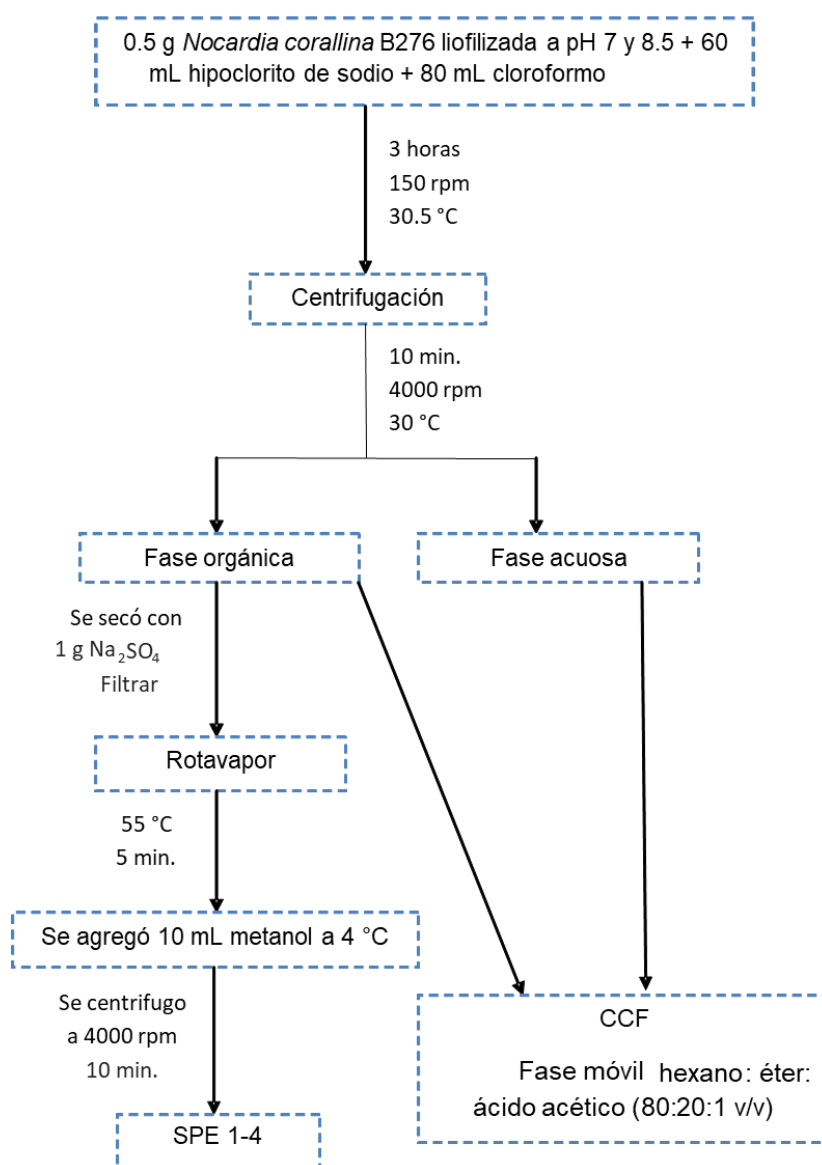
**Diagrama 1.** Crecimiento en placa y medio líquido a pH de 7 y 8.5 para *Nocardia corallina* B-276.

## 5.2 Extracción de las SPE de *Nocardia corallina* B-276

Se trataron 0.5 g de c/u de las biomazas (1-4) de *Nocardia corallina* B-276 con 60 mL de hipoclorito de sodio (30% v/v en agua) y 80 mL de cloroformo.<sup>30</sup> La mezcla obtenida fue tratada a  $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$  durante 180 min en un agitador orbital a 150 rpm y luego centrifugada a 4000 rpm durante 10 min. La fase superior acuosa contiene hipoclorito de sodio y todo el material celular y la fase inferior corresponde a la solución de PHA en cloroformo. Se separó la fase orgánica, se



adiciono sulfato de sodio anhidro, se filtra y se llevó a sequedad a presión reducida (rotavapor), el precipitado obtenido se resuspende con 10 mL de metanol a 4°C, se centrifuga a 4000 rpm por 10 min. Los precipitados (SPE1-4) se guardaron en refrigeración para su posterior análisis,<sup>31</sup> ver **Diagrama 2**.



**Diagrama 2.** Extracción de las SPE de *Nocardia corallina* B-176

### 5.2.1 Caracterización preliminar de las SPE por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Se realizó una CCF a las fases (acuosa, para verificar la extracción de las SPE 1-4) y a la orgánica, para definir el perfil preliminar, se utilizó una placa de sílica gel 60 F254 de 5x10cm, se eluyó con hexano: éter: ácido acético (80:20:1 v/v), se reveló con luz UV y cámara de yodo, calculando el factor de retención ( $R_f$ ) de los componentes.<sup>32</sup>

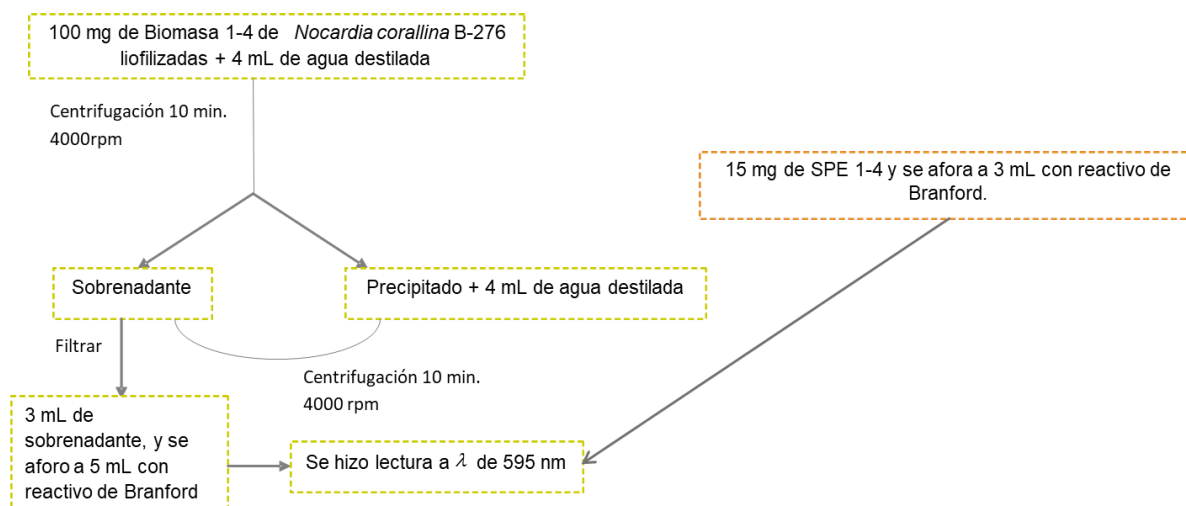
## 5.3 Caracterización de las SPE (1-4) de *Nocardia corallina* B-276

### 5.3.1 Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación se realizó por el método de Bradford, utilizando albúmina sérica bovina (ASB) como estándar. Se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de ASB (2.5, 5, 10, 20 y 30  $\mu\text{g/mL}$ ), determinando la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 595 nm, graficando la absorbancia vs la concentración.<sup>33</sup>

Para la preparación de las muestras fueron pesados 100 mg de c/u de las biomasas (1-4) de *Nocardia corallina* B-276, se agregaron 4 mL de agua destilada (25 mg de células/mL). Se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos el sobrenadante se recolectó, el procedimiento fue realizado nuevamente juntando los volúmenes del sobrenadante (8 mL), de los cuales fueron tomados 3 mL y aforados a 5 mL con el reactivo de Bradford (15 mg de células/mL), midiendo la absorbancia de cada muestra a  $\lambda$  de 595 nm.

De las SPE (1-4) se pesaron 15 mg y aforaron a 3 mL con Bradford (15 mg de SPE/mL) y se midió la absorbancia a  $\lambda$  de 595 nm.<sup>34</sup> **Diagrama 3.**



**Diagrama 3.** Cuantificación de proteínas totales en muestras liofilizadas de *Nocardia corallina* B-276.

### 5.3.3 Cuantificación de azúcares totales en las Biomosas y las SPE

Se realizó mediante la técnica del fenol-sulfúrico, utilizando solución de glucosa como estándar. Se prepara una solución stock de glucosa de 200 µg/mL, se hacen diluciones para obtener las concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg/mL. En tubos de ensayo se colocó 2 mL de las soluciones de las diferentes concentraciones, se les adiciono 1 mL de fenol al 5% p/v, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente (aproximadamente 30 min). Se determinó obtenido la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm.<sup>35</sup>

Se pesaron 100 mg de de c/u de las biomosas (1-4) de *Nocardia corallina* B-276, se agregaron 5 mL de agua destilada (20 mg/mL). Posteriormente se tomaron alícuotas de 100 µL y se afora a 5 mL (0.4 mg/mL) de agua destilada, se tomó una alícuota de 100 µL, se les adiciono 1 mL de fenol al 5%, y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm.<sup>36</sup>

Para la determinación de los azúcares totales de las SPE, se hidrolizaron 30 mg de las SPE (1-4) con 1 mL de ácido sulfúrico 2 M a 90°C durante 3 horas, posteriormente se neutralizaron con una solución sobresaturada de NaHCO<sub>3</sub> y se filtraron. Se midieron 0.5 mL de los filtrados de las SPE, se les adiciono 1 mL de fenol al 5%, y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm.<sup>36</sup>

### 5.3.2 Determinación por CCF y CLAR de los azúcares presentes en las SPE.

Se tomaron 0.5 mL de los filtrados de las SPE (1-4) hidrolizadas, se mezclaron con 0.5 mL de la solución de acetonitrilo: agua (80:20) para su análisis por CCF y CLAR.

#### 5.3.2.1 Cromatografía de capa fina (CCF), para las SPE

Para el análisis por CCF de las SPE y sus estándares (21 estándares de azúcares) se utilizó una placa de gel de sílice, la fase móvil una mezcla de butanol: ácido acético: agua (2:1:1), se observaron con la lampara ultravioleta (UV)  $\lambda$  a 254nm, las placas posteriormente se revelaron con una solución etanólica de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% (v/v) se calentaron a 120°C de 3 a 5 minutos.<sup>25</sup>

#### 5.3.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), para las SPE

Para el análisis por CLAR Agilent 1100, se llevó a cabo usando una columna Phenomenex Luna NH<sub>2</sub> (150 x 3.0 mm, 5 $\mu$ m) usando como fase móvil acetonitrilo: agua (80:20) con detector de índice de refracción y UV ( $\lambda$  = 190 a 400 nm) a 40°, 10 $\mu$ L de inyección y un flujo de 0.5 mL/min; se comparó contra 21 estándares de azúcares.

#### 5.3.4 Identificación de las SPE por espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS)

Se midieron 100  $\mu\text{L}$  de las SPE (1-4) hidrolizadas y se aforaron a 5 mL con agua, se realizó un barrido de 190-400 nm y fueron comparadas con un estándar de glicerol.<sup>37</sup>

#### 5.3.5 Espectrometría de Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

Para la determinación de los grupos funcionales de los polímeros, las SPE(1-4) fueron disueltas en cloroformo y depositadas sobre la celda de un espectrómetro de infrarrojo "SpectrumBX" FT-IR de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>38</sup>

#### 5.3.6 Resonancia magnética nuclear (RMN) $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$

Los espectros de resonancia magnética nuclear, de las SPE (1-4) fueron realizados a 600 MHz ( $^1\text{H}$ -RMN) y 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ -RMN) en un espectrómetro Agilent DD2-600, usando trimetilsilano como referencia interna y cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como disolvente. Aproximadamente 10 mg de las SPE fueron usados para cada análisis. Los desplazamientos químicos ( $\delta_x$ ) fueron reportados en partes por millón (ppm).<sup>39</sup>

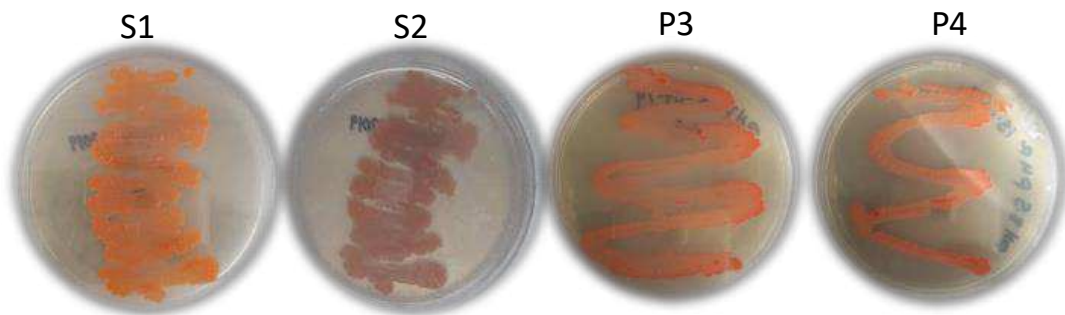
## 6. Resultados y Discusión

### 6.1 Crecimiento de *Nocardia corallina* B-276 a diferentes pH.

#### 6.1.1 Crecimiento en medio sólido de *Nocardia corallina* B-276 a pH 7 y 8.5

El crecimiento en el medio sólido se realizó con dos medios diferentes: el medio enriquecido con sales se les nombro: "S1" para el pH 7 y "S2" para el pH 8.5 y en peptona-carne "P3" para el pH 7 y "P4" para el pH 8.5.

Se observó buena adaptabilidad y crecimiento en ambos medios en los pH's 7 y 8.5. *Nocardia corallina* presento una coloración anaranjada en ambos pH's (S1, P3 y P4) y en S2 una coloración coral. Los medios a pH 8.5 (S2 y P4) presentaron una consistencia butirosa y mucoide y con mayor adhesión al medio, esto es atribuido a una mayor presencia de ácidos micólicos, ver **Figura 5**.



**Figura 5.** Crecimiento en medio sólido de *Nocardia corallina* B-276. S1 y S2: medio enriquecido con sales; P3 y P4: medio peptona-carne.

#### 6.1.2 Crecimiento en medio líquido de *Nocardia corallina* B-276 a pH 7 y 8.5

Las cantidades obtenidas de biomasa en peso húmedo y peso seco de *Nocardia corallina* B-276, después de 7 días de fermentación se muestran en la **tabla 4**.

**Tabla 4.** Rendimientos en peso húmedo y peso seco, en los diferentes pH's y medios.

Medio		Biomasa peso húmedo	Biomasa peso seco
Enriquecido con sales	S1	11.82 g	1.14 g
	S2	20.89 g	3.49 g
Peptona carne	P3	16.85 g	2.79 g
	P4	26.16 g	4.88 g (100%)

Se obtuvo una mayor cantidad(%) en la biomasa con el medio de peptona-carne a pH 8.5 (P4), ya que para P3 obtuvo un 12%, S1 un 48% y S2 un 10% menos que P4.

#### 6.2 Extracción de las SPE de *Nocardia corallina* B-276

Después de la extracción, las SPE obtenidas fueron pesadas y sus rendimientos se muestran en la **tabla 5**.

**Tabla 5.** Pesos de las SPE en diferentes medios de crecimiento y pH

Medio		SPE (1-4)
Enriquecido con sales	S1	0.76 g
	S2	0.05 g
Peptona-carne	P3	0.51g
	P4	0.24 g

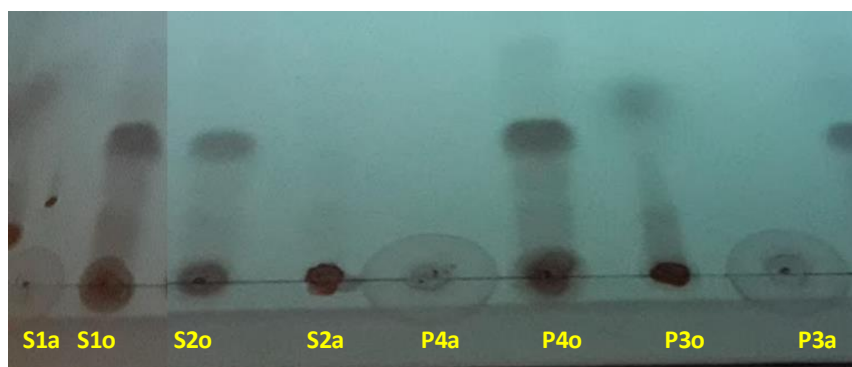
En los medios de crecimiento con pH's 8.5 (S2 y P4) se obtiene mayor cantidad de biomasa, sin embargo, los gramos obtenidos de las SPE son bajos sobre todo en el medio de sales (S2). Esto se puede atribuir que a pH 8.5 la bacteria utiliza la fuente de carbono y nutrientes para su crecimiento y en la producción de ácidos micólicos, lo que podría disminuir la producción de SPE.

Comparando el medio de peptona-carne a pH 8.5 (P4) vs 7.0 (P3), se puede observar que la producción de SPE se duplica únicamente al disminuir el pH del medio.

En los medios de crecimiento a pH 7 (P3 y S1) se obtienen menor cantidad de biomasa, pero mayor cantidad de sustancias poliméricas, sobre todo en el medio enriquecido con sales (S1), ya que en este medio se tiene una mayor cantidad de fuente de nitrógeno lo que contribuye a mejorar la producción de las SPE.<sup>40</sup>

### 6.2.1 Caracterización preliminar de las SPE por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Se realizó una cromatografía en capa fina de las SPE extraídas (orgánica y acuosa). En la fase acuosa hay compuestos muy polares que no eluyen y se quedan en el punto de aplicación, mientras que en la fase orgánica se observan diferentes SPE, ver **Figura 6**.



**Figura 6.** Cromatografía en capa fina para fase orgánica (o) y fase acuosa (a) para los cuatro medios utilizados.

Se observa más de un componente en las diferentes fracciones orgánicas en los 4 medios de obtención, los factores de retención (Rf) de las SPE se muestran en la **tabla 6**. Al revelar la placa el compuesto con mayor intensidad en los medios S1, S2 y P4 tiene un Rf de 0.22 y para P3 el Rf fue de 0.35.

**Tabla 6.** Factores de retención de la fase orgánica (Rf).

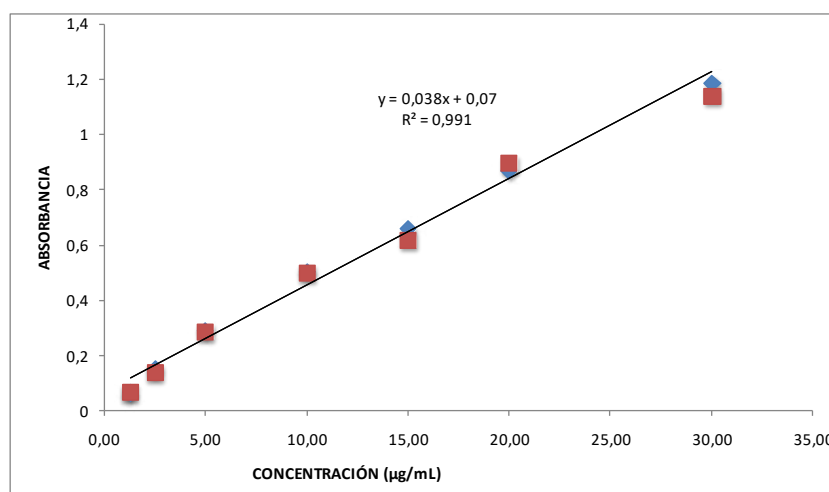
Lote	Rf	Lote	Rf
<b>S1</b>	0.14	<b>P3</b>	0.14
	<b>0.22</b>		<b>0.35</b>
	0.38		
<b>S2</b>	0.14	<b>P4</b>	0.15
	<b>0.22</b>		<b>0.23</b>
			0.36



## 6.3 Caracterización de las SPE de *Nocardia corallina* B-276

### 6.3.1 Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación se realizó por el método de Bradford, se determinó una  $R^2$  de 0.991 con un valor de una pendiente de 0.038 y un intercepto de 0.07, siendo confiable para la cuantificación de proteínas en las muestras, ver **Gráfica 1**.

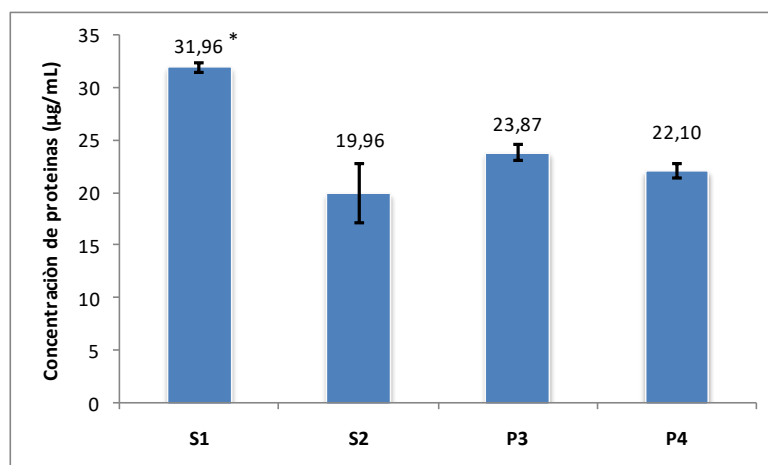


**Gráfica 1.** Curva de calibración para proteínas totales. Absorbancia vs concentración ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )

En la **tabla 7** se muestran las absorbancias, así como la concentración de proteínas en ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), En la **gráfica 2** y **tabla 7** se muestran los promedios ( $\bar{y}$ ) y desviación estándar ( $\sigma$ ) de la concentración de proteínas totales de los diferentes lotes.

**Tabla 7.** Cuantificación de cada lote, así como el promedio de cuantificación de proteínas totales y desviación estándar.

Lote	Abs. 1	Conc. ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Abs. 2	Conc. ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Promedio( $\bar{y}$ )	$\sigma$
S1	1.2997	32.29	1.2743	31.62	31.96	0.472
S2	0.9052	21.92	0.7561	17.99	19.96	2.772
P3	1.0000	24.41	0.9585	23.32	23.87	0.772
P4	0.9288	22.54	0.8955	21.66	22.10	0.619



**Gráfica 2.** Concentración de proteínas ( $\mu\text{g/mL}$ ) en los diferentes medios

Como se puede observar en la **gráfica 2** a mayor cantidad de proteínas mayor contenido de SPE, lo que pudiera dar un indicio preliminar del contenido de SPE sin necesidad de extraer las SPE.

Los valores de la concentración de proteínas fueron tratados por un ANOVA y posteriormente se les aplicó la prueba de clasificación de rangos múltiples de Tuckey ( $p=0,05\%$ ) para determinar diferencias significativas entre los lotes. La cantidad de proteínas en el lote S1 muestra una diferencia estadística con respecto a los demás medios.

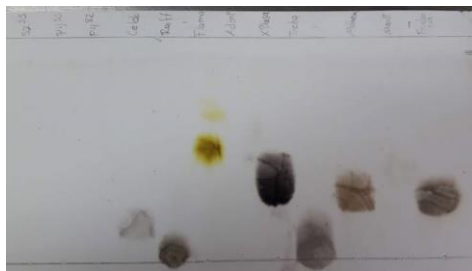
### 6.3.2 Determinación de azúcares presentes en las SPE

#### 6.3.2.1 Cromatografía de capa fina (CCF)

Después de las hidrólisis realizada a las SPE (1, 3 y 4), la SPE 2 no se pudo hidrolizar por la poca cantidad obtenida.

Se analizó por CCF con una mezcla de butanol: ácido acético: agua (2:1:1) como fase móvil, se colocaron 21 estándares de azúcar (Adonital, Arabinosa, Xilosa, Trehalosa, Sacarosa, Raffinosa, Ramnosa, Melozitrosa, Melibiosa, Manosa, Mannitol, Maltosa, Lactosa, Krsrove, Glucosa, Flamanosa, Celobiosa, Frabiosa, Fructofuranol, Fructuosa, Galactosa), utilizando como revelador ácido sulfúrico al 5 %, en la **figura 7** se observa una cromatoplaqueta con algunos estándares y las muestras (Celobiosa, Raffinosa, Flamanosa, Xilosa, Trehalosa, Manosa,

Mannitol y Fructuosa). Las SPE 1, 3 y 4 nodan color con los reveladores para azúcares ( $\alpha$ -naftol y  $H_2SO_4$  al 5% en etanol).

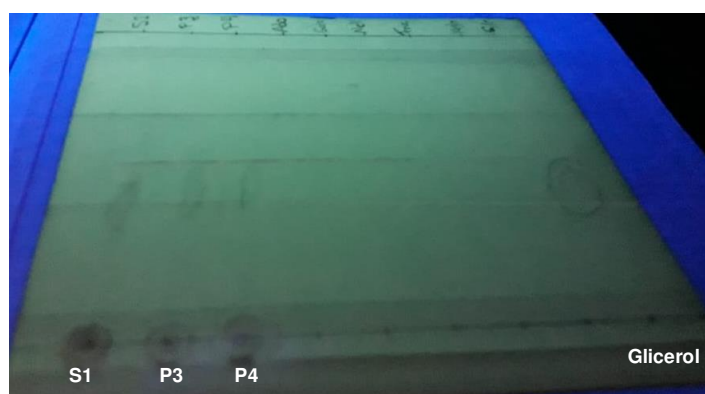


**Figura 7.** Cromatoplaqa con diferentes estándares de azúcar.

Por esta razón se realizó otra CCF aplicando 20  $\mu$ L de las SPE 1, 3 y 4 y Glicerol se eluyo en la misma fase móvil y se observó con la lámpara UV. Con esta placa confirmamos que la hidrólisis de las sustanciaspolimérica presentes en las SPE contiene glicerol, ya que sus factores de retención (Rf) son cercanos, ver **tabla 8** y **figura 8**.

**Tabla 8.** Factores de retención (Rf) en muestras hidrolizadas respecto a Glicerol.

Muestra	Rf
Glicerol	0.35
SPE1	0.35
SPE3	0.37
SPE4	0.37



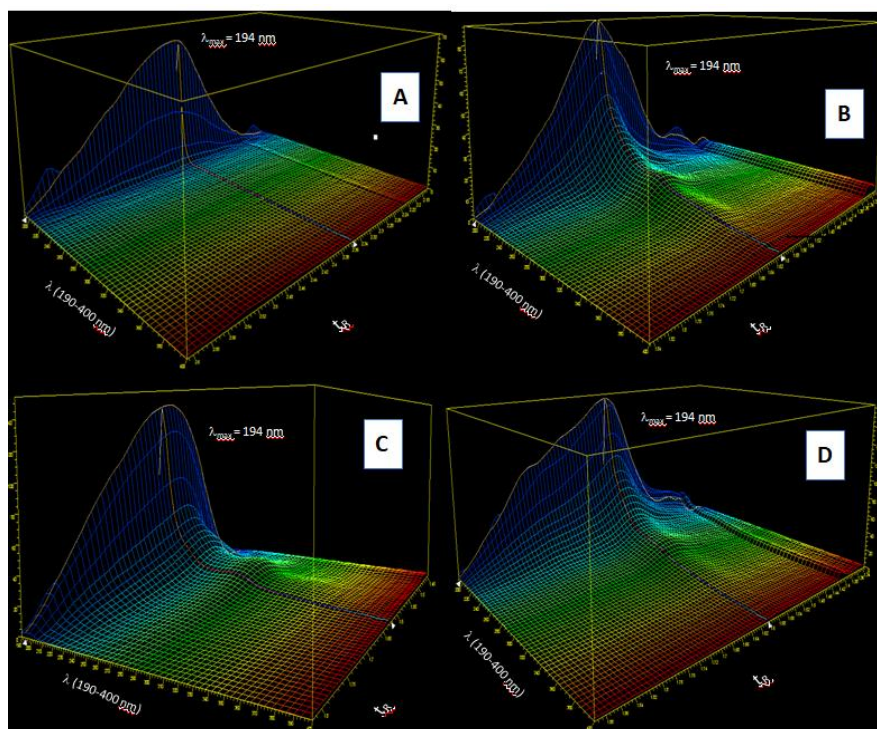
**Figura 8.** Cromatoplaqa con Glicerol, SPE 1, 3 y 4.

Al hidrolizar las SPE y obtener glicerol como producto de esta hidrólisis, se puede concluir que las SPE son polímeros de monómeros pequeños como PH3Bo algún PHA de cadena corta y que no están unidos a azúcares más grandes como glucosa o sacarosa, ya que no se observan en la CCF.

#### 6.3.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

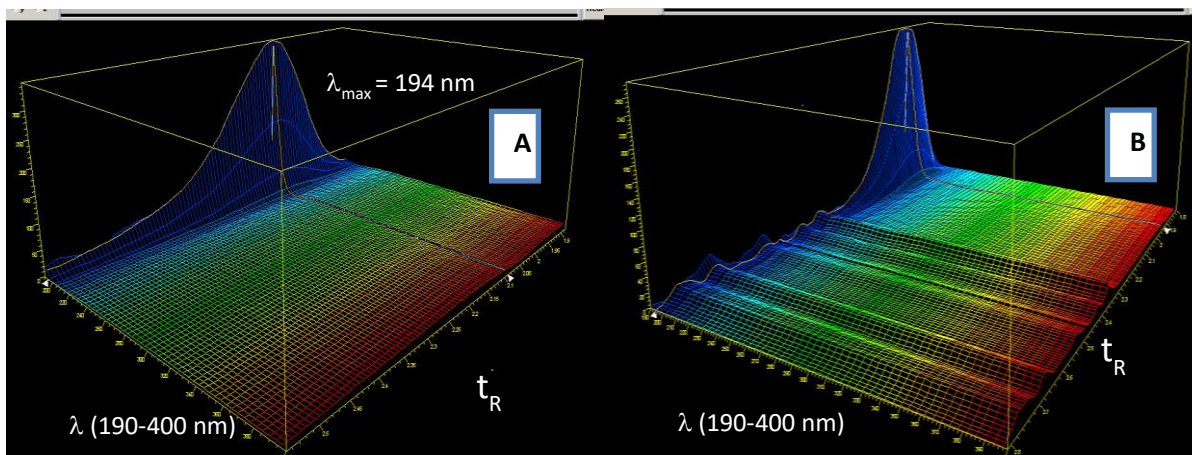
No se observaron ninguno de los 21 estándares de azúcares (Adonital, Arabinosa, Xilosa, Trehalosa, Sacarosa, Raffinosa, Ramnosa, Melozitrosa, Melibiosa, Manosa, Mannitol, Maltosa, Lactosa, Krsrove, Glucosa, Flamanosa, Celobiosa, Frabiosa, Fructofuranol, Fructuosa, Galactosa) analizados a excepción de glicerol. Glicerol absorbe en el UV, por lo que se utilizó DAD (detector de arreglo de diodos), realizando barridos de  $\lambda$  190-400 nm, obteniendo un tiempo de retención ( $t_R$ ) de 2.627 min para glicerol y 1.928 min para las tres muestras, en la **figura 9** se muestra el espectro en 3D ( $\lambda$  190-400 vs  $t_R$ ) para glicerol observándose su patrón de absorción, así como su  $\lambda_{m\acute{a}x.} = 194$  nm. Mientras que las muestras presentan mismo máximo de absorción 194 nm, pero los  $t_R$  no son iguales a glicerol, esto puede deberse a que puedan ser compuestos muy parecidos a glicerol como: etilenglicol, propilengliol o gliceraldehído, que podrían ser otros productos obtenidos.<sup>41</sup>

Además, en los espectros de absorción de las muestras (**Figura 9b, c y d**) se puede observar otros componentes que absorben en el UV.



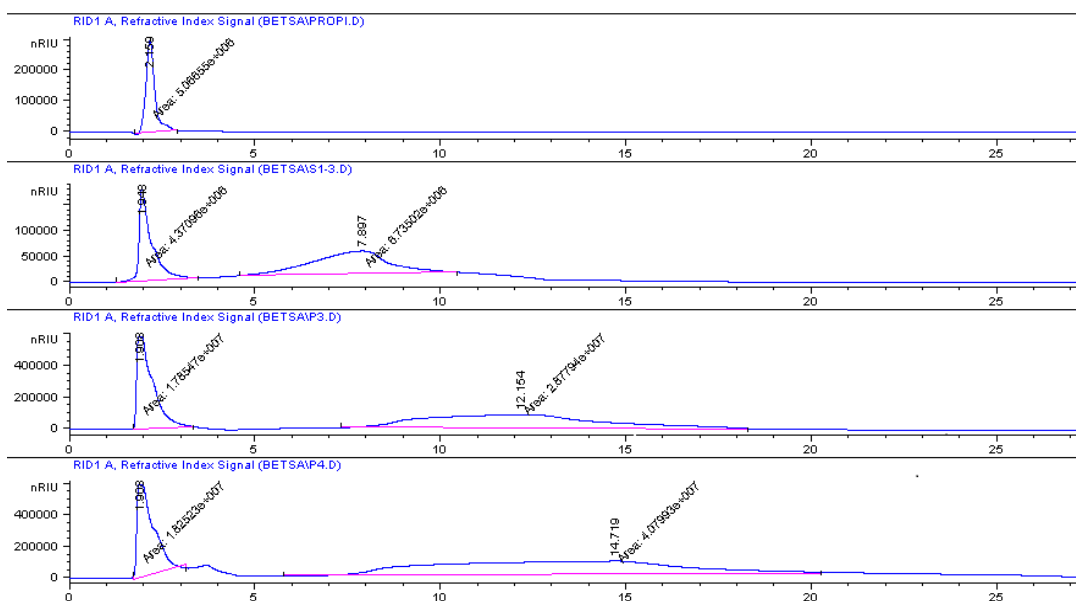
**Figura 9.** Espectros en 3D ( $\lambda$  190-400 vs  $t_R$ ): A) glicerol, B) SPE1, C) SPE3 y D) SPE4

Se analizaron dos estándares más, etilenglicol y propilenglicol, en propilenglicol su tiempo de retención ( $t_R$ ) de 1.943 min y en Etilenglicol su tiempo de retención ( $t_R$ ) 2.074 min. En la **figura 10** se muestra el espectro en 3D ( $\lambda$  190-400 vs  $t_R$ ) para etilenglicol y propilenglicol, observándose su patrón de absorción, así como su  $\lambda_{max} = 194$  nm.



**Figura 10.** Espectros en 3D ( $\lambda$  190-400 vs  $t_R$ ): A) Etilenglicol, B) Propilenglicol.

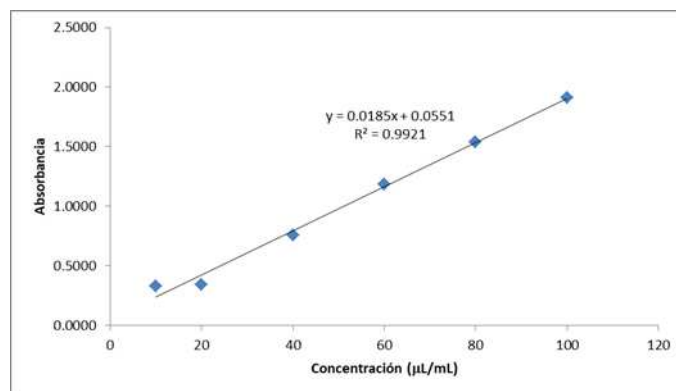
Después del análisis por CLAR, se puede concluir que en las SPE analizadas hay presencia de propilenglicol, glicerol y otros componentes asociados a la hidrólisis de PHB. En la **figura 11** se muestran los cromatogramas comparando propilenglicol con las muestras y estas coinciden en el tiempo de retención y los máximos de absorción, pero las muestras **figuras 9b, c y d** presentan otros componentes que están coeluyendo.



**Figura 11.** Cromatogramas para propilenglicol  $t_R$  2.159 y las SPE 1  $t_R$  1.948, SPE 3  $t_R$  1.908 y SPE 4  $t_R$  1.98, detector índice de refracción.

### 6.3.3 Cuantificación de azúcares totales

Se realizó mediante la técnica del fenol-sulfúrico, se determinó una  $R^2$  de 0.99 con un valor de una pendiente de 0.0185 y un intercepto de 0.0551, siendo confiable para la cuantificación de azúcares totales, ver **Gráfica 3**.

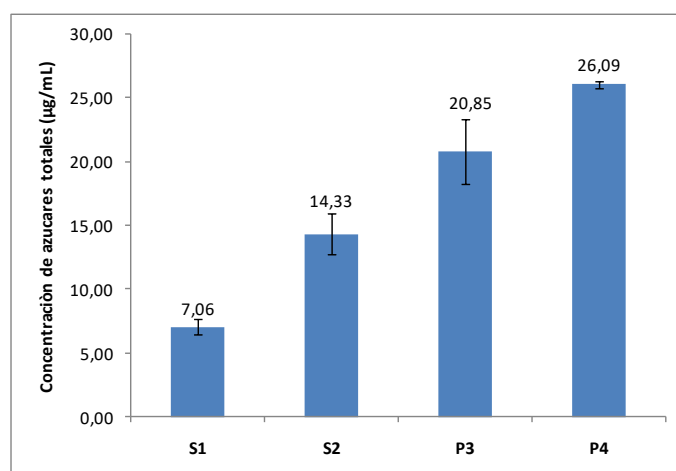


**Gráfica3.** Curva de calibración para azúcares totales. Absorbancia vs concentración  $\mu\text{L}/\text{mL}$

En la **tabla 9** y **Gráfica 4** se muestra la cuantificación de azúcares totales de los lotes S1, S2, P3 y P4. La cuantificación se hizo por triplicado, calculando su promedio ( $\bar{y}$ ) y desviación estándar ( $\sigma$ ).

**Tabla 9.** Cuantificación de azúcares totales en los 4 diferentes lotes, promedios y desviación estándar.

Lote	Abs. 1	Conc. ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Abs. 2	Conc. ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Abs. 3	Conc. ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Promedio ( $\bar{y}$ )	DE $\sigma$
S1	0.1805	6.78	0.1781	6.65	0.1984	7.75	7.06	0.60
S2	0.3335	15.05	0.3405	15.43	0.2865	12.51	14.33	1.59
P3	0.4408	20.85	0.4880	23.40	0.3936	18.30	20.85	2.55
P4	0.5432	26.38	0.5322	25.79	0.5377	26.09	26.09	0.30



**Gráfica 3.** Concentración de azúcares totales ( $\mu\text{g/mL}$ ) en las células sin hidrolizar de los diferentes medios

Como se observa en la **gráfica 3** a mayor cantidad de células mayor contenido de azúcares totales y como ya se había discutido menor cantidad de SPE.

A las muestras SPE después de hidrolizar también se les realizó la cuantificación de azúcares totales, en la **tabla 10**, se muestra el promedio de las concentraciones.

**Tabla 10.** Cuantificación de azúcares totales en los 3 lotes hidrolizados.

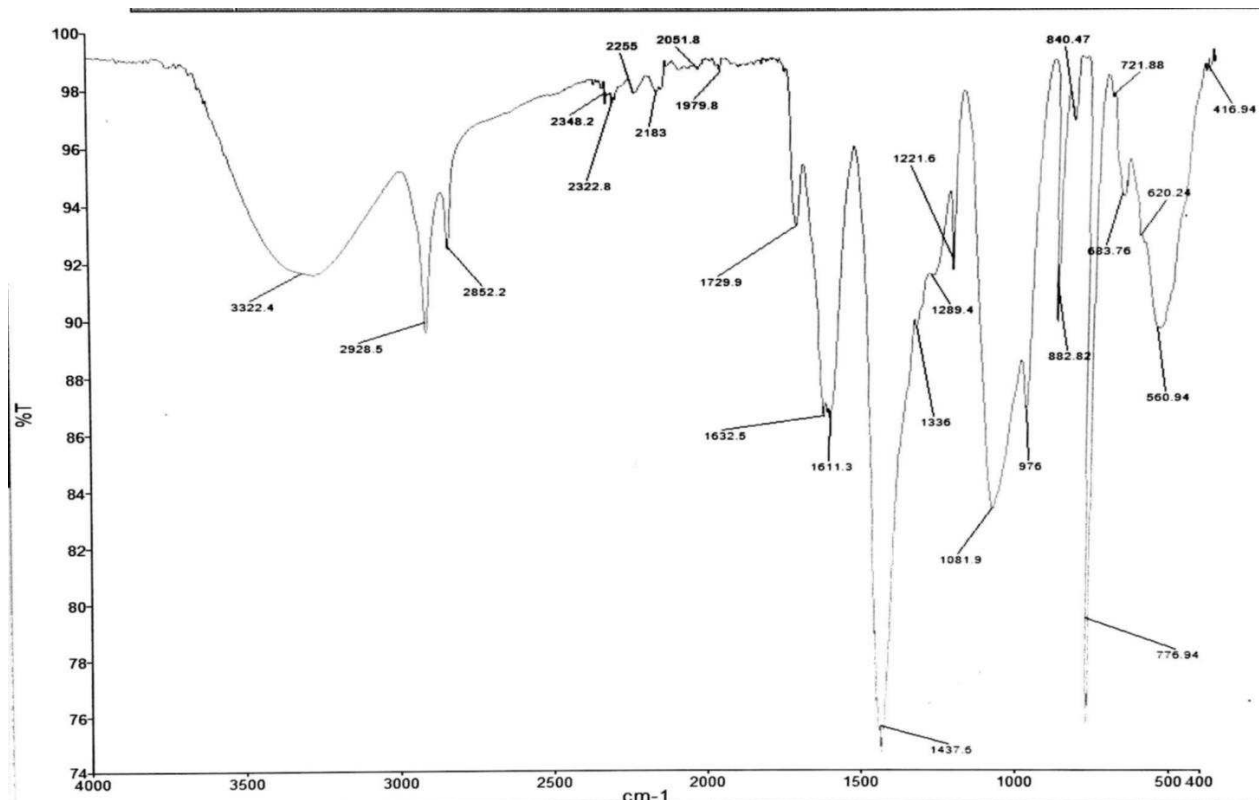
Lote hidrolizado	Abs.	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>S1</b>	0.3017	13.33
<b>P3</b>	0.2234	9.10
<b>P4</b>	0.2186	8.84

En el medio S1 en el que se obtuvo mayor cantidad de SPE tiene una menor concentración de azúcares totales.

#### 6.3.4 Espectrometría de Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

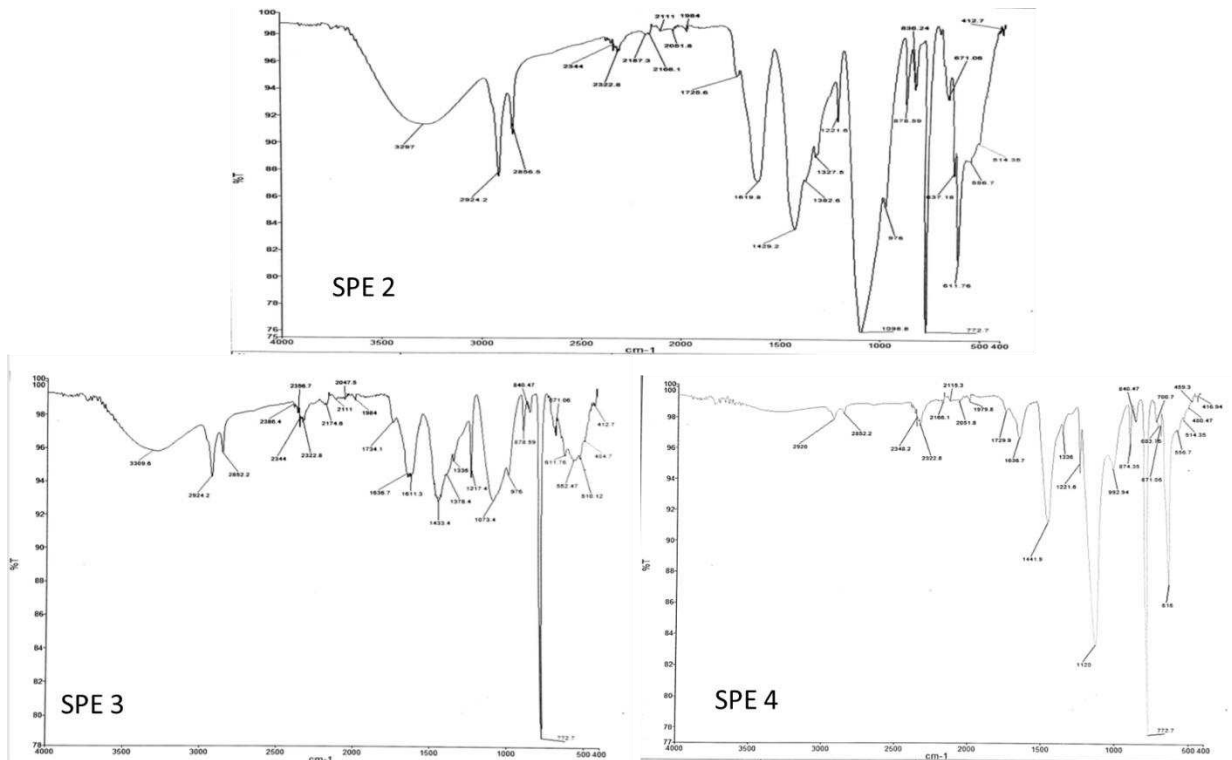
Mediante la técnica de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier se estudiaron las vibraciones de los enlaces presentes en las moléculas de las SPE obtenidos a partir de *Nocardia corallina* B-276. Los enlaces químicos de cada biopolímero fueron identificados en base a sus bandas características de C=O y OH. Los espectros IR-TF de la muestra de las SPE para el lote de sales S1 se muestran en la **Figura 12**.





**Figura 12.** IR-FT de la SPE 1.

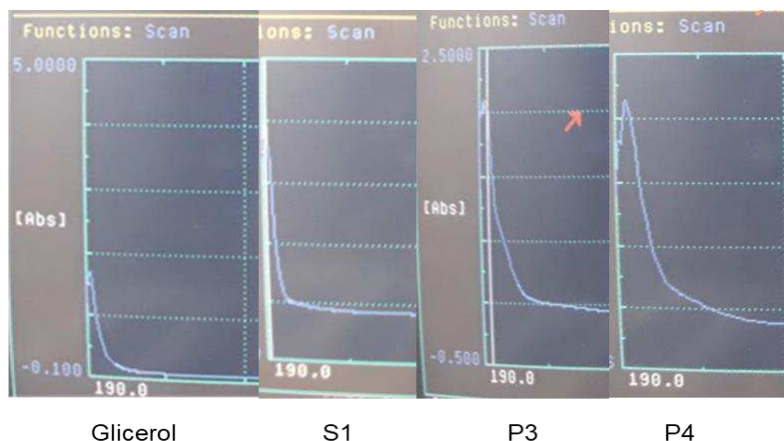
Los espectros de IR para todas las muestras fueron casi idénticos, ver **figura 13**. Además, estos coincidieron con los resultados obtenidos por otros autores que han reportado la obtención de PHB a partir de *Nocardia ssp.*<sup>42</sup> La banda encontrada en 1729 y 1289  $\text{cm}^{-1}$  corresponden al grupo carbonilo de la unión éster y al grupo  $-\text{CH}$ , respectivamente, estas dos bandas son características de los PHA's. La banda observada a 1437  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la deformación asimétrica del enlace C-H en los grupos  $\text{CH}_2$ , mientras que la banda a 1336  $\text{cm}^{-1}$  es asignada al movimiento simétrico de los grupos  $\text{CH}_3$ . La banda a 1221  $\text{cm}^{-1}$  es la correspondiente a conformaciones de cadenas helicoidales, mientras que la banda de 1081  $\text{cm}^{-1}$  son características de la vibración asimétrica y simétrica del grupo C-O-C, respectivamente. Las bandas restantes localizadas entre 1000 y 1300  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a la vibración del enlace C-O del grupo éster presente en los PHA's. Las bandas a 3322  $\text{cm}^{-1}$  son originadas por los grupos -OH terminales.



**Figura 13.** IR-FT de las SPE 2, 3 y 4.

### 6.3.5 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS)

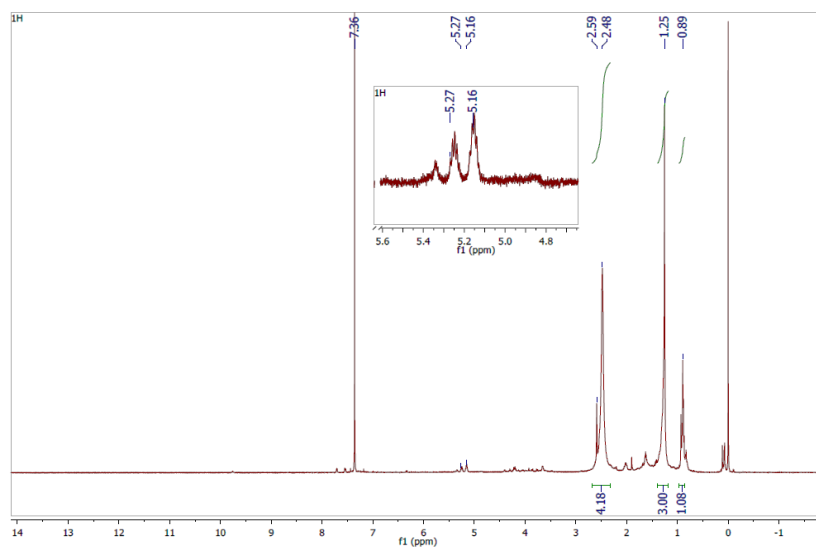
Se realizó un barrido en el espectrofotómetro de 190-400nm para saber la máxima longitud de onda de glicerol y comparar su espectro de absorción con los SPE 1, 3 y 4 hidrolizados. Los resultados nos arrojan una  $\lambda_{\text{máx}}$  193 nm para todos. Los espectros de absorción son idénticos para glicerol y todas las muestras hidrolizadas, ver **figura 14**.



**Figura 14.** Barrido en UV muestra de glicerol, y de las SPE 1, 3 y 4 hidrolizados.

### 6.3.6 Resonancia magnética nuclear (RMN) $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$

Los espectros de  $^1\text{H}$  para las SPE (1, 3 y 4) de *Nocardia corallina* B-276 mostraron tres grupos de señales características de PHB que se observan en el espectro 1.53 ppm representaba el grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ). La segunda señal a 2.5 ppm atribuido al grupo metileno ( $\text{CH}_2$ ) y una última señal a 5.2 ppm debido a la presencia del grupo CH (metileno), Ver **Figura 15**.



**Figura 15.** Espectro de  $^1\text{H}$ RMN para las SPE 1.

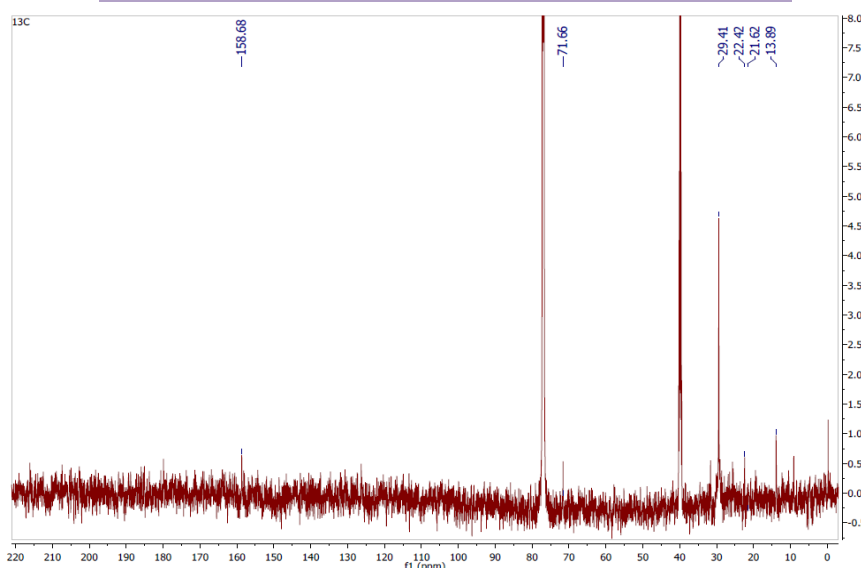
Rojas de Gáscue *et. al.*<sup>43</sup> reportó espectros de RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) para PHB, las cuales coinciden con lo encontrado en esta investigación, sin embargo, hay una señal ancha en 0.89 ppm pudiera ser una señal asociada al protón de un hidroxilo

-OH, por lo que se sugiere hacer estudios en 2D e intercambió con agua para confirmar. Las señales en 5.27 y 5.16, son tan pequeñas que se no se pueden asociar a las señales principales en el espectro por lo que no se podría atribuir al -CH como esta reportado, por lo que sería un polímero diferente a PHB.

Los espectros de  $^{13}\text{C}$  de RMN (**Figura 16**) de la SPE 1 y los desplazamientos químicos se muestran en la **tabla 11** que son características de PHB.<sup>43</sup>

**Tabla 11.** Desplazamientos químicos para  $^{13}\text{C}$ RMN obtenidas y asignaciones reportadas para PHB.

Tipo de carbono	$\delta$ (ppm) Experimental	$\delta$ (ppm) Reportadas <sup>43</sup>
CH <sub>3</sub>	13.9	19.5
CH <sub>2</sub>	22.4	--
CH <sub>2</sub>	29.4	--
CH <sub>2</sub>	--	40.8
CH	71.7	67.4
C=O	158.7	169.1



**Figura 16.** Espectro  $^{13}\text{C}$ RMN de las SPE 1.

El espectro de RMN para  $^{13}\text{C}$  (**figura 16**) no muestra las mismas señales reportadas por Rojas de Gáscue *et. al.*<sup>43</sup>, pudiera ser un derivado por lo que se sugiere hacer experimentos en 2D, incrementar el tiempo de adquisición de los datos y la cantidad de muestra con la finalidad de realizar una mejor elucidación.

## 7. CONCLUSIÓN

Se extrajeron sustancias poliméricas extracelulares de *Nocardia corallina* B-276 usando medio de sales y peptona carne a pH 7 y 8.5 para su crecimiento, en pH 7.0 se obtiene una mayor cantidad de las SPE, el medio con sales en este pH mostro el mejor resultado para la obtención de SPE.

Al obtener una mayor cantidad de proteínas se puede esperar que exista una mayor cantidad de SPE, por lo que sin extraer las SPE podría ser un indicador de la cantidad de SPE obtenida.

La técnica de azúcares totales nos da un indicio de la cantidad de azúcares obtenidas después de la hidrólisis, no se obtuvieron azúcares de cadena larga, en la hidrólisis se logró identificar: glicerol y propilenglicol, como productos de la hidrólisis de los PHB y PHA.

La Identificación de las sustancias poliméricas extracelulares mediante UV-VIS, IR-TF, CLAR, CCF, nos ayudo a identificar que la SPE obtenida, no es PHB, pero es un derivado de PHA.

## **8. PERSPECTIVAS**

Uno de los retos de este proyecto fue la elucidación de las SPE, por lo que se propone, aumentar la cantidad de biomasa para obtener más SPE.

En el análisis de RMN se debe realizar experimentos en 2D, aumentar el tiempo de adquisición, para poder elucidar por completo en tipo de PHA que se tiene.

Para la hidrólisis de las SPE podría precipitarse después de la reacción con metanol frío y después reconstituir la muestra además de mejorar el método analítico, ya que esta desarrollado para azúcares de cadena larga.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Kumar, M.; Mohanty, S.; Nayak, S. K.; Parvaiz, M. R. Effect of glycidyl methacrylate (GMA) on the thermal, mechanical and morphological property of biodegradable PLA/PBAT blend and its nanocomposites. *Bioresour. Technol.***2010**, 101, 21.
2. Kumar, A.S.; Mody, K.; Bhavanath, J. Bacterial exopolysaccharides—A perception. *J. Basic Microbiol.* **2007**, 47, 103–117.
3. Decho, A.W. Microbial biofilms in intertidal systems: An overview. *Cont. Shelf Res.* **2000**, 20, 1257–1273.
4. Flemming, H.C.; Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, 8, 623–633.
5. Costerton, J.W.; Geesey, G.G.; Cheng, K.J. How bacteria stick. *Sci. Am.***1978**, 238, 86–95.
6. Flemming, H.C.; Wingender, J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci. Technol.***2001**, 43, 1–8.
7. Donlan, R.M. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.***2002**, 8, 881–890.
8. Chang, Y.W.; Fragkopoulos, A.; Marquez, S.; Kim, H.; Angelini, T.E.; Fernández-Nieves, A. Biofilm formation in geometries with different surface curvature and oxygen availability. *New J. Phys.***2015**, 17.
9. De Beer, D.; Stoodley, P. Microbial biofilms. In *The Prokaryotes*, 1st ed.; Rosenberg, E., Ed.; Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg, Germany, **2013**, 343–372.
10. Documento de orientación para monómeros y polímeros. Unión Europea, **2012**, 2.0, 9.

10. Chanprateep, S. Current trends in biodegradable polyhydroxy alcanoates. *J. Biosci. Bioeng.* **2010**, 110, 621-632.
11. Riaño, J.; Polihidroxicanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos. Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. *Teoría y praxis investigativa.* **2010**, 5(2), 79-84.
12. Ferreira, M.; Estudio de las interacciones entre metales de relevancia ambiental y componentes celulares bacterianos, involucrados en procesos de biotratamiento de aguas residuales. Universidad de Buenos Aires, Argentina, **2016**.
13. Flemming, H.C.; Neu, T.R.; Wozniak, D. The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. *J. Bacteriol.* **2007**, 189, 7945–7947.
14. Tena, A.; Enríquez, G.; Evangelista, Z.; Aguilar, E.; Pérez, L. Lucha entre microbios: una herramienta para el control de enfermedades de plantas. *RDU*, **2015**, 16 (11), 1–15.
15. Lee, S.Y., 1996a. Bacterial polyhydroxy alcanoates. *Biotechnology and Bioengineering.* 49, 1-14.
16. Chen, G. Q. (2010). Plastics completely synthesized by bacteria: Polyhydroxy alcanoates. En: *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*. 14. Ed: G. G.Q. Chen. Springer Berlin Heidelberg. pp. 17-37.
17. Freitas, F.; Alves, V.; Reis, M.A. Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. *Trends Biotechnol.* **2011**, 29, 388–398.
18. More, T.T.; Yadav, J.S.; Yan, S.; Tyagi, R.D.; Surampalli, R. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *J. Environ. Manag.* **2014**, 144, 1–25.
19. Náchter-Vázquez, M.; Ballesteros, N.; Canales, A.; Saint-Jean, S.; Pérez-Prieto, S.; Prieto, A.; Aznar, R.; López, P. Dextrans produced by lactic acid



bacteria exhibit antiviral and immunomodulatory activity against salmonid viruses. *Carbohydr. Polym.* **2015**, 124, 292–301.

20. Wan, C.; Zhao, X.Q.; Guo, S.L.; Alam, A.; Bai, F.W. Biofloculant production from *Solibacillus silvestris* W01 and its application in cost-effective harvest of marine microalga *Nannochloropsis ceanica* by flocculation. *Bioresour. Technol.* **2013**, 135, 207–212.

21. Gadhave, R.; Das, A.; Mahanwar, P.; Gadekar, P. Starch Based Bio-Plastics: The Future of Sustainable Packaging. *Open J. Polym. Chem.* **2018**, 8 (2), 21–33.

22. Lee, S.; Choi, J.; Wong, H. Recent Advances in Polyhydroxy alcanoate Production by Bacterial Fermentation: Mini-Review. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, 25 (1), 31–36.

23. García, Y.; Contreras, J.; Reynoso, O. Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. *Int. Contam. Ambie.* **2013**, 29 (1), 77-115.

24. Ramsay, J. A.; Berger, E.; Voyer, R.; Chavarie, C.; Ramsay, B. A. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotechnol. Tech.* **1994**, 8 (8), 589-594.

25. Khanna S.; Srivastava A.K. A simple structured mathematical model for biopolymer (P3HB) production. *Biotechnol. Prog.* **2005**, 21, 830-838.

26. Leong, Y.; Show, P.; Ooi Ch.; Ling, T.; Lan, J. Current trends in polyhydroxy alcanoates (PHAs) biosynthesis: Insights from the recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **2014**, 180, 52-56.

27. Garrote, N.; Adhesivos proteicos bioinspirados para calzado, Universidad de Alicante, España, **2013**.

28. Li, Q.; Chen, X.; Jiang, Y.; Jiang, C. Morphological Identification of Actinobacteria. In Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications. *In Tech*, **2016**, 3, 59 - 86.

29. Pérez H. Oxidación Microbiológica de Alcoholes Por *Nocardia corallina* B.276, Universidad Autónoma Metropolitana, México, **1998**.
30. Pérez M.; Luna, H.; Ramírez L.; Solís, A.; Manjarrez A.; Cassani, J. Preparación de Ingredientes Farmacéuticos Activos Derivados de Aductos de Baylis-Hillman con *Nocardia corallina* B-276. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* **2009**, 40, 5–11.
31. Arévalo, C. Principales Procesos Básicos De Transformación De La Industria Plástica Y Manejo, Aprovechamiento Y Disposición De Residuos Plásticos Post-Consumo.; Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, Bogotá, **2004**.
32. López C. Xantanos Biopoliméricos: Propiedades Reológicas y Aplicaciones. *CienciAcierta*.**2011**, 7 (25).
33. Bastioli, C. Global Status of the Production of Biobased Packaging Materials. *Starch – Stärke*.**2001**, 53 (8), 351–355.
34. Gross, R.; Kalra, B. Biodegradable Polymers for the Environment. *Science*.**2002**, 297 (5582), 803–807.
35. Ortega, L.; Pérez, H.; Manjarrez, N.; Solís, A.; López, A. Efecto de las Sales de Hierro en *Rhodococcus* sp. y *Gordonia* sp. en la Producción de Carotenoides. *Rev. Mex. Ing. Quim.* **2017**, 16 (1), 1-10.
36. Valencia O.; Pérez H.; Maldonado L.; Quintana E.; Manjarrez N.; López A. Characterization of Extracellular Polymeric Substances (EPS) Produced by Marine Micromonospora sp. *J. Chem. Pharm. Res.* 2016, 8(7):442-451.
37. Sei, K.; Yong K.; Beom, S.; Ho, N. Optimization of Microbial Poly(3-hydroxybutyrate) Recovery Using Dispersions of Sodium Hypochlorite Solution and Chloroform. *Biotechnol. Bioeng.***1994**, 44, 256-261.
38. Torres E.; Hernández J.; Pérez C. Cuantificación de proteínas totales en extractos crudos de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de boyacá y cundinamarca. *Conex. Agropecu. JDC*, **2013**, 3 (2), 37–43.
39. Metzger, U.; Lankes, U.; Fischpera, K.; Frimmel, F. The Concentration of Polysaccharides and Proteins in EPS of *Pseudomonas putida* and *Aureobasidium pullulans* as Revealed by <sup>13</sup>C CPMAS NMR Spectroscopy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.***2009**, 85 (1), 197–206.

40. Piñero-Bonilla, J.; Díaz, I. Optimización de un medio de cultivo para la producción de biomasa de *Nocardia sp.* a partir de residuos de naranja como sustrato. *SVM*. **2010**, 30, 102-108.
41. Katryniok, B.; Selective catalytic oxidation of glycerol: perspectives for high value chemicals. *Green Chem.* **2011**, 13, 1960.
42. Indra, A. P.; Michael, P.; Loganayagi, R.; Ranandkumar, S.G.; Isolation and characterization of indigenous *Ralstonia* strain, YRF1 for high polyhydroxy alkanoates (PHA) production, *Elixir Appl. Biol.* **2012**, 48, 9424-7.
43. Rojas de Gáscue, B.; Manosalva, J. L.; Liendo, G.; Nonato, R.; Rossell, C. Caracterización a partir de la microscopía óptica de luz polarizada, las propiedades térmicas y la espectroscopia del termoplástico biodegradable poli(hidroxibutirato). *RLMM*.**2000**, 20, 2,47-53.