



**UNIVERSIDAD POPULAR
AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA**

**DECANATO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE BIOTECNOLOGÍA**

**Producción de biosurfactante por
Pseudomonas aeruginosa a partir de aceite
usado y su efecto antagónico contra
bacterias patógenas.**

TESIS

Para obtener el título de:
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

ANDREA DEL ROCIO GORDILLO CASTAÑEDA

Directora:
Dra. Beatriz Pérez Armendáriz

Co-director:
Dr. Carlos Felipe Peña Malacara

Puebla, Puebla, 28 de junio de 2022





UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

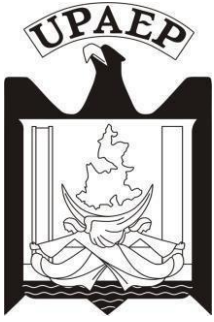
DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla
Centro Interdisciplinario de Posgrados e Investigación
Decanato de Ciencias Biológicas
Maestría en Biotecnología

SE APRUEBA LA TESIS:

Producción de biosurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* a partir de aceite usado y su efecto antagónico contra bacterias patógenas.

Del alumno: Andrea del Rocio Gordillo Castañeda

Comité Asesor

Dra. Beatriz Pérez Armendáriz
Directora de Tesis

Dr. Carlos Felipe Peña Malacara
Co-director

Dr. Elie Girgis El Kassis
Asesor

Mtra. Gloria Anaí Valencia Luna
Asesora

Mtra. Verónica Miroslava Martínez Ortiz
Asesora

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos, quienes me han acompañado en esta etapa de crecimiento profesional. Toda la vida me han alentado a cumplir mis sueños y a superar todos los obstáculos que se presenten, no hay nada que no pueda lograr teniéndolos conmigo. Gracias a su amor y apoyo he llegado hasta aquí, todo lo que soy es por y para ustedes.

A José María y Christian, no hay mayor alegría que tenerlos a mi lado, son mi inspiración para superarme cada día.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Beatriz Pérez Armendáriz, por dirigir mi proyecto de tesis, aceptarme en su equipo de investigación; y por guiarme y apoyarme con cariño y dedicación aumentando así mi interés y gusto por la ciencia.

Al Dr. Carlos Felipe Peña Malacara, por co-dirigir mi proyecto de investigación, enriqueciendo mis conocimientos y habilidades en el área.

A mi grupo de asesores: Dr. Elie G. El Kassis, Mtra. Anaí Valencia, Mtro. Carlos Cal y Mayor y Mtra. Miroslava Martínez, por aportar parte de su conocimiento a enriquecer mi proyecto de tesis.

A la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, por la calidad educativa recibida durante mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico recibido durante mis estudios de Maestría.

A mis profesores de la Maestría en Biotecnología y a los técnicos del laboratorio de investigación Biotecnoambiental, por los conocimientos adquiridos y el apoyo en el laboratorio durante mi trabajo de investigación.

A mis compañeras y compañeros del posgrado en Biotecnología, especialmente a mi amiga Guadalupe Espinosa, por el conocimiento y experiencia que compartieron conmigo y por su apoyo incondicional.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Introducción	7
1.2 Planteamiento del problema.....	8
1.3 Justificación.....	9
1.3 Objetivo general	10
1.4 Objetivos específicos	10
1.5 Hipótesis.....	10
II. MARCO TEÓRICO	11
2.1 Aceites.....	11
2.1.1 Química de los aceites.....	11
2.1.2 Contaminación por aceites	13
2.1.3 Alternativas para la reutilización de aceites.....	15
2.2 Surfactantes	16
2.2.1 Química de los surfactantes	17
2.2.2 Repercusiones de los surfactantes químicos	19
2.3 Biosurfactantes.....	20
2.3.1 Clasificación de los biosurfactantes	21
2.3.2 Ramnolípidos	23
2.3.3 Microorganismos productores de biosurfactantes.....	26
2.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
2.4.1 Producción de ramnolípidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
2.5 Actividad antimicrobiana.....	30
2.5.1 Efecto antagónico de los ramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30

III. METODOLOGÍA	32
3.1 Microorganismos y medios de cultivo	32
3.2 Condiciones de inoculación	33
3.3 Producción de biosurfactante	34
3.4 Actividad emulsificante	35
3.5 Purificación del biosurfactante.....	36
3.6 Actividad antimicrobiana.....	36
3.6.1 Difusión en disco.....	36
3.6.2 Concentración mínima inhibitoria.....	37
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1 Actividad emulsificante	41
4.2 Actividad antimicrobiana: Difusión en disco.....	44
4.3 Actividad antimicrobiana: Concentración mínima inhibitoria.....	48
V. CONCLUSIONES.....	57
VI. PERSPECTIVAS	59
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Síntesis de los triglicéridos	12
Figura 2.2 Estructura de los mono y diramrólpidos	23
Figura 3.1 Diagrama del proceso experimental	32
Figura 3.2 Microorganismos y medios de cultivo.....	33
Figura 3.3 Condiciones de inoculación.....	34
Figura 3.4 Producción del biosurfactante	35
Figura 3.5 Actividad emulsificante.....	35
Figura 3.6 Purificación de los ramrólpidos	36
Figura 3.7 Difusión en disco	37
Figura 3.8 Concentración mínima inhibitoria.....	40
Figura 4.1 Actividad emulsificante de los ramrólpidos producidos por <i>P. aeruginosa</i> MK307837 y ATCC27853	42
Figura 4.2 Inhibición producida por los ramrólpidos contra bacterias patógenas	47
Figura 4.3 Concentración mínima inhibitoria de los ramrólpidos contra <i>Escherichia coli</i>	49
Figura 4.4 Concentración mínima inhibitoria de los ramrólpidos contra <i>Salmonella typhimurium</i>	50
Figura 4.5 Concentración mínima inhibitoria de los ramrólpidos contra <i>Enterococcus faecalis</i>	51
Figura 4.6 Concentración mínima inhibitoria de los ramrólpidos contra <i>Staphylococcus aureus</i>	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Tipos de surfactantes químicos	18
Tabla 2.2 Aplicaciones de los ramrólpidos	25
Tabla 3.1 Diseño de experimento Actividad antimicrobiana: Microplaca.....	39
Tabla 4.1 Halos de inhibición producidos por los ramrólpidos contra bacterias patógenas	45
Tabla 4.2 Concentración mínima inhibitoria de los ramrólpidos contra bacterias patógenas	53

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

En este trabajo de investigación se evaluó la actividad antimicrobiana del biosurfactante producido por *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando las cepas ATCC 27853 y MK307837 de esta bacteria. El antagonismo fue probado para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas de importancia nosocomial, tanto Gram positivas como Gram negativas, las cepas que se utilizaron fueron: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*.

Los biosurfactantes son un producto biotecnológico con gran importancia y valor económico debido a sus múltiples aplicaciones, el método de producción empleado en esta metodología utiliza un medio de cultivo con aceite de canola usado como fuente de carbono, siendo benéfico para el medio ambiente ya que al reutilizar este residuo peligroso se le da una disposición final provechosa.

La metodología empleada se dividió en dos etapas. La primera etapa fue la Implementación, en la cual se utilizaron las condiciones de producción de Pérez-Armendáriz et al., (2019) con ambas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Posteriormente se realizaron pruebas de emulsificación para valorar la estabilidad de los productos obtenidos siguiendo el procedimiento descrito por Shavandi et al., (2011).

La segunda fase de la etapa experimental fue la evaluación del desempeño de los biosurfactantes obtenidos, específicamente la actividad antimicrobiana que desempeñan contra las bacterias patógenas mencionadas anteriormente. Esto se realizó mediante dos pruebas de antagonismo bacteriano, una de ellas fue la difusión en disco utilizando el biosurfactante crudo, la cual brindó un panorama general de la inhibición ejercida por el ramnolípido sobre cada cepa, esta prueba se realizó según Corrales et al., (2013).

Además, se determinó la Concentración mínima inhibitoria (CMI) de ambos biosurfactantes para cada cepa patógena utilizando la metodología de Perinelli et al., (2019). Para realizar esta determinación fue necesario obtener el ramnolípido purificado del biosurfactante crudo mediante el procedimiento descrito por Pérez-Armendáriz et al., (2019).

Esta tesis presenta un panorama teórico sobre los surfactantes como agentes tensoactivos, especialmente información sobre aquellos de origen biotecnológico, los biosurfactantes. Además, se brinda información de las especies microbianas capaces de producirlos, ahondando en las características de *Pseudomonas aeruginosa* y el metabolismo que le permite la síntesis de este metabolito en ciertas condiciones de crecimiento. También se hace referencia a la importancia ambiental que tiene el emplear un desecho como el aceite de canola usado debido al impacto nocivo que provoca si carece de un tratamiento adecuado.

La actividad antimicrobiana es una de las muchas aplicaciones que se han descubierto que pueden tener los biosurfactantes, por lo que se realizó un resumen y análisis de los antecedentes publicados para los ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa*.

Finalmente, se presentan los resultados obtenidos en las pruebas de antagonismo bacteriano con cada uno de los biosurfactantes y la determinación de las CMI requeridas para las cepas patógenas; y se comparan estos valores con los publicados en la bibliografía discutiendo las razones de las diferencias existentes.

1.2 Planteamiento del problema

Entre los residuos peligrosos más generados en México se encuentran los aceites gastados, con un promedio de 46 027 t anuales, representando el 21% de la generación de Residuos Peligrosos total (SEMARNAT, 2015). Verter 1 litro de aceite en el drenaje contamina 500 000 litros de agua (Panadare & Rathod, 2015) este residuo puede afectar en gran medida, tanto en los cuerpos de agua como en los sistemas de alcantarillado de las urbes.

En el primer ambiente provoca la formación de una película superficial que afecta al intercambio de oxígeno y perjudica a los seres vivos del ecosistema; mientras que, en el drenaje, debido a su característica aglutinante, genera bolos que producen importantes atascos en las cabeceras de las canalizaciones de la red de aguas residuales.

En la actualidad vivimos con un problema de salud pública relacionado con la resistencia a los antimicrobianos, que provoca una alta mortalidad en la población mundial. Los patrones de resistencia a sustancias farmacológicas en bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas tienen gran dificultad para ser tratados con antibióticos tradicionales, por lo que existe una gran escasez en las terapias que resultan efectivas, esto implica un requerimiento de nuevas opciones de tratamiento antimicrobiano para ayudar en el control de infecciones (Frieri et al., 2017).

1.3 Justificación

Es necesario generar métodos de reutilización de aceites para reducir el impacto ambiental que provocan. Al emplearlo como sustrato, mediante un método de producción de biosurfactante usando una técnica biotecnológica con *Pseudomonas aeruginosa*, se podrá dar utilidad a parte de este residuo que representa una fuente de contaminación y convertirlo así en un producto que puede tener características de gran valor como su antagonismo contra bacterias patógenas. Dicho valor viene dado por su funcionalidad como una alternativa a los tratamientos y terapias actuales contra bacterias patógenas, ayudando a enfrentar la problemática de la resistencia antimicrobiana.

1.3 Objetivo general

Evaluar el efecto antagónico del biosurfactante producido por dos cepas diferentes de *Pseudomonas aeruginosa* contra bacterias patógenas de importancia nosocomial a través de pruebas en microplacas para generar una propuesta biotecnológica.

1.4 Objetivos específicos

- Evaluar la producción y estabilidad del agente emulsionante entre las cepas de *P. aeruginosa* MK307837 y ATCC 27853.
- Determinar el antagonismo de los biosurfactantes contra *E. coli*, *S. typhimurium*, *E. faecalis* y *S. aureus* mediante la técnica por difusión en disco.
- Determinar el antagonismo de los biosurfactantes contra *E. coli*, *S. typhimurium*, *E. faecalis* y *S. aureus* mediante la técnica por microdilución.

1.5 Hipótesis

Los biosurfactantes producidos por *Pseudomonas aeruginosa* MK307837 y ATCC 27853 utilizando aceite de canola usado como fuente de Carbono, tienen un efecto antagónico contra *E. coli*, *S. typhimurium*, *E. faecalis* y *S. aureus*, presentando diferentes capacidades inhibitorias.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Aceites

Los lípidos son un grupo de moléculas de naturaleza hidrofóbica que tienen su origen en las condensaciones de tioésteres o isoprenos (Quintero, 2014). Estas sustancias poseen características comunes como la baja solubilidad en agua y la formación de micelas, entre ellas se incluyen los glicéridos, ceras, esteroides, carotenoides, terpenos, tocoferoles, ácidos grasos, grasas y aceites (Mara & Barrera-Arellano, 2012).

Los aceites y grasas son sustancias químicas principalmente formados por triglicéridos, es decir, mezclas de ésteres de la glicerina con ácidos grasos y pueden ser de origen vegetal o animal. La diferencia principal entre estos dos conceptos radica en el estado natural de las sustancias a temperatura ambiente, mientras las grasas se encuentran en estado sólido, los aceites son líquidos (Bailey, 1961).

2.1.1 Química de los aceites.

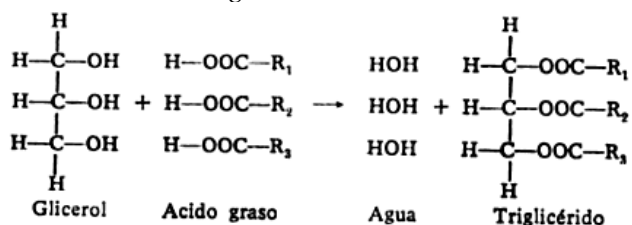
Los ácidos grasos son compuestos formados por una cadena hidrocarbonada y un grupo carboxilo terminal, lo que les confiere una naturaleza alifática, poseen en su estructura entre 4 y 22 átomos de carbono y pueden presentar dobles enlaces (Mara & Barrera-Arellano, 2012; Scrimgeour, 2005).

Cuando 1,2 o 3 ácidos grasos se encuentran esterificados a una molécula de glicerol se conforman los compuestos llamados glicéridos, y son denominados mono, di o triglicéridos, respectivamente (Mara & Barrera-Arellano, 2012).

Los triglicéridos, unidades estructurales de las grasas y aceites, se forman mediante una reacción de condensación de una molécula de glicerol con tres moléculas de ácidos grasos donde se liberan tres moléculas de agua (Bailey, 1961).

Figura 2.1

Síntesis de los triglicéridos



Fuente: Bailey 1961.

Estos pueden dividirse en dos grupos: simples y mixtos; los primeros se forman cuando los tres ácidos grasos son iguales, por otra parte, los segundos contienen grupos ácidos diferentes, estos pueden presentar isomerización dependiendo del ácido que se encuentra en la posición central (Bailey, 1961).

Son los glicéridos más comunes en la naturaleza, donde abundan los de tipo mixto, en los del grupo simple se encuentran pocos tipos de grasas. Gracias a la investigación que se ha realizado en este tipo de sustancias, se ha encontrado que existe una “regla de distribución uniforme”, la cual describe la composición natural de las grasas y aceites; explica que los ácidos grasos tienden a repartirse con la mayor uniformidad como sea posible en las moléculas de triglicéridos, los aceites de origen vegetal son los que cumplen con mayor precisión esta regla, mientras que los de origen animal muestran una desviación marcada (Bailey, 1961; Mara & Barrera-Arellano, 2012).

Debido a que representan la mayor parte en la composición de los triglicéridos y a que son la parte activa de éstos, los ácidos grasos son los responsables del carácter de la molécula. En la naturaleza estos ácidos son compuestos alifáticos monobásicos formados de un grupo carboxilo que se encuentra al final de una cadena hidrocarbonada simple (Bailey, 1961). Pueden clasificarse dependiendo en los tipos de enlace que constituyen su cadena carbonada

en saturados, si sólo constan de enlaces simples, o no saturados, si presentan dobles enlaces (Scrimgeour, 2005).

Por su proceso de manufactura, la mayoría de aceites y grasas industriales o comestibles cuentan con grupos que no pertenecen a su composición pura, pero son removidas casi en su totalidad en la refinación del aceite bruto, de esta manera no afectan con las propiedades organolépticas de los aceites comerciales. En el aspecto químico estas trazas, aunque no son deseables, tampoco se consideran como un problema relevante en la mayoría de los usos que se les dan a los productos finales (Bailey, 1961). Los aceites crudos están compuestos en un 97% por triglicéridos y pequeñas cantidades de fosfátidos, pigmentos, esteroides, vitaminas, proteínas, ceras, hidrocarburos, carbohidratos, etc., y luego del refinado, los triglicéridos corresponden a más del 99% de su composición (Mara & Barrera-Arellano, 2012).

2.1.2 Contaminación por aceites

El ritmo en el que se lleva a cabo el aumento poblacional en la actualidad conlleva a un efecto similar en las necesidades básicas de los individuos, en este caso en el área de los alimentos donde se incluye el aceite de cocina que en todo el mundo y en todas las cocinas es esencial en la preparación de comida tanto en los hogares, como en la industria alimentaria y restaurantera (Panadare & Rathod, 2015).

Al ser expuesto al calor, el aceite sufre cambios fisicoquímicos notorios en sus propiedades organolépticas, que después de una exposición prolongada lo convierten en una sustancia no apta para la ingesta de las personas ya que representa un riesgo para la salud. A su vez, el aceite usado, genera residuos domésticos y peligrosos (Panadare & Rathod, 2015). Algunos de estos desechos son el mismo aceite usado que debido a su lenta degradación natural provocan problemas en su proceso de disposición.

Se ha demostrado que verter 1 litro de aceite en cuerpos de agua puede llegar a contaminar hasta 500,000 litros de estas. La contaminación genera malos olores y se representa en el aumento de la materia orgánica y la reducción del oxígeno disuelto al formar una capa en la

superficie de los cuerpos acuáticos que complica la vida de las criaturas marinas (Panadare & Rathod, 2015).

Por otra parte, también se generan problemas en los sistemas de drenaje, ya que, al solidificarse, este aceite dispuesto incorrectamente en los desechos de los fregaderos de las cocinas, forma una capa que bloquea las tuberías de las alcantarillas, además de efectos corrosivos. El tratamiento de este tipo de desechos en las plantas de aguas residuales se complica agregando nivel de contaminación y costo de proceso al requerir de trampas de grasa en los efluentes y quizás su posterior degradación vía anaerobia. Es por ello que el buen manejo y disposición de estos residuos, como su recolección a tiempo, tiene una gran importancia en la búsqueda de la solución a la problemática ambiental (Panadare & Rathod, 2015).

Los países con mayor desarrollo tienden a ser quienes contaminan en mayor medida con residuos de aceite doméstico y grasas animales, que aunque el mayor porcentaje de dichos residuos se utilizan para la creación de productos de saponificación, muchos desembocan en nuestro medio ambiente causando un reto mayor por la dificultad de extraerlos del agua y de los cuerpos acuáticos naturales (Chhetri et al., 2008).

En un ámbito global, Estados Unidos a través de su Administración de Información de Energía, estima que en dicho país se generan alrededor de 100 millones de galones de residuos de aceite de cocina por día, donde el promedio per cápita diario se encuentra en 9 libras. Además, en Canadá se presume la misma producción de aceite per cápita que en su vecino del sur, por lo que la agencia gubernamental de dicho país, Statistics Canada, considera que, en relación a los 33 millones de habitantes de su país, el total de residuos producido podría alcanzar las 135, 000 toneladas por año. Por otro lado, el Reino Unido genera aproximadamente de 700,000 a 1,000,000 toneladas por año, siendo este país quien tiene una mayor producción de aceite de cocina residual, generando 200,000 toneladas por año (Chhetri et al., 2008).

Por su parte, desde la perspectiva nacional, en un periodo de 10 años evaluado de 2004 a 2014, en México se produjeron 2 192 000 toneladas de residuos peligrosos aproximadamente, de las

que el 21%, es decir, 460 277 toneladas, fueron aceites y grasas gastados (SEMARNAT, 2015).

De acuerdo a lo establecido en la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR) los residuos deben contenerse en depósitos sin importar el estado de los materiales, para después llevar un tratamiento, debiendo ser clasificados según las características, donde se dividen en residuos sólidos urbanos (RSU), residuos de manejo especial (RME) y residuos peligrosos (RP) (Vidal Becerra et al., 2019).

Según lo establecido en las normas mexicanas y los programas como lo son la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos, Programa Nacional de Prevención y Gestión Integral de los Residuos y los Programas Estatales y Municipales de Prevención y Gestión Integral de los Residuos, los mexicanos debemos acatar sus dictámenes con el fin de regular la transportación y el procesamiento de los residuos (Vidal Becerra et al., 2019).

De acuerdo con Vidal Becerra et al (2019), aplicar las alternativas existentes para el manejo adecuado y reutilización de estos residuos, además de ayudar a disminuir el impacto ambiental que generan, sirve como una oportunidad de darles un valor industrial, ecológico y económico al utilizarlos como materia prima de otros productos como biocombustibles, lubricantes, ceras, sustratos, etc.

2.1.3 Alternativas para la reutilización de aceites

Debido al impacto ambiental que se ha demostrado generan este tipo de desechos, algunos países como Estados Unidos y Japón, han generado estrictas leyes que rigen los parámetros y normas de disposición y eliminación de residuos. Esto involucra la participación de empresas del sector privado que brindan alternativas para el procesamiento y reutilización de residuos en la producción de bienes de alto valor como biodiesel y energía eléctrica (Panadare & Rathod, 2015).

Panadare & Rathod (2015) reportan que se han desarrollado sistemas funcionales de recolección de residuos para posteriormente someterlos a un análisis, y disponer de ellos

mediante un procesamiento de reutilización y finalmente su distribución como producto reciclado con un valor alto en el mercado, generando de esta manera una alternativa sustentable para la gestión de este tipo de desechos. Tras la necesidad de reducir la emisión de gases de efecto invernadero, los métodos de producción de combustibles como biocombustibles e hidrógeno, denominados combustibles de nueva generación, propició que su estudio sea más minucioso generando la necesidad de convertir los residuos en fuentes de energía.

Sin embargo, los residuos agrícolas y aceites de diversos tipos como los son: residuales, lubricantes, de transformador, de motor o engranaje; son utilizados como materia prima para la creación de combustibles alternativos, bajo el concepto de “residuos de energía” (Panadare & Rathod, 2015).

Por lo tanto, se destacan entre los tipos de reúsos que se le puede dar a los desechos de aceites la industria jabonera principalmente, la encargada de fabricación de ceras y veladoras, además de las mencionadas en los párrafos anteriores que se dedican a la producción de biodiesel y otros combustibles (Panadare & Rathod, 2015).

Esta gestión adecuada también ha llamado la atención de industrias de bioprocesos y se han desarrollado algunas técnicas de reutilización de estos aceites usados como sustratos para microorganismos en los procesos de producción biotecnológicos representando la fuente de carbono principal aportando beneficios económicos y ambientales para la generación de subproductos industriales (Pérez-Armendáriz et al., 2019).

2.2 Surfactantes

Los surfactantes son un amplio grupo de químicos que tienen la capacidad de autoagregarse y se caracterizan por ser moléculas anfipáticas, compuestas por una cola carbonada hidrofóbica y una cabeza hidrofílica (Garavito & Ferguson-Miller, 2001).

Son productos químicos que tienen gran importancia en la industria ya que se estima que se cuenta con una producción mundial anual de aproximadamente 10 millones de toneladas. Se ha registrado que el 54% de la producción total de surfactantes en todo el mundo se destina a diversos sectores industriales, tales como domésticos o industriales entre los que se encuentran detergentes, textiles, alimentos, papel, cosméticos, productos de cuidado personal, salud y agricultura (Van Bogaert et al., 2007).

Cuando se encuentran disueltos en agua, los surfactantes forman micelas, reduciendo la energía libre del sistema., lo que les otorga su detergencia y propiedades de solubilidad (Ivanković & Hrenović, 2010).

La concentración crítica micelar, es aquella concentración límite a la cual se lleva a cabo la formación de micelas y en concentraciones mayores a la misma, los surfactantes pueden solubilizar compuestos orgánicos hidrofóbicos (Ivanković & Hrenović, 2010).

Económicamente tienen gran relevancia, ya que se espera que el mercado de surfactantes, según el período de pronóstico 2014-2020, alcance los \$ 44,6 mil millones de dólares (Schultz & Rosado, 2019).

2.2.1 Química de los surfactantes

Coloquialmente conocidos como detergentes, los surfactantes químicos, son compuestos que permiten variar la tensión superficial del agua y son los causantes de la humectación, penetración, emulsión y suspensión de partículas sólidas. Su estructura, como la de los surfactantes en general, está compuesta por dos partes: una hidrofílica y otra hidrofóbica y lipofílica, lo que permite formar puentes entre agua y aceite (Garavito & Ferguson-Miller, 2001).

Van Hamme et al, (2006) clasificaron a los surfactantes según la carga de su grupo polar en 4 grupos:

- Surfactantes aniónicos, son los más antiguos y comunes, los detergentes y jabones pertenecen a este tipo de surfactantes y, además, son utilizados en fármacos como

coadyuvantes de absorción y adsorción (Bajpai & Tyagi, 2007; Cal-y-Mayor-Luna, 2017).

- Surfactantes catiónicos, a los que pertenecen los compuestos cuaternarios de amonio. Son usados en formulaciones de productos de limpieza como detergentes, suavizantes y acondicionadores de cabello (Bajpai & Tyagi, 2007; Cal-y-Mayor-Luna, 2017). Además, sirven como desinfectantes gracias a su antagonismo contra bacterias, hongos y protozoarios (Ivanković & Hrenović, 2010).
- Surfactantes anfóteros, sus características varían según su pH, no existe mayor información respecto a estos, incluyen a los óxidos de aminas (Bajpai & Tyagi, 2007; Cal-y-Mayor-Luna, 2017; Ivanković & Hrenović, 2010).
- Surfactantes no iónicos, no son capaces de disociarse en iones al encontrarse disueltos en agua y son ampliamente ocupados en procesos de biorremediación de suelos (Cal-y-Mayor-Luna, 2017). Son utilizados también en la fabricación de pesticidas, agentes humectantes y estabilizadores de espumas (Bajpai & Tyagi, 2007; Ivanković & Hrenović, 2010).

En la Tabla 2.1 se enlistan algunos ejemplos de los tipos de surfactantes según la clasificación anterior.

Tabla 2.1

Tipos de surfactantes químicos

Carga	Surfactante
Aniónicos	Ácido sulfónico de alquil benceno lineal
	Sulfato de alquilo (Dodecil sulfato de sodio)
	Etoxisulfato de alquilo
	Éter sulfato
	Olefinas sulfonadas
	Alcano sulfonatos
	Ácido sulfosuccínico de alquilo
	Sulfonatos de petróleo, lignina o éster
	Tauratos de acilo
	Aminoácidos N-acilados

Tabla 2.1 (Continuación)

Catiónicos	Sales cuaternarias de amonio alquílicas (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio)
	Sales de bencil alquil dimetil amonio (cloruro de benzalconio)
	Amidoaminas cuaternarias
	Compuestos cuaternarios de imidazol
	Esterquats
Anfóteros	Óxido de aminas
	Alquilamino ácidos
	Alquilbetaínas
	Alquilaminobetaínas
	Derivados anfóteros de imidazol
	Lecitina
No iónicos	Alcoholes, alquifenoles, ácidos, alcanolaminas, aminas y ésteres etoxilados
	Alcanolaminas de ácidos grasos
	Ésteres de compuestos polihidroxisilados
	Polisorbatos
	Poliglicósidos alquílicos
	Óxido de etileno / óxido de propileno
	Copolímeros de bloque

(Cal-y-Mayor-Luna, 2017)

2.2.2 Repercusiones de los surfactantes químicos

La mayoría de los surfactantes comerciales son de naturaleza química, producidos a base de petróleo, y por lo general son contaminantes para el medio ambiente, por consiguiente, generan problemas ecológicos. En específico al aplicarse en la limpieza, las sustancias que se filtran llegan a ser absorbidas en verduras, frutas, pescado y otros productos alimenticios que terminan afectado a los consumidores (Van Bogaert et al., 2007). Además, se ha reportado un problema donde este tipo de tensoactivos muestran comportamientos de degradación y toxicidades que afectan diversas especies procariotas, animales y vegetales (Jardak et al., 2016).

Jardak et al (2016) reportaron afecciones en una amplia variedad de especies procariotas y eucariotas por este tipo de compuestos químicos, entre las que se encuentran:

- Bacterias: *Vibrio fischeri*, *Photobacterium phosphoreum*, *Azobacter sp.* y *Dunaliella sp.*
- Algas: *Scenedesmus subspicatus*, *Selenastrum*, *Pseudokirchneriella subcapitata* y *C. vulgaris*.
- Crustáceos: *Arcatia tonsa* y *Daphnia magna*.
- Organismos superiores: *Eisenia foetida*, *Lumbricus terrestres*, *Platynothrus peltifer*, *Brassica rapa* e *Isotoma viridis*.
- Invertebrados: *Folsomia fimetaria* y *Folsomia candida*.
- Plantas: *Malva pusilla*, *Solanum nigrum*, *Chenopodium álbum* y *Ryegrass lolium*.

2.3 Biosurfactantes

En la actualidad, existen estudios enfocados en reemplazar a los surfactantes sintéticos por surfactantes de origen biológico (Camilios Neto et al., 2008). Una alternativa de los productos químicos son los biosurfactantes ya que estos se caracterizan por su biodegradabilidad, baja ecotoxicidad, menor concentración crítica micelar, producción basada en recursos renovables y diversidad estructural, actividad tensoactiva, estabilidad en condiciones extremas de temperaturas, pH, fuerza iónica y concentración salina (George & Jayachandran, 2013; Paulino et al., 2016; Schultz & Rosado, 2019; Van Bogaert et al., 2007).

Los biosurfactantes son un grupo de diferentes compuestos anfifílicos con la capacidad de reducir la tensión superficial e interfacial de sistemas, así como actividad emulsificante (Paulino et al., 2016). Son metabolitos secundarios extracelulares producidos principalmente por bacterias, hongos y levaduras (Hamzah et al., 2013) . Estas moléculas tensoactivas también tienen propiedades de detergencia, humectación, formación de espuma, entre otras; además suelen ser biocompatibles y biodegradables gracias a su estructura química y a que son sintetizados por organismos biológicos (Cal-y-Mayor-Luna, 2017; Moya Ramírez et al., 2015).

Estos compuestos se producen cuando los microorganismos crecen en medios que presentan sustancias de naturaleza hidrófoba como aceites o hidrocarburos, así como a partir de sustratos como carbohidratos, glicerol y desechos agroindustriales (Cal-y-Mayor-Luna, 2017; Thavasi et al., 2011; Wang et al., 2007).

Tienen naturaleza anfipática, donde las partes hidrofílicas pueden ser mono, oligo o polisacáridos, péptidos o proteínas, y las hidrofóbicas están constituidas por alcoholes o ácidos grasos, saturados, insaturados o hidroxilados (Cal-y-Mayor-Luna, 2017; Pacwa-Płociniczak et al., 2011). Por lo general estos compuestos son producidos por microorganismos que forman estructuras químicas, como ramnolípidos, fosfolípidos, lipoproteínas y polímeros y la mayoría son aniónicos o neutros (Dobler et al., 2016).

Los biosurfactantes pueden ser producidos por varios sustratos, principalmente recursos renovables como los aceites vegetales usados y residuos agroindustriales en el medio de cultivo, que además del beneficio ambiental conllevan una reducción en el aspecto económico de la producción volviéndolo más atractivo a gran escala, pero que poco se ha reportado (Abalos et al., 2001; Paulino et al., 2016).

2.3.1 Clasificación de los biosurfactantes

Los biosurfactantes pueden clasificarse de diversas formas, Pacwa-Płociniczak et al (2011) clasifican a los biosurfactantes por su peso molecular, estructura química, origen microbiano, modo de acción y propiedades fisicoquímicas, siendo las dos primeras las más utilizadas.

Según su peso molecular, pueden ser de bajo y alto peso, siendo los primeros el grupo más estudiado y que agrupa dos subclasificaciones: los glucolípidos y los lipopéptidos, que a su vez se clasifican en varias familias como soforolípidos, lípidos de trehalosa o Trehalolípidos, ramnolípidos, surfactinas, entre otros (Paulino et al., 2016).

Otra clasificación importante, aunque poco específica, es según la carga de su grupo polar o hidrofílico pueden ser: aniónicos, catiónicos, anfóteros y no iónicos. (Pacwa-Płociniczak et al., 2011).

Según su estructura química se dividen en glucolípidos (lípidos de manosil eritriol, soforolípidos, ramnolípidos y lípidos de trehalosa), lipopéptidos/lipoaminoácidos (surfactina, lípidos de lisina lípidos de ornitina), polímeros (lipoproteínas, polisacáridos y lipopolisacáridos) y aceites (glicerolípidos, fosfolípidos y ácidos grasos) (Cal-y-Mayor-Luna, 2017; Müller et al., 2012).

Los biosurfactantes glucolipídicos son el tipo de biosurfactantes de peso molecular más común (Paulino et al., 2016; Shoeb et al., 2013). Su estructura está conformada por un residuo hidrofóbico formado en una larga cadena de ácido graso alifático, insaturado o hidroxilado, unido mediante un enlace éster o éter a un carbohidrato hidrofílico que puede ser mono, di, tri o tetrasacáridos de glucosa, manosa, galactosa o ramnosa (Abdel-Mawgoud et al., 2011; Cal-y-Mayor-Luna, 2017; Paulino et al., 2016).

Según Paulino et al, (2016) y Rahman & Gapke, (2008), los biosurfactantes glucolipídicos más estudiadas son los ramnolípidos, soforolípidos, lípidos de trehalosa y lípidos de manosileritriol.

Los ramnolípidos son compuestos que consisten en un grupo hidrofílico de una o dos moléculas de L-ramnosa unidas a un grupo hidrofóbico de ácidos grasos β -hidroxi, generalmente producidos por *Pseudomonas sp.* (Paulino et al., 2016).

Los soforolípidos son producidos principalmente por levaduras *Candida sp.*, cuando son cultivadas en medios que contienen carbohidratos y sustratos lipofílicos. Se presentan en forma de disacáridos de soforosa unidos glucosídicamente al grupo hidroxilo de un ácido graso (Mnif & Ghribi, 2016).

Por su parte, los lípidos de trehalosa son una amplia variedad de glucolípidos que consisten de una trehalosa unida a ácidos micólicos. Se producen principalmente por bacterias de tipo Gram-positivo como *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*, difiriendo en cuanto su estructura, tamaño y saturación (Mnif & Ghribi, 2016).

Finalmente, los lípidos de manosileritriol (MEL) son una familia de biosurfactantes no iónicos que contienen manopiranosil-meso-eritriol como residuo hidrofílico y un ácido graso y grupos acetilo en la unidad hidrofóbica. Se producen principalmente por *Pseudozyma sp.*, *Ustilago sp.* y otras levaduras y hongos filamentosos (Paulino et al., 2016).

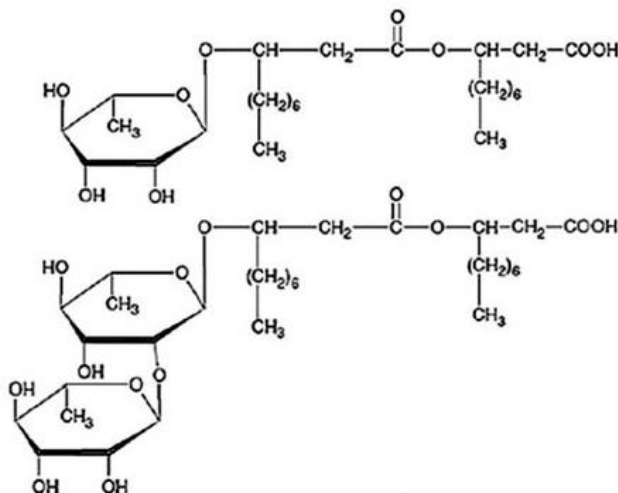
2.3.2 Ramnolípidos

Los ramnolípidos son biosurfactantes de tipo glucolípido de carga negativa que tienen de origen microbiano, ya que son producidos por microorganismos como *Pseudomonas sp.*, *Burkholderia sp.*, *Myxococcus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Acinetobacter sp.*, entre otros (Müller et al., 2012; Paulino et al., 2016).

Son moléculas de una (monoramnolípidos) o dos (diramnolípidos) unidades de L-ramnosa enlazadas a un ácido β -hidroxidecanoico saturado o insaturado (Banat et al., 2000; Paulino et al., 2016). Estas uniones se forman mediante un enlace glucosídico entre el grupo hidroxilo de un ácido β -hidroxidecanoico con el disacárido (Cal-y-Mayor-Luna, 2017; Shoeb et al., 2013). Las estructuras de los dos tipos de ramnolípidos se muestran en la Figura 2.2.

Figura 2.2

Estructura de los mono y diramnolípidos



Fuente: Giraldo et al, (2014)

En los estudios que se han realizado sobre estos ramnolípidos, según Giraldo et al, (2014) y Müller et al, (2012), han sido identificados hasta 60 homólogos, los cuales presentan tensiones superficiales de 29 mN/m que son características de compuestos que contienen ramnosa unida a un ácido hidroxidecanoico de tipo alfa.

En algunos procesos de producción de tipo fermentativo, se pueden obtener gran variedad de análogos ramnolipídicos, principalmente los monoramnolípidos Ramnosil- β -hidroxidecanoato (Rha-C10) y Ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (Rha-C10-C10), así como los diramnolípidos Ramnosil-ramnosil- β - hidroxidecanoato (Rha-Rha-C10) y Ramnosil-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (RhaRha-C10-C-10) (Abdel-Mawgoud et al., 2011; Liepins et al., 2021; Paulino et al., 2016). Su proporción depende de la composición del medio, el microorganismo productor y las condiciones de fermentación (Clarke et al., 2010).

Estas moléculas tienen la capacidad de formar emulsiones con gran estabilidad de compuestos hidrofóbicos en soluciones acuosas ya que reducen la tensión superficial del agua de 72 a aproximadamente 30 mN/m, variando según el homólogo utilizado y exhibiendo también altos valores de emulsificación de entre 60 y 70% (Costa et al., 2006; Müller et al., 2012). Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados se enfocan en mezclas de ramnolípidos diferentes, y no pueden describir estas propiedades según cada análogo en su forma individual debido a la dificultad en los métodos de purificación (Paulino et al., 2016).

Abdel-Mawgoud et al, (2011) resaltan la importancia de que estos metabolitos pueden ser obtenidos en rendimientos altos al aplicar un proceso de corta duración utilizando un microorganismo de fácil cultivo y, además, se relacionan con los factores de virulencia del mismo, por lo que se puede considerar que algunos aspectos de su síntesis ya hayan sido estudiados previamente.

En los últimos años, los ramnolípidos se han considerado como una muy prometedora clase de biosurfactantes debido a que tienen propiedades de gran interés en aplicaciones industriales y pueden fungir como una alternativa sustentable frente a los surfactantes sintetizados químicamente, más allá de su gran actividad superficial y emulsificantes presentan baja toxicidad y alta biodegradabilidad, lo que los hace aplicables en procesos como

biorremediación, formulaciones cosméticas y detergentes, así como su papel como aditivos de alimentos y medicamentos, lo que les pronostica un uso importante a futuro (Costa et al., 2006; Dobler et al., 2016b; Lovaglio et al., 2011; Paulino et al., 2016; Sekhon-Randhawa & Rahman, 2014).

En la Tabla 2.2 se muestran las principales aplicaciones de los ramnolípidos en diversos rubros industriales:

Tabla 2.2

Aplicaciones de los ramnolípidos.

Aplicación	Descripción
Farmacéuticas y terapéuticas	Los ramnolípidos muestran baja toxicidad, propiedades de actividad de superficie y propiedades antimicrobianas contra varios microorganismos.
Cosméticos	Los ramnolípidos son un ingrediente que efectivo para los muchos tratamientos de piel como. cicatrizante con fibrosis reducida, cura de quemaduras y tratamientos de arrugas.
Agricultura	Los ramnolípidos se usan para la remediación de suelos, para mejorar la calidad del mismo, para la eliminación de patógenos vegetales, provocando la absorción de fertilizantes y nutrientes a través de las raíces y como biopesticidas
Detergentes y blanqueadores	Los ramnolípidos son emulsificantes naturales y agentes tensoactivos que conducen a formar parte de detergentes, productos para lavado de ropa, champús y jabones.
Biorremediación y recuperación de petróleo	Los ramnolípidos han mostrado excelentes propiedades de emulsificación, para remover petróleo crudo de suelos contaminados.

(Cal-y-Mayor-Luna, 2017)

En algunos experimentos de laboratorio, se encontró que los biosurfactantes ramnolipídicos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* tienen una mayor eficacia emulsionante al compararlos con los surfactantes sintéticos Tween 60, SDS-polioxietileno, mono-oleato de sorbitán y SDS-Pluronic F-68 (Mnif & Ghribi, 2016).

2.3.3 Microorganismos productores de biosurfactantes

Como se mencionó en los apartados anteriores, diferentes tipos de microorganismos tienen la capacidad de sintetizar a través de su metabolismo biosurfactantes de tipo glucolipídico, a continuación, se mencionan algunas de las especies productoras más representativas de acuerdo al tipo de biosurfactante según Cal-y-Mayor-Luna, (2017):

- Glucolípidos
 - Ramnolípidos: *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas sp.*
 - Trehalolípidos: *Mycobacterium tuberculosis*, *Rhodococcus erythropolis*, *Arthrobacter sp.*, *Nocardia sp.* y *Corynebacterium sp.*
 - Soforolípidos: *Torulopsis bombicola*, *Torulopsis petrophilum* y *Torulopsis apicola*.
 - Lípidos de manosileritriol: *Candida antarctica*.

- Lipopéptidos
 - Surfactina: *Bacillus subtilis*.
 - Liqueisina: *Bacillus licheniformis*.
 - Pumilacidina: *Bacillus pumilus*.

- Poliméricos:
 - Emulsan: *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1.
 - Alsan: *Acinetobacter radioresistens* KA-53.
 - Liposan: *Candida lipolytica*.
 - Manoproteínas: *Saccharomyces cerevisiae*.

- Aceite/membrana
 - Ácido corinomicólico: *Corynebacterium lepus* y *Penicillium spiculisporum*.
 - Fostaftiletanolamina: *Acinetobacter sp.* y *Rhodococcus erythropoli*.

2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa se encuentra entre los microorganismos patógenos más dominantes en los nosocomios a nivel global, provocando diversos tipos de infecciones como pueden llegar a ser la neumonía o bacteriemia, siendo esta de mayor complicación a causa de la resistencia intrínseca a antibióticos y a su capacidad de generar mecanismos de resistencia, lo cual genera un serio problema de salud pública debido a los elevados índices de mortalidad (Luján-Roca, 2014).

En 1882 Gessard, aisló por primera vez a *P. aeruginosa* en un cultivo puro de heridas cutáneas (Wilson & Dowling, 1998). Se trata de un bacilo recto o levemente curvo Gram negativo, el cual pertenece a la familia *Pseudomonaceae*, con una dimensión de 2 a 4 x 0,5⁻¹ micras, y con un flagelo polar el cual le permite movilidad. Es aerobio, con capacidad de poder desarrollarse en condiciones anaerobias por medio del uso de nitrato, catalasa positiva y oxidasa positiva (Luján-Roca, 2014). Tiene gran capacidad para adaptación y puede crecer a temperaturas de más de 42 °C; habita comúnmente en agua, suelos y plantas (Kerr & Snelling, 2009). Se considera un patógeno oportunista, causa una amplia gama de infecciones, principalmente nosocomiales (Berthelot et al., 2005).

P. aeruginosa genera una cantidad amplia de factores de virulencia, por esta razón, su patogénesis se describe como multifactorial. Siendo parte de estos factores el flagelo, fimbrias, pili, matriz exopolisacárida, toxinas, exoenzimas, biopelículas y los recientemente estudiados biosurfactantes (Luján-Roca, 2014).

2.4.1 Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa*

En 1949 Jarvis y Jonson demostraron que *Pseudomonas aeruginosa* era capaz de producir biosurfactantes de tipo ramnolipídico, teniendo como precursores anabólicos ácidos hidroxialcanoicos (HAA) que también tienen propiedades tensoactivas (Déziel et al., 2003). Estos ramnolípidos han sido considerados como uno de los diversos factores de virulencia implicados en la formación de biopelículas, indispensables para que *P. aeruginosa* presente motilidad de tipo swarming (Déziel et al., 2003; Soberón-Chávez et al., 2005).

Dentro del grupo de microorganismos capaces de producir mediante su metabolismo a los ramnolípidos, se destaca *P. aeruginosa* mostrando un proceso mediante una síntesis *de novo* (Cal-y-Mayor-Luna, 2017).

Estos ramnolípidos suelen estar conformados por un dímero de ácidos β -hidroxidecanoicos tipo a través de un enlace glucosídico a un residuo de mono o diramnosa, aunque, en algunos casos sólo se presenta un solo ácido orgánico (Soberón-Chávez et al., 2005). Algunos estudios de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS) han detectado la existencia de más de 28 congéneres ramnolipídicos (Déziel et al., 1999). Dentro de su configuración, predomina la C10-C10 en las cadenas alquílicas, pudiendo variar según las condiciones de cultivo (Marchant & Banat, 2012).

Pseudomonas aeruginosa produce principalmente α -L-ramnopiranosil- α -L-ramnopiranosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato, de configuración Rha-Rha-C10-C10; y α -L-ramnopiranosil- α -L-ramnopiranosil- β -hidroxidecanoato, representado como Rha-Rha-C10; en conjunto con sus homólogos con estructura de monosacáridos Rha-C10-C10 y Rha-C10 (Cal-y-Mayor-Luna, 2017).

Según Soberón-Chávez et al., (2005) la síntesis de ramnolípidos se realiza mediante tres reacciones secuenciales desciadas del metabolismo central, donde participan diferentes ramnosiltransferasas. RhlA tiene participación en la síntesis del dímero de ácido graso y HAA libres, posteriormente RhlB cataliza una reacción unida a la membrana donde usa ramnosa desoxitimidina difosfato (dTDP-Lramnosa) y un HAA como precursores para producir monoramnolípidos. Finalmente RhlC utiliza estos compuestos como sustratos, junto con dTDP-Lramnosa para producir diramnolípidos con un control limitado de la proporción de producción de cada molécula a partir de factores externos. Además, se tiene una homología de secuencia con las mismas enzimas que se involucran en la síntesis de lipopolisacáridos (Déziel et al., 2003; Marchant & Banat, 2012; Rahim et al., 2001). La dTDP-Lramnosa se produce a partir de glucosa 1-fosfato mediante una cadena de reacciones catalizadas por enzimas de la ruta Entner-Doudoroff y gluconeogénesis (Bazire & Dufour, 2014; Cal-y-Mayor-Luna, 2017; Dobler et al., 2016b).

La síntesis de los residuos lipídicos de la molécula de ramnolípido diverge de la ruta general de ácidos grasos de este microorganismo (Soberón-Chávez et al., 2005), es decir, las fracciones lipídicas de los ramnolípidos se producen por una síntesis de ácidos grasos nuevos y no por aquellos catabolizados en la ruta de β -oxidación (Cal-y-Mayor-Luna, 2017; Zhang et al., 2012). Soberón-Chávez et al, (2005) determinaron que RhlA es la enzima responsable de la síntesis de HAA y de la fracción de ácido graso de estos biosurfactantes. También la enzima RhlG tiene gran importancia en este proceso, ya que es la responsable de llevar a los precursores de los ácidos grasos ramnolipídicos fuera de la biosíntesis general. Esta enzima está involucrada también en la síntesis de polihidroxicanoatos (Déziel et al., 2003; Soberón-Chávez et al., 2005).

Se ha observado un complejo mecanismo de regulación que se controla por las rutas metabólicas de comunicación intracelular dependientes de *Quorum Sensing*, siendo estos dos sistemas que se activan al cultivar la bacteria en condiciones nutrimentales limitantes repercutiendo directamente en la producción de ramnolípidos (Abdel-Mawgoud et al., 2011; Cal-y-Mayor-Luna, 2017; Wittgens et al., 2011). Esta respuesta regula a nivel transcripcional la producción de diversos rasgos asociados con la virulencia microbiana y algunos otros genes adicionales (Van Delden & Iglewski, 1998).

La producción de ramnolípidos se realiza en el inicio de la fase estacionaria, por lo que se consideran metabolitos secundarios y requiere condiciones de crecimiento específicas (Soberón-Chávez et al., 2005). Esta puede llevarse a cabo a partir de sustratos como succinato, piruvato, citrato, fructosa, glicerol, glucosa y manitol (Cal-y-Mayor-Luna, 2017); sin embargo, se observa mayor productividad utilizando aceites de origen vegetal como el de soja, maíz, canola y oliva (Soberón-Chávez et al., 2005). Gracias a la síntesis *de novo* de la fracción lipídica, estas fuentes de carbono no afectan la composición de los biosurfactantes producidos (Déziel et al., 1999).

Algunos otros factores, además del sustrato, influyen en la composición y rendimiento productivo de los ramnolípidos, entre ellos se encuentran el diseño y estructura del fermentador, pH, concentración de oxígeno, composición de nutrientes, sustratos, temperatura y agitación (Dobler et al., 2016).

2.5 Actividad antimicrobiana

Debido a la alta tasa de resistencia que han demostrado los microorganismos patógenos alrededor del mundo en los últimos años, se han dirigido múltiples investigaciones que tienen como objetivo encontrar una alternativa a las terapias antimicrobianas clásicas que utilizan antibióticos. El problema de la resistencia microbiana es competente de la salud pública mundial debido a los perjuicios en la salud de las personas y los costos que implican estos tratamientos (Rodríguez-Pava et al., 2017).

Algunos organismos internacionales, incluyendo la Organización Mundial de la Salud (OMS) han establecido que algunas herramientas de bioprospección y uso de recursos y productos de origen biológico pueden fungir como las alternativas de tratamiento que se buscan; se han estudiado con este fin plantas y microorganismos así como sus derivados, es decir, extractos, metabolitos o productos microbianos (Rodríguez-Pava et al., 2017).

Los biosurfactantes, en específico los ramnolípidos, tienen múltiples propiedades, como se mencionó en el apartado 1.3.2, y también pueden ser considerados como alternativas para los medicamentos y agentes antimicrobianos sintéticos, por lo que representan una alternativa al usarse como agentes terapéuticos seguros y efectivos (Lotfabad et al., 2013).

2.5.1 Efecto antagónico de los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa*

Se han realizado estudios previos sobre la actividad antimicrobiana de los ramnolípidos producidos por las cepas de *P. aeruginosa* que demuestran diferencias entre los requerimientos de concentración mínima inhibitoria (CMI) dependiendo de la cepa encargada de la producción. La cepa MR01 mostró actividad inhibitoria a concentraciones variadas, como el caso de *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e incluso la misma *Pseudomonas aeruginosa* que requirieron más de 512 µg/ml de biosurfactante; *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* a 128 µg/ml; y finalmente *Micrococcus luteus* que requirió una concentración de 32 µg/ml para lograr su inhibición (Lotfabad et al., 2013).

En el mismo estudio Lotfabad et al (2013) encontraron que el biosurfactante producido por la cepa MASH1 de *P. aeruginosa* podía inhibir a los mismos microorganismos, pero con requerimientos diferentes en la concentración del ramnolípido; en este caso de la concentración mínima requerida fueron 64 µg/ml para actuar contra *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* y *Micrococcus luteus*; *Bacillus subtilis* fue el único en el que la CMI fue de 128 µg/ml; mientras que se requirieron 512 µg/ml para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Se reportó que el ramnolípido de la cepa 47T2 puede ejercer antagonismo contra una gran variedad de bacterias, pero con requerimientos menores de concentración, como *Klebsiella pneumoniae* que su CMI fue sólo de 0.5 µg/ml o *Enterobacter aerogenes* que requiere 4 µg/ml; también *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis* que presentaron CMI bajas, 8 y 16 µg/ml respectivamente; algunas otras especies tuvieron CMI de 32 µg/ml como *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*, *Alcaligenes faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Bacillus cereus* y *Micrococcus luteus* presentaron inhibición con 64 µg/ml; *Salmonella typhimurium*, *Bordetella bronchiseptica*, *Arthrobacter oxydans*, *Mycobacterium phlei* y *Clostridium perfringens* presentaron requerimientos de 128 µg/ml; finalmente *Pseudomonas aeruginosa* fue inhibida con la presencia de 256 µg/ml del biosurfactante y *Proteus mirabilis* con una concentración mayor a esta (Haba et al., 2003).

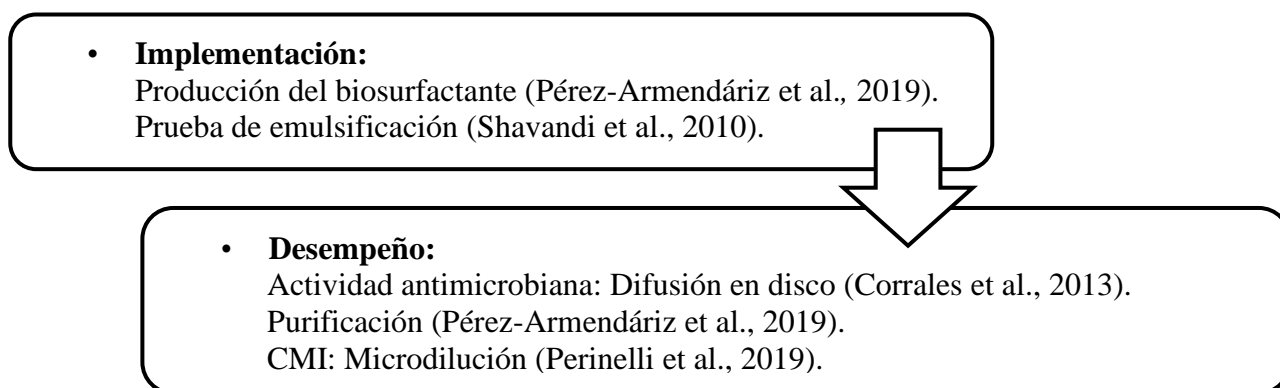
Otros estudios realizaron pruebas verificando la inhibición de una menor cantidad de microorganismos, pero obtuvieron resultados positivos. Por ejemplo, en el caso del estudio de la actividad antimicrobiana del ramnolípido producido por *P. aeruginosa* AT10 se logró observar la inhibición de *Escherichia coli* y *Alcaligenes faecalis* a una concentración de 32 µg/ml, además de *Serratia marcescens* que requirió 16 µg/ml (Abalos et al., 2001). Además, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* mostraron requerimientos de 250 y 500 µg/ml respectivamente para ser inhibidos por el biosurfactante de la cepa OBP1 (Bharali et al., 2013).

III. METODOLOGÍA

Los experimentos de este trabajo de investigación se realizaron en dos etapas: la primera fue la fase de implementación y la segunda la de desempeño. El orden y los procedimientos de cada una se indican en la Figura 3.1.

Figura 3.1

Diagrama del proceso experimental



3.1 Microorganismos y medios de cultivo

Para realizar los experimentos se utilizaron dos cepas de *Pseudomonas aeruginosa* una de ellas fue la cepa ATCC 27853 y la segunda fue la cepa MK307837, esta última fue identificada y utilizada en Pérez-Armendáriz (2019).

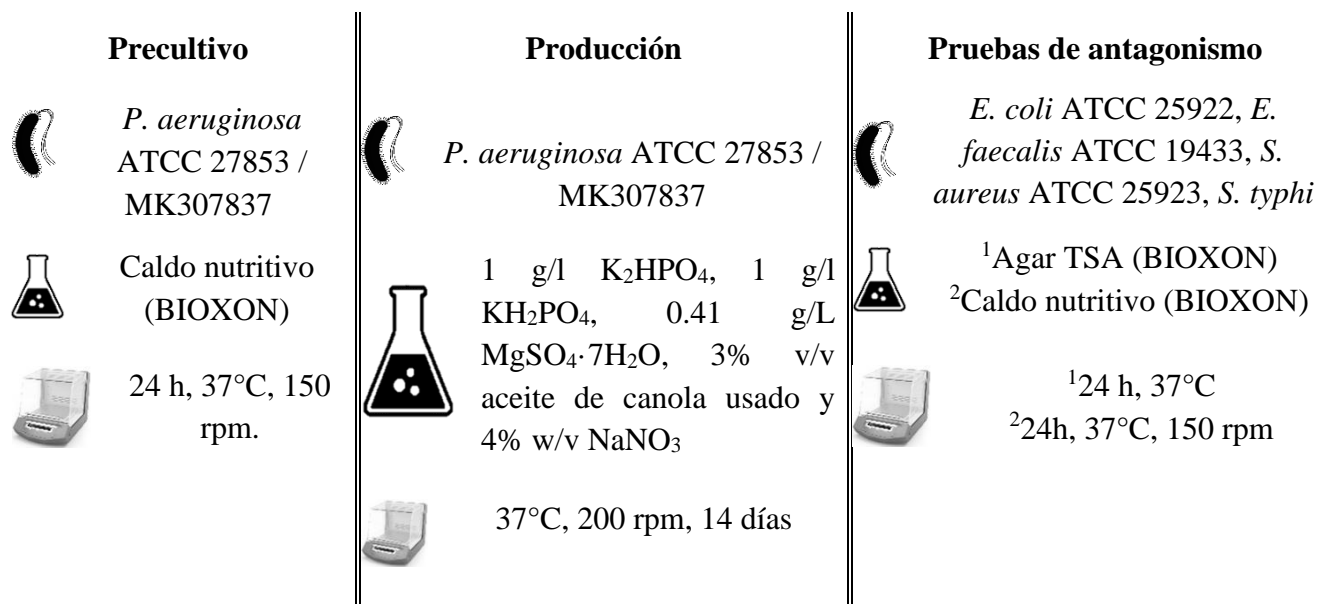
Para su activación las cepas fueron sembradas mediante una asada en Caldo nutritivo (BIOXON, México), cada una en un matraz de 250 ml que contenía 50 ml del medio antes mencionado e incubadas 24 h a 37°C y 150 rpm.

Para la producción de biosurfactante se utilizó el medio mineral con aceite de canola descrito en Pérez-Armendáriz (2019) que contiene: 1 g/l K_2HPO_4 , 1 g/l KH_2PO_4 , 0.41 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3% v/v aceite de canola usado y 4% w/v $NaNO_3$.

Se utilizaron las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Salmonella typhimurium* para las pruebas de actividad antimicrobiana, todas ellas fueron crecidas en Agar TSA (BIOXON, México) incubado a 37°C durante 24 h y posteriormente se inocularon matraces de 150 ml que contenían 50 ml de Caldo nutritivo (BIOXON, México) con una colonia crecida en el agar anterior y fueron incubados 24 h a 37°C y 150 rpm. Una vez terminada la incubación se igualaron las DO λ 565nm de los cultivos de las cuatro cepas patógenas.

Figura 3.2

Microorganismos y medios de cultivo



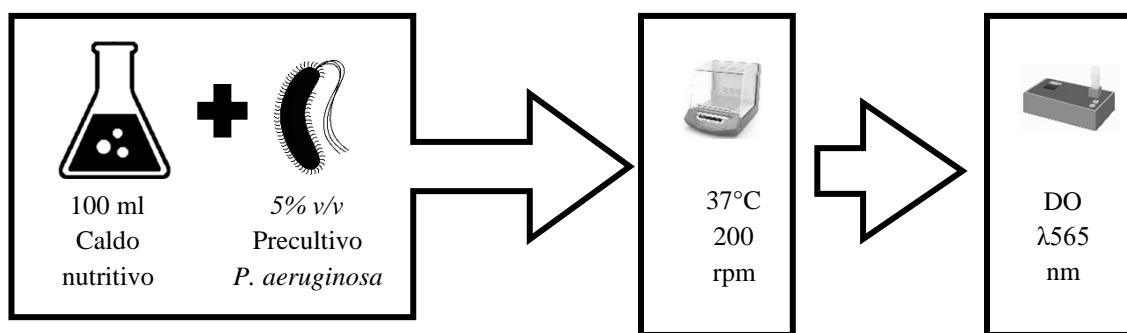
3.2 Condiciones de inoculación

Se inoculó a una concentración 5% (v/v) un matraz de 250 ml que contenía 100 ml de caldo nutritivo (BIOXON, México) con un cultivo de 24 h de *P aeruginosa* ATCC 27853 (Pérez-Armendáriz et al., 2019) con una DO λ 565nm inicial de 0.013. El cultivo se incubó a 37°C con agitación a 200 rpm en una incubadora Benchmark Incu-Shaker hasta que la DO λ 565nm alcanzó 0.752 ± 0.024 lo que corresponde a 1.54×10^8 UFC/ml e indica que el cultivo se encuentra en fase exponencial según su modelo de crecimiento (Pérez-Armendáriz et al., 2019) como se muestra en la Figura 3.3.

Este procedimiento se realizó también para la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* MK307827 con una DO $\lambda 565\text{nm}$ inicial de 0.014 incubando hasta una DO $\lambda 565\text{ nm}$ de 0.721 que corresponde a 1.48×10^8 UFC/ml encontrándose en la misma fase de la curva de crecimiento que la otra cepa. Los productos de ambos cultivos se utilizaron como inóculo para la producción de biosurfactante.

Figura 3.3

Condiciones de inoculación



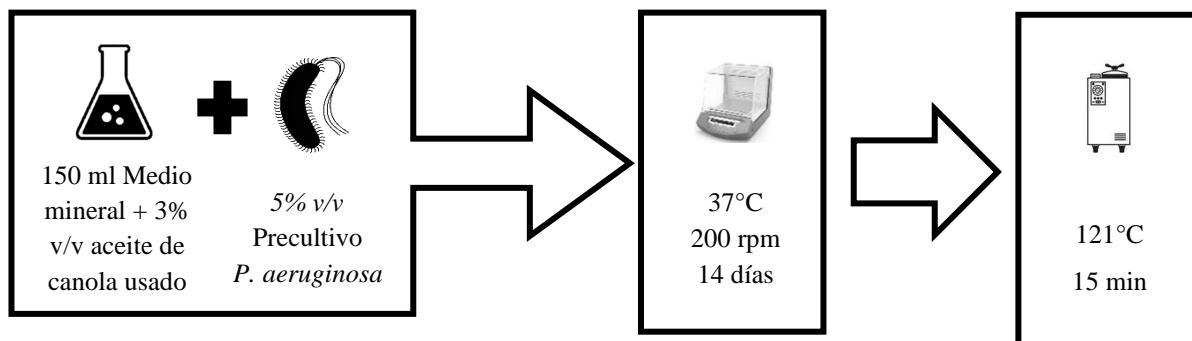
3.3 Producción de biosurfactante

Para la producción de biosurfactante se inoculó un matraz Erlenmeyer de 500 ml que contenía 150 ml de medio de cultivo mineral esterilizado en autoclave que contenía: 1 g/l K_2HPO_4 , 1 g/l KH_2PO_4 , 0.41 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3% v/v aceite de canola usado y 4% w/v NaNO_3 (Pérez-Armendáriz et al., 2019), tal como se indica en el apartado 3.1, a una concentración 5% (v/v) de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en crecimiento exponencial. Se incubó a 37°C con agitación a 200 rpm en una incubadora Benchmark Incu-Shaker durante 14 días. Estos mismos pasos se realizaron la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* MK307837.

Este procedimiento, ilustrado en la Figura 3.4, se realizó por triplicado para cada cepa y posterior a la incubación los cultivos fueron inactivados en autoclave a 121°C para su manejo como biosurfactante crudo.

Figura 3.4

Producción del biosurfactante



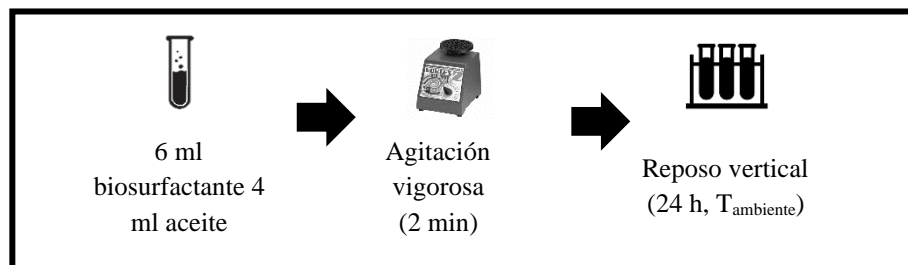
3.4 Actividad emulsificante

La actividad de emulsificación se determinó mediante la adición de 6 ml de biosurfactante crudo a 4 ml de aceite de canola usado en un tubo con rosca graduado de 15 ml, se agitó vigorosamente en un vórtex durante 2 min y se dejó el tubo verticalmente en reposo durante 24 h a temperatura ambiente.

Una vez cumplido el periodo de reposo la actividad de emulsificación se calculó dividiendo la altura medida de la capa de emulsión entre la altura total de la mezcla y se multiplicó por 100, obteniendo un valor porcentual (Shavandi et al., 2011). En la Figura 3.5 se muestra el procedimiento correspondiente a esta etapa experimental.

Figura 3.5

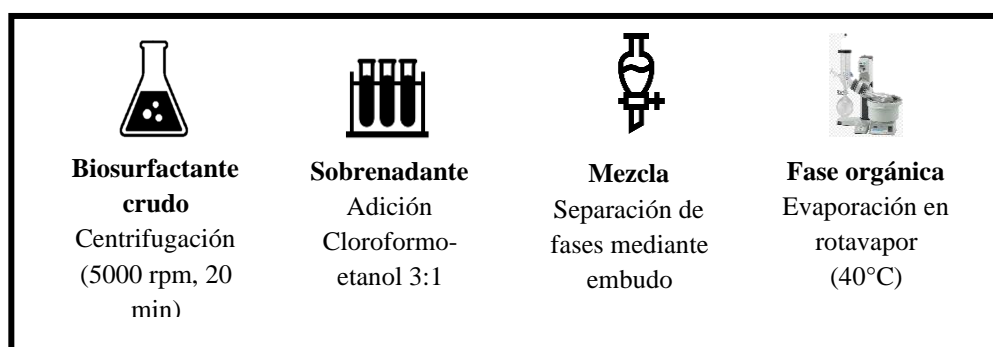
Actividad emulsificante



3.5 Purificación del biosurfactante

Para cada producto del proceso de producción de biosurfactante realizados por triplicado se purificaron los ramnolípidos según el protocolo descrito por Pérez-Armendáriz et al. (2019). El biosurfactante crudo se centrifugó a 5000 rpm durante 20 min y el sobrenadante fue recuperado para después añadirle un volumen igual de solución cloroformo-etanol 3:1 y finalmente mezclarlos. La mezcla se vertió en un embudo de separación y la fase orgánica fue recogida del fondo. Este proceso se repitió hasta que no se observó la formación de emulsión. La fase recogida fue evaporada en un rotavapor a 40°C y los ramnolípidos se resuspendieron en agua destilada. El proceso descrito se resume en la Figura 3.6.

Figura 3.6
Purificación de los ramnolípidos



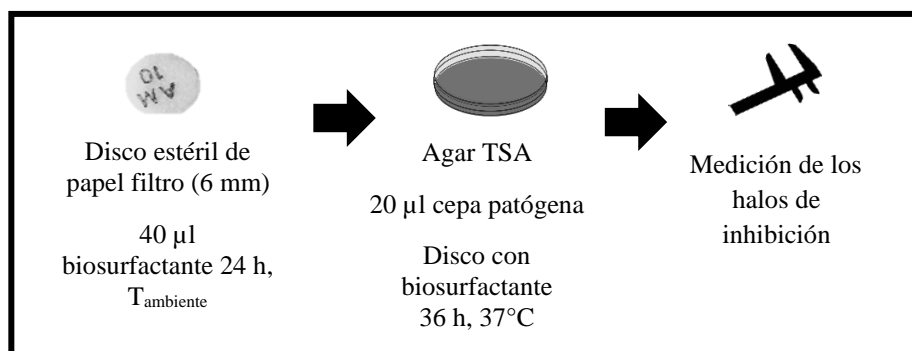
3.6 Actividad antimicrobiana

3.6.1 Difusión en disco

Para la prueba de Difusión en disco se esterilizaron discos con un diámetro de 6 mm de papel filtro mediante calor. Posteriormente se añadieron 40 µl de biosurfactante crudo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a 15 discos y se dejaron reposar durante 24 h, también se añadió el mismo volumen de biosurfactante crudo de *Pseudomonas aeruginosa* MK307837 a otros 15 discos.

Se inocularon cajas Petri que contenían 20 ml de Agar TSA (BIOXON, México) con 20 μ l de cultivo de una de las cepas patógenas designadas para este experimento, indicadas en el apartado 3.1, y se colocó un disco con biosurfactante en medio del área inoculada. Esto se repitió por triplicado para cada cepa y para cada biosurfactante, resultando 12 cajas Petri, 3 por cada cepa patógena, para cada uno de los biosurfactantes (Corrales et al., 2013). Finalmente, las cajas se incubaron por 36 h a 37°C para después medir el halo de inhibición formado utilizando un Calibrador Vernier Pretul. En la Figura 3.7 se muestra un diagrama del procedimiento descrito.

Figura 3.7
Difusión en disco



3.6.2 Concentración mínima inhibitoria

Para la prueba de Concentración mínima inhibitoria se realizó un pool de soluciones de biosurfactante purificado a diferentes concentraciones. Para cada biosurfactante se obtuvo una serie de 8 diluciones que resultan en concentraciones de 150, 120, 90, 60, 30, 20, 10 y 5 μ g/ 50 μ l utilizando el medio mínimo mineral descrito en el apartado 3.1 como diluyente.

Posteriormente se utilizaron microplacas de 96 pocillos estériles, una para cada cepa patógena de las indicadas para este experimento en el apartado 3.1, y éstas fueron llenadas según el diseño observado en la Tabla 3.1; se utilizó como blanco, en la Columna 1 Filas de la A a la H, 200 μ l de Caldo nutritivo estéril (BIOXON, México); como control positivo, en la

Columna 2 Filas de la A a la H, 180 μ l de Caldo nutritivo estéril (BIOXON, México) con un inóculo de 20 μ l de cultivo de la cepa correspondiente a la microplaca.

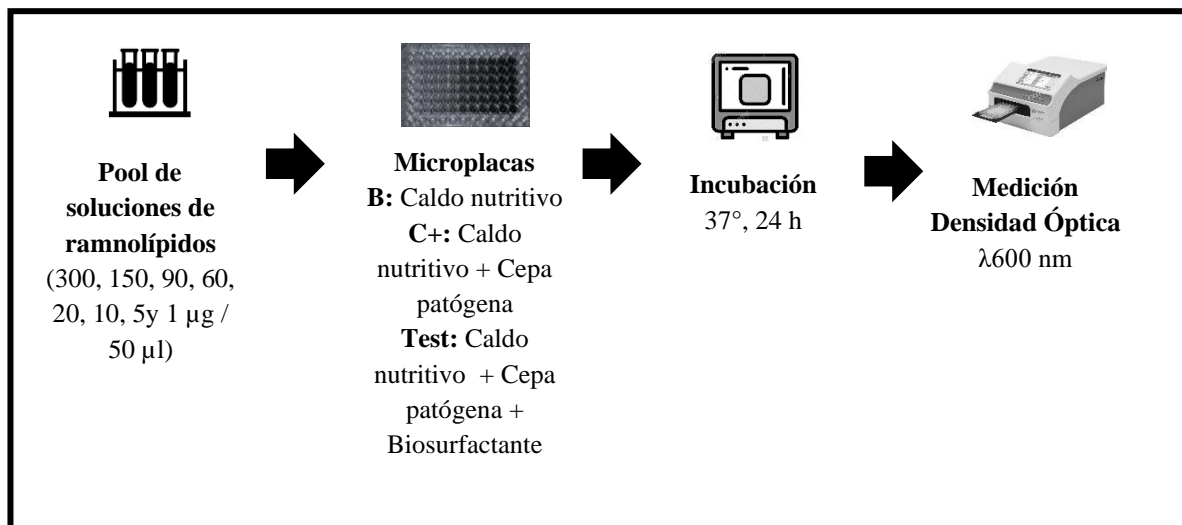
En la Columna 3 se añadió un volumen de 50 μ l de biosurfactante de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 del pool de las 8 diferentes diluciones, una concentración en cada una de las Filas, además de 130 μ l de Caldo nutritivo estéril (BIOXON, México) y 20 μ l de inóculo de la cepa patógena correspondiente a la microplaca. Esto también fue añadido en las Columnas 4 y 5 para obtener resultados por triplicado. Finalmente, en la Columna 6 se agregaron de 50 μ l de biosurfactante de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* MK307837 del la serie de 8 diluciones descrita anteriormente en este apartado, una concentración en cada una de las Filas, además de 130 μ l de Caldo nutritivo estéril (BIOXON, México) y 20 μ l de inóculo de la cepa patógena correspondiente a la microplaca. Al igual que con el biosurfactante de la otra cepa, esto fue añadido también en las Columnas 7 y 8 para obtener resultados por triplicado.

Las microplacas fueron incubadas a 37°C durante 24 h y posteriormente se leyó la DO λ 600 nm para determinar la Concentración mínima inhibitoria (CMI) en un Multiskan FC Thermo Scientific (Perinelli et al., 2019).

El protocolo de esta prueba, descrito anteriormente, se muestra en la Figura 3.8.

Figura 3.8

Concentración mínima inhibitoria



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Actividad emulsificante

La actividad emulsificante de los ramnolípidos mantiene una estrecha relación con la estabilidad de los mismos cuando se encuentran en condiciones de pH, temperatura, salinidad o presión elevadas y estos mantienen sus propiedades tensoactivas, traduciéndose en su satisfactoria aplicación en productos alimenticios, cosméticos, ambientales y farmacéuticos (Costa et al., 2006; Lovaglio et al., 2011; Nitschke et al., 2010; Rahman et al., 2002).

Para el día 7 de incubación, el biosurfactante crudo producido por la cepa MK307837 presentó una actividad emulsificante media de $64 \pm 2\%$, mientras que el producto de la cepa ATCC 27853 de *P. aeruginosa* tuvo una media de $3.35 \pm 0.05\%$ para esta prueba con base en el control positivo de surfactante químico en solución al 1% w/v de cuya actividad emulsificante fue tomada como referencia del 100%, como se muestra en la Figura 4.1.

Se realizó un análisis estadístico ANOVA unidireccional para la prueba a los 7 días de incubación, el cual determinó que los valores obtenidos para ambas cepas y el control fueron significativamente diferentes con una $P=0.0001$.

Además, se hicieron pruebas t-student para los resultados de la prueba a los 7 días de incubación, en el caso de la actividad emulsificante del biosurfactante crudo producido utilizando la cepa *P. aeruginosa* MK307837, éstos tuvieron una diferencia estadística significativa con el control, al igual que los producidos por la ATCC27853 con un valor de $P < 0.0001$ en ambos casos. Respecto a la comparación entre ambas cepas productoras, sus resultados también presentaron esta diferencia en el análisis para el test t.

Para el día 14, una vez terminado el periodo de incubación, se obtuvo una actividad emulsificante para los ramnolípidos producidos por la cepa MK307837 con una media de $54.4 \pm 2.2\%$, mientras que para los producidos por la ATCC 27853 la emulsificación observada tuvo una media de $68.83 \pm 4.4\%$, con base en el mismo control positivo de la prueba anterior. Estos valores también se muestran en la Figura 4.1.

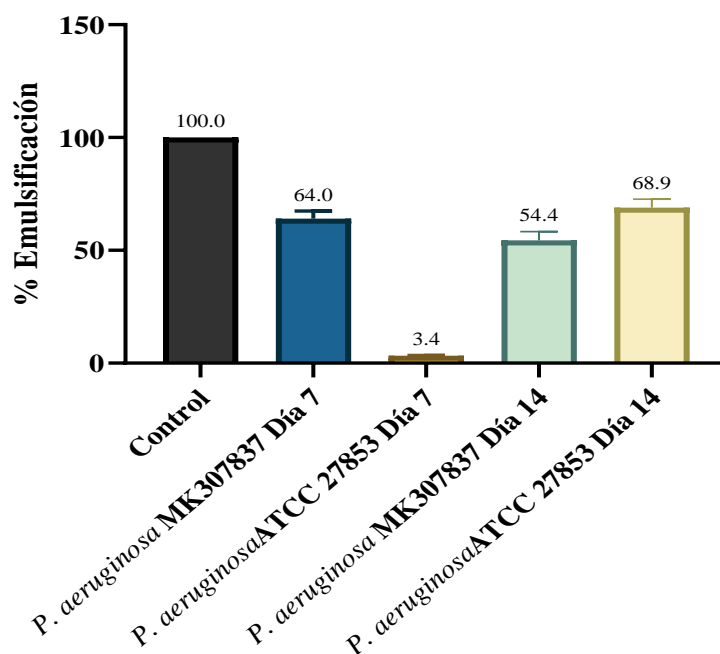
El análisis estadístico ANOVA de una vía determinó que los valores para la prueba de emulsificación de los biosurfactantes crudos de ambas cepas productoras y el control tuvieron una diferencia estadística significativa con un valor de $P < 0.0001$.

De igual forma que en el tiempo de incubación anterior, se realizó un análisis con la prueba t de student, que al comparar los resultados de la emulsificación de los ramnolípidos de *P. aeruginosa* MK307837 con el control encontraron una diferencia significativa con $P < 0.0001$. Por su parte, el mismo test, pero con los valores para el producto de la cepa ATCC27853 comparados con el control la diferencia estadística tuvo una menor significancia con una $P = 0.0002$.

Finalmente, al realizar el análisis estadístico entre los resultados de esta prueba para los biosurfactantes producidos por ambas cepas de *P. aeruginosa*, se encontró una diferencia significativa con $P = 0.0101$.

Figura 4.1

Actividad emulsificante de los ramnolípidos producidos por P. aeruginosa MK307837 y ATCC27853



Como se observa en la Figura 4.1, mientras que la actividad emulsificante de los ramnolípidos de la cepa MK307837 tuvo una cinética que concuerda con lo reportado por Pérez-Armendáriz et al, (2019), donde la producción de los mismos aumenta paulatinamente durante el periodo de incubación hasta el día 14 en el que este termina; la actividad emulsificante del biosurfactante producido por la cepa ATCC 27853 tuvo un crecimiento sustancial al finalizar la incubación teniendo una estabilidad de emulsión mínima para la primera muestra en el día 7. Sin embargo, los valores de esta prueba para ambas cepas en el día 14 se consideran como un rango alto de emulsificación de aceite para los biosurfactantes de *P. aeruginosa* estudiados, ya que son consistentes con los rangos encontrados por Aparna et al, (2012), Costa et al, (2006), Lovaglio et al, (2011) y Nitschke et al, (2010) que se sitúa entre 35 y 100%.

Lovaglio et al, (2011) reportaron una actividad de emulsificación máxima de ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* de 65.2% para aceite de soya, mientras que Rahman et al, (2002) obtuvieron una actividad de hasta el 73% de emulsificación de hidrocarburos con la cepa DS10-129 de la misma bacteria productora. En el caso de Nitschke et al, (2010), encontraron excelentes niveles de emulsificación para aceite de soya y aceite mineral, 100 y 71%, respectivamente, al probar ramnolípidos producidos en un medio que contenía aceite de soya como fuente de carbono. Todos estos son casos con condiciones de producción similares a las utilizadas en el presente trabajo, donde se utilizó la misma bacteria en dos cepas diferentes, y un medio de cultivo adicionado con aceite de canola, mostrando efectividad de emulsificación que concuerdan con las mencionadas por los autores anteriores.

Las diferencias de actividad emulsificante de los biosurfactantes crudos de ambas cepas concuerdan también con los variados porcentajes reportados en la bibliografía. Esta diferencia en la tasa de emulsificación puede estar relacionada con diferentes factores, principalmente con el contenido de monoramnolípidos y diramnolípidos que exista en la mezcla producida por cada cepa. Según Abdel-Mawgoud et al, (2009), los homólogos producidos por *P. aeruginosa* principalmente son de ramnosil- β -hidroxidocanoil- β -hidroxidocanoato, en el caso de los monoramnolípidos (MRL), y ramnosil-ramnosil- β -hidroxidocanoil- β -hidroxidocanoato para los diramnolípidos (DRL). Siendo los primeros precursores de los segundos y estos a su vez se producen en más cantidad en la mayoría de los casos (Déziel et al., 1999). El predominio de los congéneres ramnolípídicos depende de la cepa bacteriana

utilizada como productora, la fuente de carbono, el tiempo de incubación y otras condiciones de cultivo como el aporte de nutrientes, además, las proporciones de MRL y DRL cambian durante el tiempo de cultivo (Bharali et al., 2013; Müller et al., 2012).

Das et al, (2014) observaron que uno de sus biotensoactivos, que contenía mayor proporción de monoramnolípidos que diramnolípidos, exhibía los mejores potenciales de emulsificación, correlacionando así la bioactividad con la proporción de congéneres.

De igual manera, Abdel-Mawgoud et al, (2011) observaron que cuando el biosurfactante cuenta con mayor cantidad de especies con un anillo de ramnosa, la capacidad para mantener la estabilidad de los ramnolípidos en una fase acuosa formando emulsiones se ve aumentada, ya que los carbonos adicionales en las cadenas de ácidos grasos pueden afectar su hidrofobicidad.

De tal manera que se puede inferir que las cepas MK307837 y ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa* producen biosurfactantes con una mezcla de ramnolípidos con diferentes proporciones mono y diramnolipídicas, las cuales provocan que estos varíen en su actividad emulsificante. A pesar de ello, ambos biosurfactantes crudos fueron capaces de formar emulsiones altamente estables, lo cual sugiere un gran potencial para su uso en aplicaciones industriales, ambientales y farmacéuticas debido a su relación con la capacidad que tienen de soportar condiciones extremas de pH, temperatura, salinidad y presión (Lovaglio et al., 2011).

4.2 Actividad antimicrobiana: Difusión en disco

La prueba de actividad microbiana por difusión en disco es una técnica ampliamente utilizada para evaluar de manera cualitativa el efecto inhibitorio que provocan algunos compuestos sobre microorganismos categorizándolos como sensibles, intermedios o resistentes, según el tamaño del halo inhibitorio formado en la circunferencia del disco de difusión (Martínez-Martínez, 2016).

En este trabajo se evaluó el efecto de inhibición provocado por el biosurfactante crudo de ambas cepas de *P. aeruginosa* obtenido después de los 14 días de incubación y los halos de inhibición observados que se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1

Halos de inhibición producidos por los ramnolípidos contra bacterias patógenas

Bacterias patógenas	Halo de inhibición (cm)	
	MK307837	ATCC
<i>Escherichia coli</i>	0.85±0.05	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	1.85±0.05	1.05±0.05
<i>Enterococcus faecalis</i>	2.35±0.15	3.25±0.15
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.5±0.1	0

Escherichia coli presentó inhibición por el biosurfactante producido por la cepa MK307837 con un halo de 0.85±0.05 cm, que puede considerarse como una sensibilidad intermedia, tomando como referencia a Montero-Recalde et al, (2018). Por el contrario, se evidenció la resistencia de *E. coli* al producto de la cepa ATCC 27853. Estas variaciones de sensibilidad también fueron reportadas en la bibliografía, donde los ramnolípidos producidos por la cepa *P. aeruginosa* AT10 presentaron una inhibición alta a esta enterobacteria patógena, mientras que aquellos que fueron producidos utilizando la cepa MASH1 mostraron una baja sensibilidad (Abalos et al., 2001; El-Sheshtawy & Doheim, 2014; Lotfabad et al., 2013).

El análisis estadístico por t de student de las inhibiciones producidas por los biosurfactantes de las cepas MK307837 y ATCC 27853 mostró que existe una diferencia significativa entre la sensibilidad mostrada por *E. coli* para cada caso, con una P=0.0034.

Salmonella typhimurium presentó sensibilidad al biosurfactante de la cepa MK307837 con un halo de inhibición de 1.85±0.05 cm, así como una sensibilidad de nivel medio frente a los ramnolípidos producidos por la cepa ATCC 27853 con un halo de 1.05±0.05 cm. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Haba et al, (2003), quienes encontraron que esta bacteria fue medianamente sensible a los biosurfactantes de *P. aeruginosa* 47T2.

Se realizó el test t de student para los resultados obtenidos de la inhibición de *S. typhimurium* por los biosurfactantes crudos de ambas cepas, mostrando que existe una diferencia estadísticamente significativa en los halos producidos con una $P=0.0077$.

Enterococcus faecalis mostró una alta sensibilidad a los biosurfactantes producidos por *P. aeruginosa* MK307837 y ATCC 27853 con halos de inhibición de 2.35 ± 0.15 y 3.25 ± 0.15 cm respectivamente. Siendo esta última una de las más altas observadas en el conjunto de experimentos de la presente sección. En la bibliografía ha sido reportada una sensibilidad variante que es consistente con estos resultados, tal es el caso del biosurfactante producido por la cepa MASH1 de *P. aeruginosa*, que según los resultados de Lotfabad et al, (2013) tuvo una alta inhibición a *E. faecalis*, mientras que los propios de la cepa MR01 presentaron inhibiciones considerablemente bajas según el mismo autor.

En este caso, la prueba estadística t de student para las inhibiciones producidas por los productos de ambas cepas para *E. faecalis* mostraron que no hubo una diferencia significativa en la comparación de los resultados de ambas cepas con una $P=0.0513$.

Finalmente, en el caso de *Staphylococcus aureus*, esta bacteria mostró la mayor sensibilidad observada en el experimento, al presentar un halo de inhibición de 3.5 ± 0.1 cm producido por el biosurfactante de *P. aeruginosa* MK307837. Por el contrario, fue resistente a los ramnolípidos de la cepa ATCC 27853. Existen estudios en los que se reportaron variaciones en el nivel de sensibilidad de esta bacteria a los biosurfactantes de algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, tal es el caso de la cepa MASH1 y OBP1 donde las inhibiciones fueron bajas, mientras que para el producto de la cepa MR01 fue de nivel medio, y alto para los ramnolípidos propios de la cepa 4T2 (Bharali et al., 2013; Haba et al., 2003; Lotfabad et al., 2013).

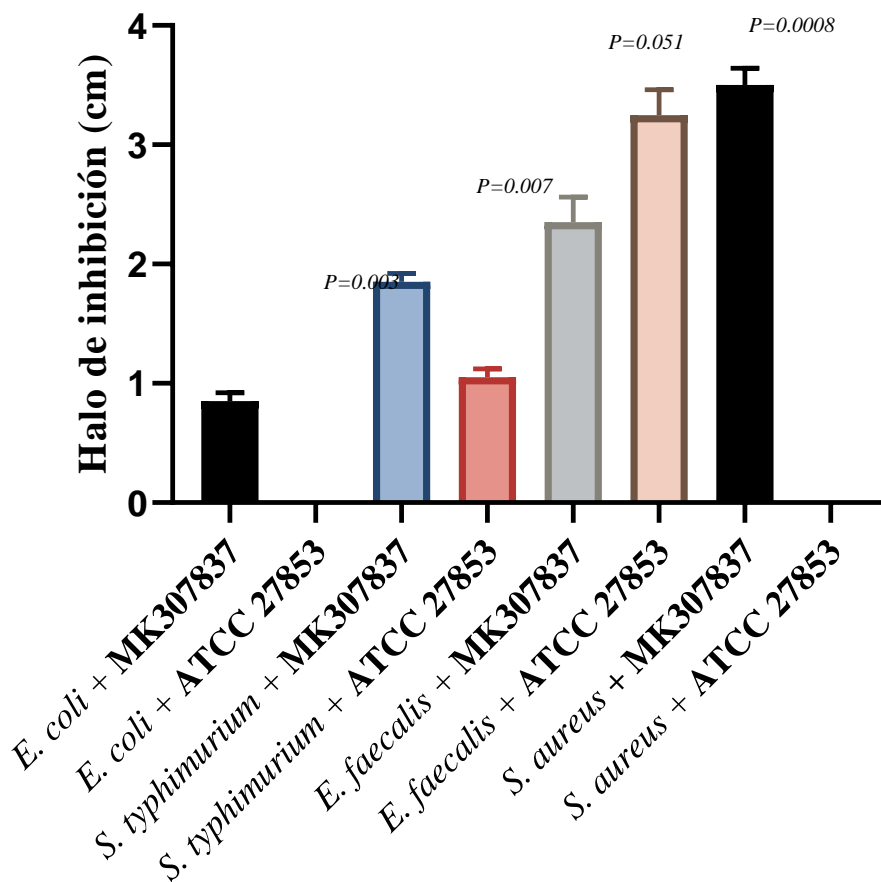
En este análisis estadístico, se observó que existió una diferencia significativa al comparar los resultados de las inhibiciones de los biosurfactantes de ambas cepas productoras contra la bacteria *S. aureus* con un valor de $P=0.0008$.

En la Figura 4.2 se puede observar un resumen de los resultados mencionados anteriormente donde se muestran una comparación de los halos de inhibición observados para cada especie

bacteriana patógena contra los biosurfactantes producidos por *P. aeruginosa* MK307837 y ATCC 27853, así como los valores de P de cada una de las pruebas estadísticas aplicadas a cada pareja. Las bacterias Gram negativas examinadas fueron inhibidas por los biosurfactantes producidos por la cepa MK307837, así como el crecimiento de las bacterias de tipo Gram positivo. Por otra parte, los ramnolípidos de la cepa ATCC27853 solamente tuvo efecto sobre *S. typhi* y *E. faecalis*, siendo ésta última la única en la que presentó una inhibición mayor, pero sin una diferencia con significancia.

Figura 4.2

Inhibición producida por los ramnolípidos contra bacterias patógenas



Según Bharali et al, (2013) la diversidad en la estructura de los biosurfactantes ramnolipídicos producidos por diversas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* les confiere un rendimiento y efecto antimicrobiano versátil. Por los resultados obtenidos en esta prueba se puede inferir, al igual que en la actividad emulsificante, que las proporciones de homólogos que se encuentran presentes en los productos de las cepas productoras pueden ser diferentes, ya que el efecto inhibitorio, a excepción del ejercido sobre *Enterococcus faecalis*, fue estadísticamente diferente en todos los casos.

En estudios previos se observó que la proporción de MRL y DRL tiene una relación directa con la acción antimicrobiana, ya que al aumentar la cantidad de especies con dos cabezas de ramnosa en la muestra, este efecto inhibitorio se veía reducido. Por otro lado, al aumentar la cantidad de monoramnolípidos en el biosurfactante probado, los diámetros de la zona de inhibición aumentaron considerablemente (Das et al., 2014). Esta información sustenta los resultados observados en la Figura 4.2 relacionándolos con los de la Figura 4.1, donde se observa una alta actividad emulsificante en el producto tras 14 días de incubación, y en este caso una actividad inhibitoria por difusión en disco igualmente alta, sobre todo en el caso de los ramnolípidos propios de la cepa MK307837. Esto puede deberse a que el incremento de la naturaleza hidrofóbica de la mezcla ramnolipídica que presenta mayor concentración de MRL, favorece su penetración a través de la pared celular afectando a la misma, cumpliendo así con el objetivo de los surfactantes químicos que es la superficie celular y las estructuras de las células microbianas. (Abalos et al., 2001; Das et al., 2014). Lo que también sustentaría el hecho de que las especies Gram positivas mostraron un efecto inhibitorio mayor, al naturalmente, carecer de la primera barrera de protección que es la membrana lipídica.

4.3 Actividad antimicrobiana: Concentración mínima inhibitoria

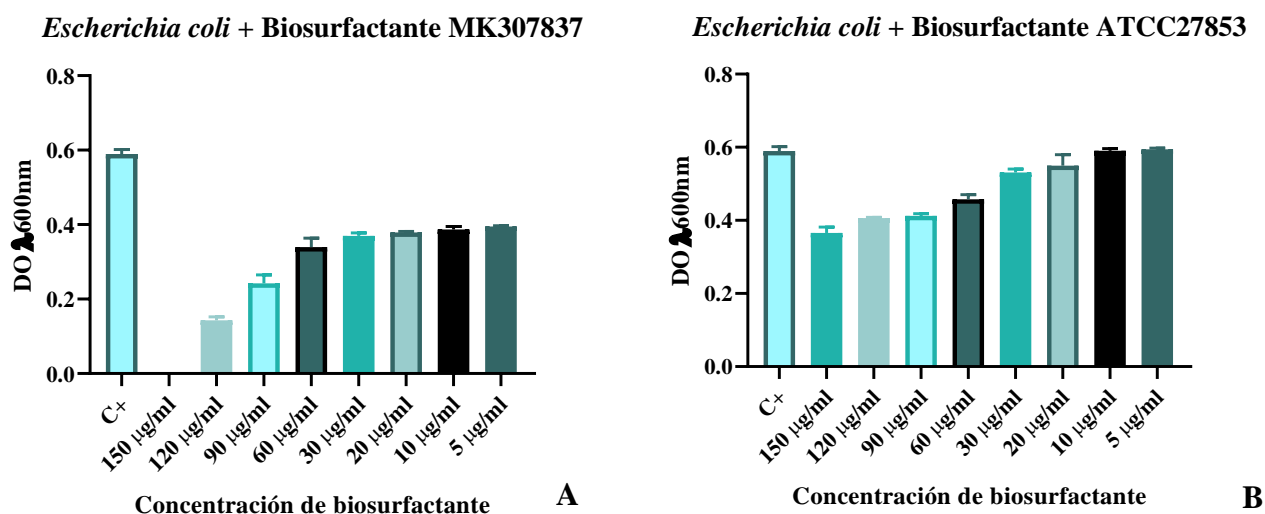
La concentración mínima inhibitoria se define como la menor concentración de una sustancia que sea capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18 a 24 horas de incubación (Sacsquispe Contreras & Velásquez Pomar, 2002).

Para la prueba de actividad antagonista contra la Gram negativa *Escherichia coli*, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 4.3. El biosurfactante producido por la cepa MK307837 de *Pseudomonas aeruginosa* inhibió el crecimiento de esta bacteria con una concentración mínima de 150 µg/ml, teniendo una inhibición del 50% de las cepas a los 74 µg/ml según una regresión lineal con $R^2=0.99$ (Figura 4.3.A). Por su parte, el producido por la cepa ATCC 27853 requirió de una CMI de 422 µg/ml para esta bacteria, y una CMI₅₀ de 196 µg/ml de acuerdo con la tendencia calculada con $R^2=0.91$ (Figura 4.3.B).

Estos requerimientos de concentración son menores a los que reportaron Benincasa et al, (2004) y Lotfabad et al, (2013) que se encontraban entre 250 y >512 µg/ml que fueron producidos por *P. aeruginosa* cepas LBI, así como MASH1 y MR01, pero mayores que los reportados por Abalos et al, (2001), Das et al, (2014) y Haba et al, (2003) donde los biosurfactantes de las cepas AT10, PAO1 y 47T2 presentaron CMI de 32, 30 y 64 µg/ml respectivamente para *E. coli*.

Figura 4.3

Concentración mínima inhibitoria de los ramnolípidos contra Escherichia coli

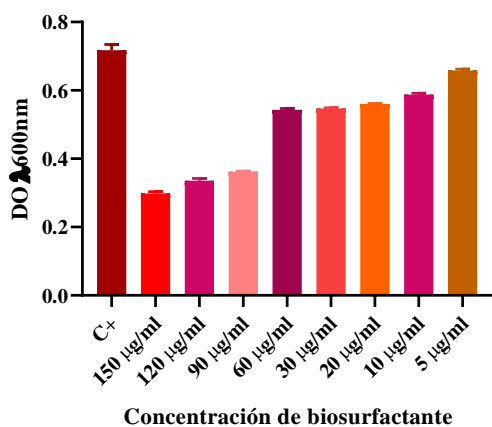


En el caso de la prueba contra la bacteria Gram negativa *Salmonella typhi*, los resultados observados se presentan en la Figura 4.4 donde el biosurfactante producido por *P. aeruginosa* MK207837 (Figura 4.4.A) requeriría una concentración de 418 $\mu\text{g/ml}$ para ejercer una actividad inhibitoria según la tendencia con una $R^2=0.99$ y una CMI_{50} de 92 $\mu\text{g/ml}$. Por otra parte, los ramnolípidos de la cepa ATCC27853 (Figura 4.4.B) requirieron una concentración mínima de 243 $\mu\text{g/ml}$ con una $R^2=0.99$ y de 64 $\mu\text{g/ml}$ para inhibir el crecimiento de la mitad de las colonias de *S. typhi*.

Figura 4.4

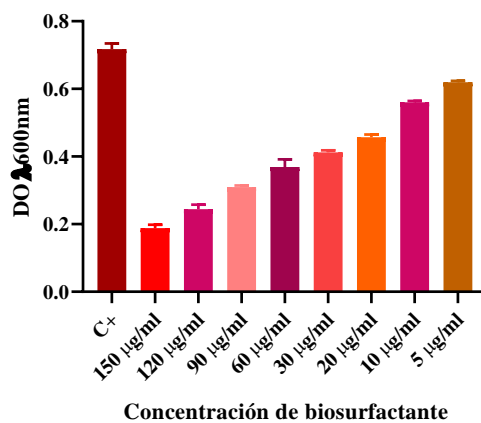
Concentración mínima inhibitoria de los ramnolípidos contra Salmonella typhimurium

Salmonella typhimurium + Biosurfactante MK307837



A

Salmonella typhimurium + Biosurfactante ATCC27853



B

Al comparar estos resultados con los publicados en la bibliografía se puede encontrar que son menores que las concentraciones mínimas inhibitorias de biosurfactantes producidos por la cepa MASH1, donde esta fue $>512 \mu\text{g/ml}$ y los de la cepa MR01 que se encuentra en el mismo rango (Lotfabad et al., 2013), pero mayores que los que presentó el producto de la cepa 47T2 que fue de $128 \mu\text{g/ml}$ (Haba et al., 2003), así como los ramnolípidos de *P. aeruginosa* LBI donde la CMI para esta bacteria fue de $16 \mu\text{g/ml}$ (Das et al., 2014).

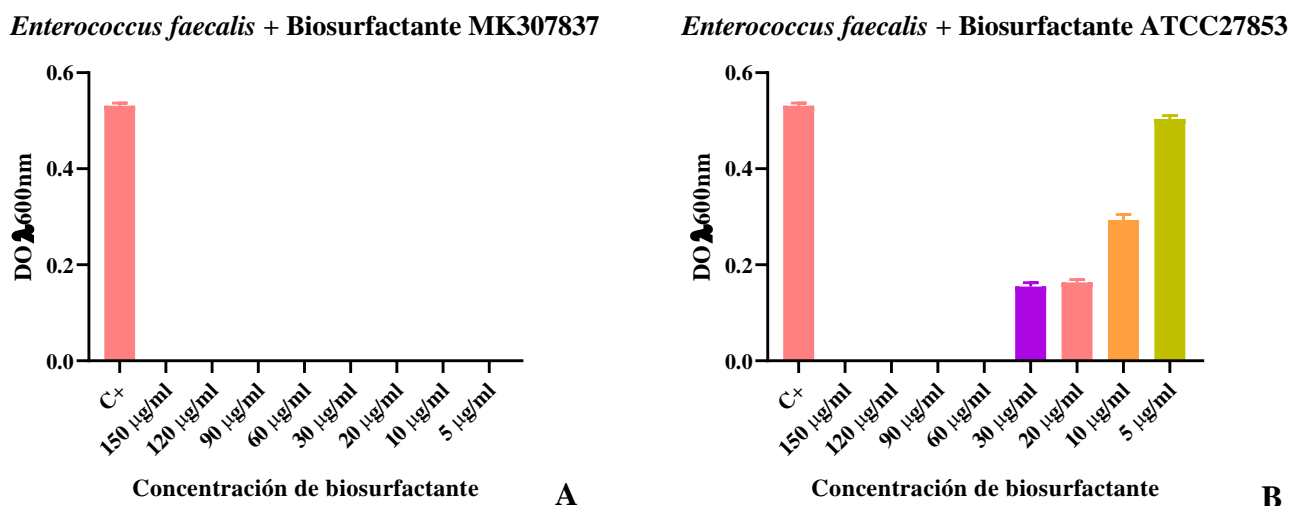
Para la bacteria Gram positiva *Enterococcus faecalis* las concentraciones mínimas inhibitorias fueron menores que para las bacterias patógenas con membrana lipídica externa, tal como se muestra en la Figura 4.5. Los ramnolípidos producidos por la cepa MK307837 mostraron una inhibición desde una concentración de $<5 \mu\text{g/ml}$ (Figura 4.5.A), y los propios de la cepa

ATCC27853 tuvieron una CMI de 58 $\mu\text{g/ml}$ determinado con una $R^2=0.92$ y el 50% de las colonias bacterianas inhibían su crecimiento desde los 9 $\mu\text{g/ml}$.

Contrastando estos valores contra los antecedentes, se observa que son sustancialmente menores que los encontrados por Lotfabad et al, (2013) donde la CMI fue $>512 \mu\text{g/ml}$ para el producto de la cepa MR01 y 68 $\mu\text{g/ml}$ para el de la cepa MASH1, aunque en este último similar a la concentración requerida de los ramnolípidos de ATCC27853 definidos en este trabajo.

Figura 4.5

Concentración mínima inhibitoria de los ramnolípidos contra *Enterococcus faecalis*



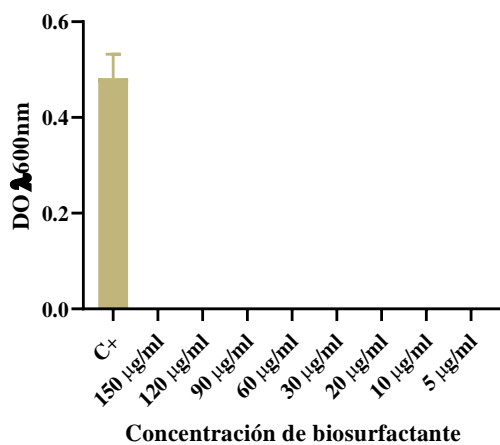
Finalmente, al evaluar la actividad antagonista de los biosurfactantes obtenidos en este trabajo contra la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*, se observaron los resultados que se presentan en la Figura 4.6. Como se observa en la figura, el producto de la cepa MK307837 inhibió el crecimiento de la bacteria desde una concentración $<5 \mu\text{g/ml}$ (Figura 4.6.A). En cambio, los ramnolípidos propios de la cepa ATCC27853 requirieron una CMI de 30 $\mu\text{g/ml}$ y una $\text{CMI}_{50}= 17 \mu\text{g/ml}$ según la regresión lineal calculada con $R^2=0.99$ (Figura 4.6.B).

La concentración mínima inhibitoria del producto de ATCC27853 es menor que las obtenidas por Abdel-Mawgoud et al, (2011) y Lotfabad et al, (2013) en cuyos estudios *S. aureus* fue inhibida bajo la presencia de 500 µg/ml de los biosurfactantes de *P. aeruginosa* OBP1, de 512 µg/ml del producto de MASH1 y 128 µg/ml de MR01; también fue similar a la concentración encontrada para la cepa 47T2 que fue de 32 µg/ml (Haba et al., 2003) y mayor que la publicada para los ramnolípidos de las cepas PAO1 y LBI, que fueron de 25 y 8 µg/ml respectivamente (Benincasa et al., 2004; Das et al., 2014). Pero, en todos los casos, los ramnolípidos propios de *P. aeruginosa* MK307837 requirieron concentraciones menores que los encontrados en la bibliografía para inhibir el crecimiento de *S. aureus* (Abdel-Mawgoud et al., 2011; Benincasa et al., 2004; Das et al., 2014; Haba et al., 2003; Lotfabad et al., 2013).

Figura 4.6

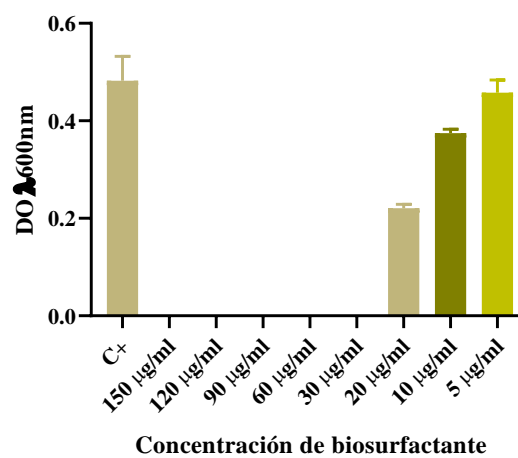
Concentración mínima inhibitoria de los ramnolípidos contra Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus + Biosurfactante MK307837



A

Staphylococcus aureus + Biosurfactante ATCC 27853



B

El resumen de los resultados para esta prueba de actividad antimicrobiana se muestra en la Tabla 4.2 tanto para las bacterias Gram positivas, como para las Gram negativas.

Tabla 4.2

Concentración mínima inhibitoria de los ramnolípidos contra bacterias patógenas

Bacterias patógenas	Concentración mínima inhibitoria (µg/ml)	
	MK307837	ATCC27853
<i>Escherichia coli</i>	150	422
<i>Salmonella typhimurium</i>	418	243
<i>Enterococcus faecalis</i>	<5	58
<i>Staphylococcus aureus</i>	<5	30

Enterococcus faecalis y *Staphylococcus aureus*, las bacterias Gram positivas estudiadas en este trabajo, fueron más susceptibles a ambas muestras de ramnolípidos que *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, siendo estas últimas de naturaleza Gram negativa. Esto quiere decir que los biosurfactantes producidos por las cepas MK307837 y ATCC27853 de *Pseudomonas aeruginosa* tuvieron más actividad inhibitoria contra las especies bacterianas Gram positivas, además que mostraron diferentes patrones de efecto antimicrobiano como se observa en la Tabla 4.2.

Este efecto inhibitorio confirma los resultados de las pruebas preliminares basadas en el método de difusión en disco, pero con diferentes comportamientos de sensibilidad. Cabe mencionar que en esta prueba el biosurfactante ya se encuentra purificado, por lo que esta puede ser una razón de la variación, ya que el biosurfactante crudo aplicado a los discos de papel filtro puede contener trazas de otras sustancias además de los ramnolípidos.

Los biosurfactantes ramnolipídicos producidos por *P. aeruginosa* MK307837 tuvieron un mayor efecto antagonista contra las bacterias patógenas probadas en comparación con el producto de la cepa ATCC27853, específicamente en el caso de las bacterias Gram positivas en las que concentración mínima inhibitoria fue considerablemente baja en comparación a las reportadas por otros autores. Solamente existió un caso en el que los ramnolípidos de la cepa ATCC tuvo una mayor eficacia, que fue en la inhibición de *S. typhi* donde se requirió aproximadamente la mitad de concentración de biosurfactante para evitar el crecimiento de la totalidad de colonias bacterianas.

Estos resultados son consistentes con lo reportado por Yilmaz & Sidal, (2005), donde encontraron que la actividad antagonista contra bacterias Gram positivas fue más eficaz que contra bacterias Gram negativas, así como con lo observado por Lotfabad et al, (2013). Se ha supuesto un mecanismo de acción de los ramnolípidos que altera la estructura de la membrana mediante la interacción con fosfolípidos y proteínas. A pesar de que la función biológica de los biosurfactantes no está completamente dilucidada, se puede relacionar con la naturaleza poco permeable de las membranas de las bacterias Gram negativas a las moléculas hidrófobas y anfipáticas, relacionándolo con la diferencia en las estructuras químicas de la pared celular de ambos grupos bacterianos (Lotfabad et al., 2013; Onbasli & Aslim, 2008; Yilmaz & Sidal, 2005).

Un mecanismo de acción posible puede ser el descrito por El-Sheshtawy & Doheim, (2014) y retomado por Nitschke et al, (2010), quienes basándose en que el lipopolisacárido de membrana externa sirve como una protección para la membrana interna y la pared celular de algunos compuestos que puedan resultar tóxicos para la célula, proponen que los ramnolípidos, al tener una estructura con grupos hidrófobos e hidrofílicos, son capaces de introducir sus ácidos grasos en la membrana celular provocando alteraciones en la bacteria. Así como la inserción de las colas puede provocar que exista una ruptura entre el citoesqueleto y la membrana plasmática permitiendo la separación de los componentes citoplasmáticos.

Como se mostró anteriormente, las concentraciones inhibitorias de los ramnolípidos de las dos cepas probadas en este trabajo fueron consistentes con algunas reportadas en la bibliografía, pero también, en algunos casos, sobre todo en el producto de MK307837, los valores observados fueron muy bajos, lo que confirma la potencia de estos dos biosurfactantes.

La variación con los resultados de otros estudios puede atribuirse a las diferencias en la composición de las mezclas ramnolipídicas, tanto en las proporciones de mono y diramnolípidos, como en los homólogos presentes. Haba et al, (2003) encontraron que los ramnolípidos de la cepa AT10 tenían una mayor efectividad contra algunas bacterias en comparación con los propios de RL47T2, así como Das et al, (2014), quienes observaron una mejor actividad antimicrobiana en el biotensioactivo de IMP67, teniendo éste una mayor cantidad de monoramnolípidos en su composición. Finalmente, también se observó una

diferencia entre el antagonismo de las cepas MASH1 y MR01 en los estudios de (Lotfabad et al., 2013)

Es por ello que se puede atribuir que los productos de las cepas de este trabajo, ATCC27853 y MK307837, tienen diferentes valores de CMI, así como en comparación con otras cepas reportadas en la bibliografía ya que no cuentan con la misma composición de las mezclas de ramnolípidos. Ya que existe una correlación entre la actividad inhibitoria, entre otras bioactividades, con la proporción de congéneres en el producto (Das et al., 2014; Nitschke et al., 2010).

Se considera que factores como la cepa bacteriana utilizada como productora, la fuente de carbono y el protocolo de producción afectan directamente el tipo de ramnolípidos que se producirá (Lotfabad et al., 2009). Se han reportado informes en los que la producción de diversos biosurfactantes en diferentes condiciones de cultivo presentaron estructuras variadas que promovieron distintos potenciales de acción en la capacidad antimicrobiana del biosurfactante afectada por la cantidad de MRL y DRL presentes en las mezclas (Das et al., 2014).

Por su parte, El-Sheshtawy & Doheim, (2014) también recalcaron que los diferentes efectos antimicrobianos y algunas otras actividades como la estabilidad de los biosurfactantes, pueden relacionarse con las estructuras moleculares, presencia de enlaces insaturados, ramificación y longitud de las cadenas alifáticas de las cadenas de los homólogos ramnolipídicos

Algunos métodos de cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas han ayudado a identificar congéneres que contienen una o dos moléculas de ramnosa y uno o dos residuos de los grupos de ácido hidroxidecanoico, incluso encontrando también residuos de otros ácidos como el hidroxitetradecanoico (Haba et al., 2003; Lotfabad et al., 2013), siendo éste un método analítico que podría utilizarse para determinar estas diferencias en los productos obtenidos en el presente trabajo.

Específicamente, en el trabajo de Lotfabad et al., (2013) se identificaron 17 congéneres de ramnolípidos presentes en el producto de MR01, mientras que para MASH1 se encontraron 6 congéneres distintos. En el primer caso se utilizó glucosa como fuente de carbono, en el

segundo fue utilizado el aceite de soya. De esta manera se atribuyó también que los diferentes efectos antagonistas que se llevaron a cabo por los ramnolípidos de las cepas antes mencionadas contra bacterias se pudieron relacionar con tales diferencias en la composición de las mezclas de biosurfactantes.

De esta manera, al tener un método de producción sustentable en el que se tomó un desecho contaminante para ser reutilizado como fuente de carbono, así como un par de cepas de *P. aeruginosa* de las que no existían reportes previos, los valores de CMI encontrados en este trabajo tienen consistencia con los antecedentes y pueden referir sus variaciones a dichos efectos que tienen las condiciones de producción en las proporciones y homólogos del producto, quienes cambian según la cepa productora y generan comportamientos diferentes en las actividades antibacterianas de los biosurfactantes según Lotfabad et al, (2013).

V. CONCLUSIONES

La prueba de estabilidad mostró que las mezclas de ramnolípidos en los biosurfactantes crudos producidos por las cepas MK307837 y ATCC27853 tuvieron un alto nivel de emulsificación, así como la estabilidad de la misma, lo que se relaciona con un gran potencial para su aplicación en la industria biomédica, cosmética, alimenticia, farmacéutica, agrícola y ambiental.

Por otra parte, en cuanto a su efecto antagónico, se encontró que los biosurfactantes producidos por *Pseudomonas aeruginosa* MK307837 y ATCC27853 son capaces de ejercer actividad inhibitoria contra bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas, en específico, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*.

Este efecto antagónico varió en los productos de ambas cepas, ya que se requirió una menor concentración de biosurfactante de la cepa MK307837 para inhibir el crecimiento de la mayoría de las bacterias patógenas probadas, variando desde <5 hasta 418 µg/ml, en comparación con la concentración mínima determinada para los ramnolípidos de las cepas ATCC27853 que se encontró en un rango general entre 30 y 422 µg/ml.

Las bacterias Gram positivas evaluadas en este trabajo tuvieron una mayor susceptibilidad a ambas muestras de biosurfactantes requiriendo menos de 5 µg/ml de adición de la mezcla de ramnolípidos para lograr inhibición, en comparación con las Gram negativas que tuvieron valores de CMI entre 30 y 58 µg/ml. Esto denota una mayor actividad antagonista de los productos ramnolipídicos de las cepas evaluadas contra bacterias sin membrana lipídica externa. Esto se puede relacionar con la acción del biosurfactante contra la envoltura celular, ya que al carecer del lipopolisacárido de membrana externa que actúa como protector, la estructura con grupos hidrófobos e hidrofílicos de los ramnolípidos los hacen capaces de introducir con mayor facilidad sus ácidos grasos en la membrana celular dañando a la bacteria.

La variación en los requerimientos de biosurfactantes para llevar a cabo la inhibición del crecimiento de las bacterias patógenas sugiere que existe una proporción de congéneres de ramnolípidos diferente en ambos productos, que afecta el perfil de bioactividad de los mismos. Algunos antecedentes plantean que, al comparar biotensoactivos, aquellos que contengan una mayor cantidad de monoramnolípidos que diramnolípidos exhibían mejores potenciales de emulsificación y actividad antimicrobiana.

De esta manera, al producirse homólogos, principalmente ramnosil- β -hidroxidocanoil- β -hidroxidocanoato (monoramnolípidos - MRL) y ramnosil-ramnosil- β -hidroxidocanoil- β -hidroxidocanoato (diramnolípidos - DRL), se puede inferir que en estas dos mezclas de biosurfactantes, por su alto efecto antagonista, se produjeron en diversa proporción ambas especies de ramnolípidos, pero siendo estos en su mayoría MRL en ambos casos.

Es posible atribuir el predominio de producción de algún tipo de congéneres de ramnolípidos a diversos factores, tales como la cepa productora, que en este trabajo fueron dos, MK307837 y ATCC23853, además del medio de cultivo, la fuente de carbono, tiempo de producción y condiciones de cultivo para compararlo con otros trabajos reportados en la bibliografía, y a su vez, todos estos factores afectarían directamente en la actividad antagonista de los biosurfactantes producidos en cada caso.

Estos resultados sugieren que los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* cepas MK307837 y ATCC23853, utilizando una fuente de carbono renovable y de bajo costo, que fue el aceite de soja usado, tienen un alto efecto antagónico contra bacterias patógenas de importancia nosocomial como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*.

VI. PERSPECTIVAS

A pesar de la gran relevancia biomédica e industrial y numerosas aplicaciones que, como ya se mencionó, tienen los ramnolípidos, no existe suficiente información sobre los mecanismos de acción que se llevan a cabo por estos biosurfactantes para efectuar su actividad antimicrobiana, así como las limitaciones de los congéneres y las propiedades y potenciales de cada especie homóloga ramnolipídica como inhibidoras del crecimiento bacteriano y fúngico, por lo que es necesario realizar estudios referentes a la caracterización fisicoquímica y bioactividad de las mezclas y congéneres ramnolipídicos para su uso como producto antimicrobiano en el que las características del mismo estén relacionadas con la proporción y tipo de ramnolípidos presentes, teniendo así un amplio espectro de opciones y targets específicos para ejercer el antagonismo.

Esta evaluación se basaría en la identificación y determinación de proporciones de homólogos de ramnolípidos mediante algunos métodos analíticos de cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas (HPLC-MS). También se propone utilizar esta técnica para determinar el grado de pureza de los ramnolípidos después del proceso de purificación para descartar la presencia de residuos que interfieran en la actividad antagonista de los mismos.

Además, mediante las técnicas de resonancia magnética nuclear, infrarrojo o UV-VIS se pueden dilucidar la estructura, y, por consiguiente, algunas propiedades químicas de los ramnolípidos producidos por las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* MK307837 y ATCC 27853, para establecer así un sustento químico de las diferencias de los productos de ambas y relacionarlos con sus desempeños antimicrobianos.

La optimización del proceso de producción con la cepa ATCC27853 no ha sido realizada, por lo que al obtener las mejores condiciones de producción se podrían aumentar los rendimientos y finalmente, con ambos procesos optimizados, se puede realizar un escalamiento para obtener los biosurfactantes en las cantidades requeridas para manejarlos como un producto industrial.

Asimismo, el compuesto bioactivo de estas cepas puede ser evaluado como un agente antimicrobiano contra otro tipo de microorganismos, como hongos y levaduras, así como otras

bacterias, que tengan un carácter multirresistente de aislamientos clínicos como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), para asentar su potencial económico y como una contribución a este problema de salud pública.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalos, A., Pinazo, A., Infante, M. R., Casals, M., García, F., & Manresa, A. (2001). Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes. *Langmuir*, 17(5), 1367–1371. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la0011735> LK - link%7Chttp://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la0011735 SRC - BaiduScholar FG - 0
- Abdel-Mawgoud, A. M., Aboulwafa, M. M., & Hassouna, N. A. H. (2009). Characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolate Bs20. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(2), 329–345. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8285-1>
- Abdel-Mawgoud, A. M., Hausmann, R., Lepine, F., Müller, M. M., & Déziel, E. (2011). *Biosurfactants: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5>
- Aparna, A., Srinikethan, G., & Smitha, H. (2012). Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas sp.* 2B. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.01.043>
- Bailey, A. E. (1961). *Aceites y grasas industriales* (1ra edición). Reverte.
- Bajpai, D., & Tyagi, V. K. (2007). Laundry detergents: an overview. *Journal of Oleo Science*, 56(7), 327–340. <https://doi.org/10.5650/jos.56.327>
- Banat, I. M., Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 495–508. <https://doi.org/10.1007/s002530051648>
- Bazire, A., & Dufour, A. (2014). The *Pseudomonas aeruginosa* *rhlG* and *rhlAB* genes are inversely regulated and *rhlG* is not required for rhamnolipid synthesis. *BMC Microbiology*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-160>

Benincasa, M., Abalos, A., Oliveira, I., & Manresa, A. (2004). Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 85(1), 1–8. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000020148.45523.41>

Berthelot, P., Grattard, F., Mallaval, F. O., Ros, A., Lucht, F., & Pozzetto, B. (2005). Epidemiology of nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathologie Biologie*, 53(6), 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.09.006>

Bharali, P., Saikia, J. P., Ray, A., & Konwar, B. K. (2013). Rhamnolipid (RL) from *Pseudomonas aeruginosa* OBP1: A novel chemotaxis and antibacterial agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 502–509. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.064>

Cal-y-Mayor-Luna, C. (2017). *Empleo de aceite canola usado como sustrato de bajo costo para la producción de biosurfactantes utilizando Pseudomonas aeruginosa*. Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla.

Camilios Neto, D., Meira, J. A., De Araújo, J. M., Mitchell, D. A., & Krieger, N. (2008). Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(3), 441–448. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1663-3>

Chhetri, A., Watts, K., & Islam, M. (2008). Waste Cooking Oil as an Alternate Feedstock for Biodiesel Production. *Energies*, 1(1), 3–18. <https://doi.org/10.3390/en1010003>

Clarke, K. G., Ballot, F., & Reid, S. J. (2010). Enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under phosphate limitation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(12), 2179–2184. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0402-y>

Corrales Ramírez, L., Castillo Castañeda, A., & Melo Vargas, A. (2013). Evaluación del potencial antibacterial in vitro de *Croton lechleri* frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas. *Nova*, 11(19), 51. <https://doi.org/10.22490/24629448.1018>

Costa, S. G. V. A. O., Nitschke, M., Haddad, R., Eberlin, M. N., & Contiero, J. (2006). Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Process Biochemistry*, 41(2), 483–488. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.07.002>

Das, P., Yang, X. P., & Ma, L. Z. (2014). Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity. *Frontiers in Microbiology*, 5(DEC), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00696>

Déziel, E., Lépine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O. A., & Villemur, R. (1999). Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1440(2–3), 244–252. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00129-8](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00129-8)

Déziel, Eric., Lépine, F., Milot, S., & Villemur, R. (2003). rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology*, 149(8), 2005–2013. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26154-0>

Dobler, L., Vilela, L. F., Almeida, R. V., & Neves, B. C. (2016a). Rhamnolipids in perspective: Gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting. *New Biotechnology*, 33(1), 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.09.005>

Dobler, L., Vilela, L. F., Almeida, R. V., & Neves, B. C. (2016b). Rhamnolipids in perspective: Gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting. *New Biotechnology*, 33(1), 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.09.005>

- El-Sheshtawy, H. S., & Doheim, M. M. (2014). Selection of *Pseudomonas aeruginosa* for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity. *Egyptian Journal of Petroleum*, 23(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2014.02.001>
- Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10(4), 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
- Garavito, R. M., & Ferguson-Miller, S. (2001). Detergents as Tools in Membrane Biochemistry. *Journal of Biological Chemistry*, 276(35), 32403–32406. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100031200>
- George, S., & Jayachandran, K. (2013). Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from waste frying coconut oil using a novel *Pseudomonas aeruginosa* D. *Journal of Applied Microbiology*, 114(2), 373–383. <https://doi.org/10.1111/jam.12069>
- Giraldo, J. D., Gutiérrez, S., & Merino, F. (2014). ACTIVIDAD EMULSIFICANTE Y DE REMOCIÓN DE METALES PESADOS DEL RAMNOLÍPIDO PRODUCIDO POR *Pseudomonas aeruginosa* PB 25. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 80(1), 35–44. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v80i1.210>
- Haba, E., Pinazo, A., Jauregui, O., Espuny, M. J., Infante, M. R., & Manresa, A. (2003). Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(3), 316–322. <https://doi.org/10.1002/bit.10474>
- Hamzah, A., Sabturani, N., & Radiman, S. (2013). Screening and Optimization of Biosurfactant Production by the Hydrocarbon-degrading Bacteria. *Sanins Malaysiana*, 42(5), 615–623.
- Ivanković, T., & Hrenović, J. (2010). Surfactants in the environment. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 61(1), 95–110. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-61-2010-1943>
- Jardak, K., Drogui, P., & Daghrir, R. (2016). Surfactants in aquatic and terrestrial environment: occurrence, behavior, and treatment processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(4), 3195–3216. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5803-x>

Kerr, K. G., & Snelling, A. M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection*, 73(4), 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.04.020>

Liepins, J., Balina, K., Soloha, R., Berzina, I., Lukasa, L. K., & Dace, E. (2021). Glycolipid biosurfactant production from waste cooking oils by yeast: Review of substrates, producers and products. *Fermentation*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation7030136>

Lotfabad, T. B., Shahcheraghi, F., & Shooraj, F. (2013). Assessment of antibacterial capability of rhamnolipids produced by two indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(1), 29–35. <https://doi.org/10.5812/jjm.2662>

Lotfabad, T. B., Shourian, M., Roostaazad, R., Najafabadi, A. R., Adelzadeh, M. R., & Noghabi, K. A. (2009). An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 69(2), 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.11.018>

Lovaglio, R. B., dos Santos, F. J., Jafelicci, M., & Contiero, J. (2011). Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: PH rules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 301–305. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.03.001>

Luján-Roca, D. A. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*: a dangerous adversary. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 48(4), 465–474.

Mara, J., & Barrera-Arellano, D. (2012). Introducción a la Química de Lípidos. In *Temas Selectos En Aceites Y Grasas* (pp. 1–36). <https://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CCgQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.blucher.com.br%2Feditor%2Famostra%2F06309.pdf&ei=XOf5VPaIAcmxUYCBgrgI&usg=AFQjCNF4vzqGcgIT3nYtK-ot8O2XVHzDig&bvm=bv.87611401,d.d24>

Marchant, R., & Banat, I. M. (2012). Biosurfactants: A sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnology Letters*, 34(9), 1597–1605. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0956-x>

Martínez-Martínez, L. (2016). Detección de microorganismos multirresistentes. *Revista Médica Valdecilla*, 1(1), 17–25.

Mnif, I., & Ghribi, D. (2016). Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agriculture and food industry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4310–4320. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7759>

Montero-Recalde, M., Vayas, L., Avilés-Esquivel, D., Pazmiño, P., & Erazo-Gutierrez, V. (2018). Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 29(4), 1543. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15185>

Moya Ramírez, I., Tsaousi, K., Rudden, M., Marchant, R., Jurado Alameda, E., García Román, M., & Banat, I. M. (2015). Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. *Bioresource Technology*, 198, 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.012>

Müller, M. M., Kügler, J. H., Henkel, M., Gerlitzki, M., Hörmann, B., Pöhnlein, M., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2012). Rhamnolipids-Next generation surfactants? *Journal of Biotechnology*, 162(4), 366–380. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.05.022>

Nitschke, M., Costa, S. G. V. A. O., & Contiero, J. (2010). Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(7), 2066–2074. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8707-8>

Onbasli, D., & Aslim, B. (2008). Determination of antimicrobial activity and production of some metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* B1 and B2 in sugar beet molasses. *African Journal of Biotechnology*, 7(24), 4614–4619. <https://doi.org/10.4314/ajb.v7i24.59647>

Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 633–654. <https://doi.org/10.3390/ijms12010633>

Panadare, D. C., & Rathod, V. K. (2015). *Applications of Waste Cooking Oil Other Than Biodiesel : A Review*. 12(3), 55–76.

Paulino, B. N., Pessôa, M. G., Mano, M. C. R., Molina, G., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G. M. (2016). Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(24), 10265–10293. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7980-z>

Pérez-Armendáriz, B., Cal-y-Mayor-Luna, C., El-Kassis, E. G., & Ortega-Martínez, L. D. (2019). Use of waste canola oil as a low-cost substrate for rhamnolipid production using *Pseudomonas aeruginosa*. *AMB Express*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0784-7>

Perinelli, D. R., Petrelli, D., Vitali, L. A., Villasaliu, D., Cespi, M., Giorgioni, G., Elmowafy, E., Bonacucina, G., & Palmieri, G. F. (2019). Quaternary ammonium surfactants derived from leucine and methionine: Novel challenging surface active molecules with antimicrobial activity. *Journal of Molecular Liquids*, *283*, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.03.083>

Quintero, J. N. (2014). LIPIDOS: CARACTERISTICAS PRINCIPALES Y SU METABOLISMO. *Revista de Actualización Clínica*, *41*, 2141–2145.

Rahim, R., Ochsner, U. A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J. S., & Soberón-Chávez, G. (2001). Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Molecular Microbiology*, *40*(3), 708–718. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02420.x>

Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., McClean, S., Marchant, R., & Banat, I. M. (2002). Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnology Progress*, *18*(6), 1277–1281. <https://doi.org/10.1021/bp020071x>

Rahman, P. K. S. M., & Gapke, E. (2008). Production, characterisation and applications of biosurfactants - Review. *Biotechnology ANSI*, *7*(2), 360–370.

Rodríguez-Pava, C. N., Zarate-Sanabria, A. G., & Sánchez-Leal, L. C. (2017). Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. *Nova*, 15(27), 119–129.

Sacsquispe Contreras, R. E., & Velásquez Pomar, J. (2002). *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión* (A. Palacios Ramírez (ed.)). Instituto Nacional de Salud.

Schultz, J., & Rosado, A. S. (2019). Extreme environments: a source of biosurfactants for biotechnological applications. *Extremophiles*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01151-2>

Scrimgeour, C. (2005). Chemistry of Fatty acids. In J. W. & Sons (Ed.), *Bailey's Industrial and fat products* (6th ed., pp. 1–41). <http://www.mrw.interscience.wiley.com/biofp>

Sekhon-Randhawa, K. K., & Rahman, P. K. S. M. (2014). Rhamnolipid biosurfactants-past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in Microbiology*, 5(SEP), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00454>

SEMARNAT, S. de M. y R. N. (2015). Residuos. In *Informe de la Situación del Medio Ambiente en México* (pp. 431–470).

Shavandi, M., Mohebbi, G., Haddadi, A., Shakarami, H., & Nuhi, A. (2011). Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus sp.* strain TA6. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(2), 477–482. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.005>

Shoeb, E., Akhlaq, F., Badar, U., Akhter, J., & Imtiaz, S. (2013). Classification and Industrial Applications of Biosurfactants. *Part-I: Natural and Applied Sciences ISSN-L:*, 4(3), 243–252.

Soberón-Chávez, G., Lépine, F., & Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(6), 718–725. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0150-3>

- Thavasi, R., Nambaru, V. R. M. S., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., & Banat, I. M. (2011). Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* from Renewable Resources. *Indian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0076-7>
- Van Bogaert, I. N. A., Saerens, K., De Muynck, C., Develter, D., Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (2007). Microbial production and application of sophorolipids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(1), 23–34. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0988-7>
- Van Delden, C., & Iglewski, B. H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging Infectious Diseases*, 4(4), 551–560. <https://doi.org/10.3201/eid0404.980405>
- Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2006). Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*, 24(6), 604–620. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.08.001>
- Vidal Becerra, E., Acosta Pintor, D. C., Mójica Mesinas, C., & Ceja Carrera, M. del C. (2019). Valorización de grasas y aceites usados de cocina. *Academia Journals*, 11(4), 1743–1749.
- Wang, Q., Fang, X., Bi, B., Liang, X., Shuler, P. J., Goddard III, W. A., & Tang, Y. (2007). Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biothechnology And Bioengineering*, 98(4), 842–853. <https://doi.org/10.1002/bit>
- Wilson, R., & Dowling, R. B. (1998). *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. *Thorax*, 53(3), 213–219. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9659359> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1745165>
- Wittgens, A., Tiso, T., Arndt, T. T., Wenk, P., Hemmerich, J., Müller, C., Wichmann, R., Küpper, B., Zwick, M., Wilhelm, S., Hausmann, R., Syldatk, C., Rosenau, F., & Blank, L. M. (2011). Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial Cell Factories*, 10(October). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-80>

Yilmaz, E. Ş., & Sidal, U. (2005). Investigation of antimicrobial effects of a *Pseudomonas*-originated biosurfactant. *Biologia - Section Cellular and Molecular Biology*, 60(6), 723–725.

Zhang, L., Veres-Schalnat, T. A., Somogyi, A., Pemberton, J. E., & Maiera, R. M. (2012). Fatty acid cosubstrates provide β -oxidation precursors for rhamnolipid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*, as evidenced by isotope tracing and gene expression assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(24), 8611–8622. <https://doi.org/10.1128/AEM.02111-12>

Tesis Maestría

INFORME DE ORIGINALIDAD

19%

INDICE DE SIMILITUD

12%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

11%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad de Jaén Trabajo del estudiante	8%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
3	pt.scribd.com Fuente de Internet	<1%
4	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1%
5	dspace.udla.edu.ec Fuente de Internet	<1%
6	es.scribd.com Fuente de Internet	<1%
7	tesis.ipn.mx Fuente de Internet	<1%
8	www.coursehero.com Fuente de Internet	<1%
9	bibliotecadigital.exactas.uba.ar Fuente de Internet	<1%