



TÍTULO DE PATENTE No. 408172

Titular(es): UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO; UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Domicilio: Lascuráin de Retana No. 5, Col. Centro, Guanajuato, 36000, Guanajuato, MÉXICO; 9° Piso De La Torre De Rectoría S/N, Col. Ciudad Universitaria, 04510, Coyoacán, Ciudad de México, MÉXICO

Denominación: METODO DE BIOSÍNTESIS DE MICROCRISTALES, NANOCRISTALES Y PUNTOS CUÁNTICOS DE SULFURO DE PLOMO, CADMIO Y MERCURIO POR ESPECIES DE CANDIDA Y EL USO DE LOS MISMO.

Clasificación: **CIP:** B82Y40/00; A61K9/16; B82Y30/00; C12N1/14; C12R1/72; C30B7/00; C30B29/48; C30B29/50; C30B29/60
CPC: B82Y40/00; A61K9/1682; A61K9/1694; B82Y30/00; C12N1/145; C30B7/00; C30B29/48; C30B29/50; C30B29/60; C01P2004/00; C12R2001/72

Inventor(es): MAYRA CUÉLLAR CRUZ

SOLICITUD

Número:
MX/a/2017/017031

Fecha de Presentación:
20 de Diciembre de 2017

Hora:
14:26

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 20 de diciembre de 2037

Fecha de Expedición: 10 de noviembre de 2023

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 5º fracción I, 9, 10 y 119 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º fracción V, inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V, inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; 1º, 3º y 5º fracción I Acuerdo Delegatorio de Facultades del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

El presente documento electrónico ha sido firmado mediante el uso de la firma electrónica avanzada por el servidor público competente, amparada por un certificado digital vigente a la fecha de su elaboración, y es válido de conformidad con lo dispuesto en los artículos 7 y 9 fracción I de la Ley de Firma Electrónica Avanzada y artículo 12 de su Reglamento. Su integridad y autoría, se podrá comprobar en www.gob.mx/impi.

Asimismo, se emitió conforme lo previsto por los artículos 1º fracción III; 2º fracción VI; 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de Servicios Electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

SUBDIRECTORA DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y QUÍMICA

EMELIA HERNÁNDEZ PRIEGO



Cadena Original:
EMELIA HERNANDEZ PRIEGO|00001000000506482277|SERVICIO DE ADMINISTRACION
TRIBUTARIA|56||MX/2023/104331|MX/a/2017/017031|Título de patente normal|1755|KAMM|Pág(s)
1|DI+3/GmgHWiEvSUfrlwpIWfgspQ=

Sello Digital:
L+mcUZEKdJBjHlQLZOIXtp8JQLhXrJHwg4rMZ7zBWpjyHmfo0qQ4huAcebUF/F5sj850LIZINGul9gH5AuEVI5lcC
4j4aOX/0Z0vZPmzem5syqZERz5Wz2x3QSLa6IKWY7ubxGksO2U2GOhWYtmpwoIMLdfLNwgvXTN6U3qQGVMvUefXsle
lljxS+RMYSivs+B7kd0J+d/ly4KxpPPcDN52zSEnYwjTf82vSPhCkzXEoThVUKK2A+rbE2y3UCEJi9Yxc1vVqKM2xh
SgkueHKxd06nUa7+48Qq3rPcYTg3Fe68o0gM11CnnU4y91w0SgEHZi4eFHYuCF47fJPuZzg==



MX/2023/104331



**MÉTODO DE BIOSÍNTESIS DE MICROCRISTALES,
NANOCRISTALES Y PUNTOS CUÁNTICOS DE SULFURO DE PLOMO,
CADMIO Y MERCURIO POR ESPECIES DE *CANDIDA* Y EL USO DE
LOS MISMOS.**

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención pertenece al campo de la biotecnología, en especial a métodos de síntesis de nanocristales realizados *in vivo*.

ANTECEDENTES

La belleza y propiedades extraordinarias de gemas naturales y minerales como
10 son zafiros, diamantes, esmeraldas, rubíes, calcita, pirita, galena, cuarzos, entre otros, han
sido utilizadas por la humanidad durante siglos. No obstante, en las últimas décadas los
minerales ampliamente utilizados en aplicaciones tecnológicas y biomédicas son aquellos
denominados biominerales, los cuales se encuentran en huesos, dientes, estromatolitos,
cascarones de huevo y conchas de nácar. La formación de estos biominerales en la naturaleza
15 lleva miles de años, pero el crecimiento de cristales *in vitro* ha permitido obtenerlos en días,
semanas o algunos meses en los casos más complejos (Hensch, 1986 a,b; García-Ruiz,
1991). Sin embargo, el método más interesante de crecimiento de cristales de importancia
tecnológica y biomédica, es realizado tanto por microorganismos procariotas como
eucariotas. En algunas ocasiones, estos biominerales son difíciles o imposibles de obtener *in*
20 *vitro* y es justamente cuando los microorganismos mediante el proceso de biomineralización,
sintetizan microcristales, nanocristales, nanopartículas o puntos cuánticos (Williams y cols.,
1996). Estos nanocristales son usualmente formados por una combinación de procesos

químicos, bioquímicos y biofísicos. La biosíntesis de nanocristales por microorganismos representa una gran alternativa debido a su reproducibilidad, estabilidad y su relativa fácil obtención comparada con los nanocristales sintetizados en condiciones *in vitro* (Williams y cols., 1996; Inouye y cols., 1982; Borrelli y cols., 1987; Herron y cols., 1989). Además, los

5 nanocristales estables tienen una gran cantidad de aplicaciones en áreas como la nanotecnología como sensores (Krumov y cols., 2007; Kowshik y cols., 2002), y conductores cuánticos (Williams y cols. 1996), en sistemas biológicos como marcadores (Krumov y cols., 2007), en el cuidado de la salud, cosméticos, industrias químicas y del espacio, así como en

10 el cuidado del medio ambiente en remediación por su capacidad de quelar y detoxificar intracelularmente iones de cadmio (Dameron y cols., 1989). Se han reportado levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Prasad y Jha, 2010), *Schizosaccharomyces pombe* y *Candida glabrata*, como buenos productores de nanocristales formados por metales pesados y péptidos con la estructura general $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ (Dameron y cols., 1989). Aun cuando se ha utilizado a *C. glabrata* como un microorganismo capaz de biosintetizar nanocristales de

15 CdS NPs, no se había reportado si otras especies del género *Candida* eran capaces de biosintetizar nanocristales al igual que esta levadura, y tampoco se había descrito si estos microorganismos eran capaces de producir nanocristales, microcristales o nanopartículas en presencia de otros elementos químicos como el mercurio (II) o el plomo (II). Los nanocristales formados por estos elementos son de especial interés, porque pueden ser

20 utilizados como monitores de la concentración de estos metales pesados en medio ambientes presumiblemente contaminados con estos elementos (Pham et al., 2015). Además, se ha reportado que los nanocristales de HgS son un material tecnológicamente importante, sin embargo, debido a su inestabilidad y emisión débil han dificultado la gran cantidad de aplicaciones en las que pueden ser utilizados (Yang y cols., 2015). Se han sintetizado

químicamente nanocristales de Cd:HgS/CdS, que han resultado ser estables y altamente fluorescentes comparados con los HgS NCs también obtenidos mediante síntesis química (Yang y cols., 2015). Otros grupos de investigación han utilizado otras estrategias de síntesis de nanocristales de AgS, pero todas ellas con un alto grado de complejidad (Han y cols., 2014; Jeong y cols., 2014). Los nanocristales de PbS se han sintetizado químicamente y al igual que los nanocristales de HgS, también su obtención requiere de una síntesis química compleja y controlada (Lee y cols., 2016; Lim y cols., 2014). La obtención de nanocristales de PbS estables es de especial interés debido a su amplio uso en fotodetectores y celdas solares (Lee y cols., 2016; Ko y cols., 2016; Lim y cols., 2014).

10 Con el objeto de superar los retos técnicos para la obtención de nanocristales, microcristales y/o puntos cuánticos de sulfuro de cadmio (II), mercurio (II) o de plomo (II), la presente invención surge de una estrategia mediante la utilización de microorganismos del género *Candida* (método *in vivo*), con la finalidad de obtener nanocristales con alta reproducibilidad y estabilidad, los cuales podrán ser utilizados en una gran cantidad de 15 aplicaciones. Cabe hacer mención que dicha estrategia no ha sido abordada en ningún reporte de arte previo, por lo que es novedosa, no obvia y sujeta a aplicación industrial.

REFERENCIAS

- Adams, M.J., Hodgkin, D.C. and Raeburn, U.A. (1970) Crystal structure of a complex of mercury(II) chloride and histidine hydrochloride. *J Chem Soc A* 263, 2–2635.
- 20 Auvray, P., and Genet, F. (1973) Refining crystal-structure of cinnabar (Alpha Hg₂S). *Bull Soc Fr Mineral Crist* 96: 218–219.

Barnes, C.L., and Bosch, E. (2006) Synthesis and X-ray crystal structure of a complex formed by reaction of 1,2-bis(2'pyridylethynyl)benzene and mercury(II) chloride. *J Chem Crystallogr* 36: 563–566.

5 Boggon, T.J., and Shapiro, L. (2000) Screening for phasing atoms in protein crystallography. *Structure* 8: R143– R149.

Borrelli, N.F., Hall, D.W., Holland, H.J., and Smith, D.W. (1987) Quantum confinement effects of semiconducting microcrystallites in glass. *J Appl Phys* 61: 5399–5409.

10 Clever, H.L., Johnson, S.A., and Derrick, M.E. (1985) The solubility of mercury and some sparingly soluble mercury salts in water and aqueous-electrolyte solutions. *J Phys Chem Ref Data* 14: 631–681.

Cuellar-Cruz, M., Briones-Martin-Del-Campo, M., Canas-Villamar, I., Montalvo-Arredondo, J., Riego-Ruiz, L., Castano, I., and Penas, A. (2008) High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryot Cell* 7: 814–825.

Dameron, C.T., Reese, R.N., Mehra, R.K., Kortan, A.R., Carroll, P.J., Steigerwald, M.L., et al. (1989) Biosynthesis of cadmium-sulfide quantum semiconductor crystallites. *Nature* 338: 596–597.

Fidan, I., Kalkanci, A., Yesilyurt, E., and Erdal, B. (2014) In vitro effects of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* on dendritic cells and the role of beta glucan in this effect. *Adv Clin Exp Med* 23: 17–24.

5 Garciaruz, J.M. (1991) The uses of crystal-growth in gels and other diffusing-reacting systems. In *Crystalline Materials: Growth and Characterization*. Rodriguez-Clemente, R. (ed.). pp. 87–106.

Hammersley, A.P. (2016) FIT2D: a multi-purpose data reduction, analysis and visualization program. *J Appl Crystallogr* 49: 646–652.

10 Hammersley, A.P., Svensson, S.O., Hanfland, M., Fitch, A.N., and Hausermann, D. (1996) Two-dimensional detector software: from real detector to idealized image or two-theta scan. *High Pressure Res* 14: 235–248.

Han, L., Hou, P.F., Feng, Y., Liu, H., Li, J.L., Peng, Z.J., and Yang, J. (2014) Phase transfer-based synthesis of HgS nanocrystals. *Dalton Trans* 43: 11981–11987.

15 Hensch, H.K., and Garciaruz, J.M. (1986a) Crystal-growth in gels and liesegang ring formation: 1. Diffusion relationships. *J Cryst Growth* 75: 195–202.

Hensch, H.K., and Garciaruz, J.M. (1986b) Crystal-Growth in gels and liesegang ring formation: 2. Crystallization criteria and successive precipitation. *J Cryst Growth* 75: 203–211.

20 Herron, N., Wang, Y., Eddy, M.M., Stucky, G.D., Cox, D.E., Moller, K., and Bein, T. (1989) Structure and optical-properties of CdS superclusters in zeolite hosts. *J Am Chem Soc* 111: 530–540.

Inouye, K., Endo, R., Otsuka, Y., Miyashiro, K., Kaneko, K., and Ishikawa, T.

(1982) Oxygenation of ferrous-ions in reversed micelle and reversed micro-emulsion. *J Phys Chem* 86: 1465–1469.

Jeong, K.S., Deng, Z.Y., Keuleyan, S., Liu, H., and Guyot-Sionnest, P. (2014)

5 Air-stable n-doped colloidal HgS quantum dots. *J Phys Chem Lett* 5: 1139–1143.

Ko, D.K., Maurano, A., Suh, S.K., Kim, D., Hwang, G.W., Grossmann, J.C., et

al. (2016) Photovoltaic performance of PbS quantum dots treated with metal salts. *ACS Nano* 10: 3382–3388.

Kowshik, M., Deshmukh, N., Vogel, W., Urban, J., Kulkarni, S.K., and Paknikar,

10 K.M. (2002) Microbial synthesis of semiconductor CdS nanoparticles, their characterization, and their use in the fabrication of an ideal diode. *Biotechnol Bioeng* 78: 583–588.

Krumov, N., Oder, S., Perner-Nochta, I., Angelov, A., and Posten, C. (2007)

Accumulation of CdS nanoparticles by yeasts in a fed-batch bioprocess. *J Biotechnol* 132: 481–486.

15 Lausi, A., Polentarutti, M., Onesti, S., Plaisier, J.R., Busetto, E., Bais, G., et al.

(2015) Status of the crystallography beamlines at Elettra. *Eur Phys J Plus* 130: 43.

Lee, J.W., Kim, D.Y., Baek, S., Yu, H., and So, F. (2016) Photodetectors:

inorganic UV-Visible-SWIR broadband photodetector based on monodisperse PbS nanocrystals (*Small* 10/2016). *Small* 12: 1246.

Lim, S., Kim, Y., Lee, J., Han, C.J., Kang, J., and Kim, J. (2014) Investigation of colloidal PbS quantum dot-based solar cells with near infrared emission. *J Nanosci Nanotechnol* 14: 9346–9350.

5 Lowman, D.W., Greene, R.R., Bearden, D.W., Kruppa, M.D., et al. (2014) Novel structural features in *Candida albicans* hyphal glucan provide a basis for differential innate immune recognition of hyphae versus yeast. *J Biol Chem* 289: 3432–3443.

Malik, M.A., Motevalli, M., Saeed, T., and Obrien, P. (1993) Methylzinc or methyl cadmium-N,N,N-Trimethylpropylenediaminedithiocarbamates – precursors for zinc or cadmium-sulfide the X-Ray crystal structure of
10 methylcadmiumtrimethylpropylenediaminedithiocarbamate benzene solvate. *Adv Mater* 5: 653–654.

Noda, Y., Masumoto, K., Ohba, S., Saito, Y., Toriumi, K., Iwata, Y., and Shibuya, I. (1987) Temperature-dependence of atomic thermal parameters of lead chalcogenides, Pbs, Pbse and Pbte. *Acta Crystallogr C* 43: 1443–1445.

15 Pham, A.L.T., Johnson, C., Manley, D., and Hsu-Kim, H. (2015) Influence of sulfide nanoparticles on dissolved mercury and zinc quantification by diffusive gradient in thin-film passive samplers. *Environ Sci Technol* 49: 12897–12903

Prasad, K., and Jha, A.K. (2010) Biosynthesis of CdS nanoparticles: an improved green and rapid procedure. *J Colloid Interface Sci* 342: 68–72.

Shakouri-Arani, M., and Salavati-Niasari, M. (2014) Synthesis and characterization of cadmium sulfide nanocrystals in the presence of a new sulfur source via a simple solvothermal method. *New J Chem* 38: 1179–1185.

Williams, P., KeshavarzMoore, E., and Dunnill, P. (1996) Efficient production
5 of microbially synthesized cadmium sulfide quantum semiconductor crystallites. *Enzyme Microb Technol* 19: 208–213.

Yang, J., Hu, Y.P., Luo, J., Zhu, Y.H., and Yu, J.S. (2015) Highly Fluorescent, Near-infrared-emitting Cd²⁺-tuned HgS nanocrystals with optical applications. *Langmuir* 31: 3500–3509.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Celulas de *Candida* sin tratamiento.

Figura 2. Formación de nanocristales extracelulares formados por las especies de *Candida* en presencia de Pb²⁺. Las células de *Candida* expuestas a plomo fueron
15 analizadas por medio del microscopio electrónico de barrido (MEB). La formación de cristales fue inducida por la adición de 1 mM de nitrato de plomo en el medio de cultivo, previo a la inoculación de las levaduras.

Figura 3. Formación de nanocristales intracelulares formados por las especies de *Candida* en presencia de Hg²⁺. Las células de *Candida* expuestas a mercurio fueron
20 analizadas por medio del microscopio electrónico de barrido (MEB). La formación de

nanocristales fue inducida por la adición de 1 mM de nitrato de mercurio, previo a la inoculación de las levaduras.

Figura 4. Formación de nanocristales intracelulares formados por las especies de *Candida* en presencia de Cd^{2+} . Las células de *Candida* expuestas a cadmio fueron analizadas por medio del microscopio electrónico de barrido (MEB). La formación de nanocristales fue inducida por la adición de 1 mM de nitrato de cadmio, previo a la inoculación de las levaduras.

Figura 5. Microcristales formados por especies de *Candida*.

Figura 6. Nanocristales formados por especies de *Candida*.

Figura 7. Puntos cuánticos formados por especies de *Candida*.

Figura 8. Análisis cualitativo de plomo presente en los cristales por medio de Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS). Las muestras de las especies de *Candida* observadas en el MEB fueron analizadas cualitativamente para determinar los componentes principales. Como se muestra, los cristales están formados del metal al que fueron expuestos.

Figura 9. Análisis cualitativo de mercurio presente en los cristales por medio de Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS). Las muestras de las especies de *Candida* observadas en el MEB fueron analizadas cualitativamente para determinar los componentes principales. Como se muestra, los cristales están formados del metal al que fueron expuestos.

Figura 10. Análisis cualitativo de cadmio presente en los cristales por medio de Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS). Las muestras de las especies de *Candida* observadas en el MEB fueron analizadas cualitativamente para determinar los componentes principales. Como se muestra los cristales están formados del metal al que fueron expuestos.

Figura 11. Patrones de Difracción de Rayos X de polvos de las células control de *Candida*.

Figura 12. Patrones de Difracción de Rayos X de polvos de las células de *Candida* expuestas a Pb^{2+} . Las barras rojas representan la estructura cristalina del PbS, la cual es la estructura cúbica $Fm-3m$. De las muestras se obtuvieron los picos de difracción a 16 KeV.

Figura 13. Patrones de Difracción de Rayos X de polvos de las células de *Candida* expuestas a Hg^{2+} . Las barras rojas representan la estructura trigonal $P3_221$ de HgS (Auvray y Genet, 1973; Adams y cols., 1970; Boggon y Shapiro, 2000). En todas las muestras se obtuvieron los picos de difracción a 16 KeV.

Figura 14. Patrones de Difracción de Rayos X de polvos de las células expuestas a Cd^{2+} . Las barras rojas representan la estructura cúbica $F-43m$ de CdS. En todas las muestras se obtuvieron los picos de difracción a 16 KeV.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente invención se describe y reclama un método para la obtención de nanocristales, microcristales y/o puntos cuánticos de sulfuro de cadmio (II), mercurio (II) o de plomo (II) en todas las especies de *Candida* (incluidas especies patógenas y no patógenas) y se seleccionan a partir de 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 y 2.0 mM de nitrato de plomo, nitrato de mercurio, nitrato de cadmio o cloruro de cadmio a el medio de cultivo, como se indica en la figura 1.

En una modalidad adicional, la formación de nanocristales, microcristales y/o puntos cuánticos de sulfuro de cadmio (II), mercurio (II) o de plomo (II) por las especies de *Candida*, se obtienen a partir de la exposición de las células a diferentes concentraciones de nitrato de plomo, nitrato de mercurio, nitrato de cadmio o cloruro de cadmio a el medio de cultivo, las cuales comprenden desde 0 hasta 100 mM. Asimismo, la modalidad preferida del método aquí descrito y reclamado, la concentración de la sal utilizada es de 1.0 mM. Las sales que se adicionan al medio comprenden cloruros, nitratos, sulfatos, carbonatos o cromatos de cadmio, mercurio o plomo, aunque no se limitan a las mencionadas sales. La temperatura de crecimiento de las especies de *Candida* en presencia de cualquiera de las sales comprende un intervalo de 25 a 38 °C.

En una modalidad adicional de dicho método, la formación de nanocristales, microcristales o puntos cuánticos de sulfuro de cadmio (II), mercurio (II) o de plomo (II) por especies de *Candida*, se puede realizar con al menos una sal como se definió anteriormente, pero en una modalidad preferida adicional se puede realizar una combinación de sales.

Asimismo, se reclama para la formación de nanocristales, microcristales y/o puntos cuánticos de sulfuro de cadmio (II), mercurio (II) o de plomo (II) por las especies de *Candida*, el uso de diferentes medios de cultivo, los cuales pueden ser YP (extracto de levadura, peptona), YPD (extracto de levadura, peptona, dextrosa en concentraciones que pueden comprender desde 0 hasta 2%), YNB (sulfato de amonio, biotina, pantotenato de calcio, ácido fólico, inositol, ácido nicotínico, ácido p-aminobenzoico, piridoxina HCl, riboflavina, tiamina HCl, ácido bórico, sulfato de cobre, ioduro de potasio, cloruro férrico, sulfato de manganeso, molibdato de sodio, sulfato de zinc, fosfato de potasio monobásico, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, cloruro de calcio, dextrosa en concentraciones que pueden comprender desde 0 hasta 2%), Sabouraud (digerido enzimático de caseína, dextrosa en concentraciones que pueden comprender desde 0 hasta 2%), Agar de Dextrosa y Papa (PDA, infusión de papa, dextrosa en concentraciones que pueden comprender desde 0 hasta 2%), Agar Biggy (extracto de levadura, glicina, citrato-bismuto amoniacal, sulfito sódico, dextrosa en concentraciones que pueden comprender desde 0 hasta 2%). Los medios de cultivo descritos anteriormente pueden utilizarse en medio líquido o sólido. Otros medios de cultivo que pueden ser utilizados son: agar cerebro de corazón, agar de Czapek-Dox, agar extracto de malta, agar maltosa de sabouraud, agar de Littman con bilis de buey, caldo corazón, caldo de Czapek-Dox, caldo extracto de malta, caldo triptona soya.

Dentro de una modalidad adicional a la presente invención se describe y reclama el uso de la metodología descrita en diferentes usos además de la obtención de los nanocristales, microcristales o puntos cuánticos de sulfuro de cadmio (II), mercurio (II) o de plomo (II), usos como la bioremedación en suelos y en cualquier tipo de agua.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Obtención de los nanocristales, microcristales o puntos cuánticos de sulfuro de cadmio (II), mercurio (II) o de plomo (II) por especies de *Candida*

La metodología descrita y reclamada en la presente invención para la obtención de sulfuro de nanocristales, microcristales o puntos cuánticos de cadmio (II), mercurio (II) o de plomo (II) por especies de *Candida* no ha sido descrita en ninguna base de datos de patente.

De manera general, el método de la presente invención es la siguiente:

- Las células de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* o *C. parapsilosis* en fase exponencial a una OD_{600nm} 1.0 fueron divididas, y procesadas de la siguiente manera:
- a. Las células de las cuatro especies de *Candida* fueron expuestas a diferentes concentraciones (0, 0.5, 1.0, 1.5 o 2.0 mM) de cada uno de los metales pesados Pb^{2+} , Hg^{2+} o Cd^{2+} e incubadas con agitación (100 a 280 rpm) a 28 °C durante 48 h, para permitir que las células alcanzaran la fase estacionaria.
 - b. Posteriormente, las células de cada una de las especies de *Candida* en fase estacionaria tanto de los cultivos control como los tratados con los distintos metales fueron centrifugadas a 3500 x g durante 15 min a 4°C, obteniendo de esta manera las respectivas pastillas celulares.
 - c. Las pastillas celulares fueron lavadas cuatro veces con agua desionizada estéril.

- d. Las pastillas celulares fueron ajustadas a una OD600nm de 1.0, en 1.0 ml de regulador de lisis, el cual contiene 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 0.8 M sorbitol, 0.8 M KCl, 10 mM MgSO₄, 15 mM β-mercaptoetanol y 0.25 mg de liticasa e incubadas a 37 °C.
- 5 e. Después de 3 h de incubación, las células fueron observadas con un microscopio Zeiss Axiostar (Carl Zeiss, Jena, Germany) para asegurar que las células habían perdido la pared celular (células denominadas en esta condición como protoplastos).
- 10 f. De esta manera, se obtuvo el 90% de protoplastos, los cuales fueron colectados y gentilmente lisados (ruptura celular, para permitir la liberación de los cristales sin dañarlos) al resuspenderlos en 500 µL de agua desionizada estéril.
- 15 g. Finalmente, los nanocristales, microcristales o puntos cuánticos de sulfuro de cadmio (II), mercurio (II) o de plomo (II) fueron obtenidos de los restos celulares por medio de una centrifugación a 120 x g durante 3 min.
- 20 h. Una vez obtenidos los nanocristales, microcristales o puntos cuánticos de sulfuro de cadmio (II), mercurio (II) o de plomo (II) puros se tomaron las microfotografías de los mismos por medio del microscopio electrónico de barrido (MEB), y se realizó el análisis de los elementos químicos por medio de Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS).
- i. El tratamiento de las muestras para ser observadas al MEB y analizadas por EDS, fue como se describe a continuación: las muestras

fueron secadas por liofilización y posteriormente cubiertas con una capa de oro coloidal.

j. Después, las muestras fueron observadas en el microscopio electrónico de barrido, modelo EVO HD15, high definition ZEISS®.

5 Finalmente, las muestras fueron fotografiadas usando el detector de electrones secundarios (SE1) a 15 kV en condiciones de alto vacío y a una distancia de trabajo de 4 mm. Como se muestra en las figuras 1 a la 10, las células de *Candida* sintetizaron microcristales, nanocristales o puntos cuánticos de PbS, HgS o CdS. Esto indica que el método de
10 la presente invención es 100% específico para la formación de cristales para las especies de *Candida*.

k. Con el objeto de comprobar la conformación y composición química de los nanocristales, microcristales o puntos cuánticos de sulfuro de cadmio (II), mercurio (II) o de plomo (II), se realizó el análisis de difracción de rayos X en polvo (XRPD), en el Sincrotrón Elettra en
15 Trieste (Italia) (Lausi y cols., 2015).

l. Se recogieron patrones de difracción de polvo, en modo de transmisión, a temperatura ambiente (25 °C) con una longitud de onda monocromática de 0.77491 Å (16 KeV) y 200 · 200 μm² de tamaño de
20 punto, utilizando un detector de área de píxeles híbridos Pilatus 2M. Se colocaron las muestras de células de *Candida* liofilizadas en capilares de borosilicato con un diámetro de 700 μm (10 μm de espesor de pared). Se analizaron las muestras blanco de la misma manera, colectando de esta manera datos sobre células liofilizadas no expuestas

a metales pesados pero tratadas con el mismo protocolo (parámetros de crecimiento, etapas de lavado y liofilización). La pequeña cantidad de muestras cargadas con cadmio disponibles (limitadas por la alta toxicidad del metal) impidió el uso de capilares; por lo tanto, estos polvos se "pegaron" en un circuito de Kapton circular de 300 μm utilizando N-paratone. El patrón en blanco para estas muestras se refiere a la difracción del bucle vacío que contiene una cantidad similar de aceite. Los patrones bidimensionales de polvo se han integrado utilizando el programa Fit2D (Hammersley y cols., 1996; Hammersley, 2016), después de la calibración preliminar de la configuración del hardware, utilizando un capilar lleno de polvo de referencia estándar LaB6 (NIST 660a). Los espectros de fluorescencia se han registrado para todas las muestras, durante la adquisición de datos de difracción en un detector de deriva de silicio Amptek X-123SDD, perpendicular al haz de rayos X. Como se puede apreciar en las figuras 12 a la 14 los patrones de difracción de Rayos X confirman la presencia de los metales bioacumulados. Los espectros de fluorescencia de sincrotrón de radiación confirman la presencia de metales pesados bioacumulados esperados en células liofilizadas, con un patrón superponible entre diferentes líneas celulares (Figs. 12-14). Además, se han encontrado zinc endógeno y otros metales comunes (K, Fe), incluso en muestras en blanco (Figura 4A). Los patrones de rayos X recogidos en células de *Candida* no expuestas a metales pesados (espacios en blanco) muestran picos anchos que están de

acuerdo con datos previos publicados para glucanos extraídos de la pared celular (Lowman y cols., 2014) y fases lipídicas "mal ordenadas" (Fidan y cols., 2014) (dando pico de ancho de ~ 4.3 Å). Los patrones en blanco de las cuatro especies de *Candida* analizadas son superponibles (Fig. 11). La introducción de átomos pesados en las células agrega señales más nítidas al fondo en blanco, que pertenecen a las nanopartículas metálicas cristalinas. Para las células cargadas con plomo (Figura 12), las señales agudas coinciden muy bien con las posiciones pico esperadas para la fase cúbica cristalina *Fm-3m* galena (PbS) (Noda y cols., 1987); las muestras de diferentes líneas celulares son equivalentes. Estos resultados muestran que los nanocristales son formados en presencia de Pb^{2+} en las cuatro especies de *Candida* están formados por PbS (Figuras 12). Interesantemente, al analizar por radiación sincrotrón, los nanocristales formados con Hg^{2+} por cada una de las especies de *Candida*, tiene diferente composición química. Así, los patrones de difracción cambian significativamente, entre las diferentes muestras cargadas de mercurio (Figura 13). Los picos de XRD para *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* pueden interpretarse como cristales trigonales de cinabar (HgS) $P3_221$ (Auvray y Genet, 1973; Clever y cols., 1985). Las señales de *C. parapsilosis* son mucho más débiles en comparación con otras líneas celulares (Fig. 13), lo que sugiere una cristalización in vivo de nanocristales mercurio menos eficiente. Resultado que está en concordancia con lo encontrado en el SEM, en nanocristales de mercurio (Fig. 6). Los resultados por

radiación sincrotrón demostraron que las células cargadas de cadmio se han medido en pequeñas cantidades de células liofilizadas, debido a la alta toxicidad de este metal para *Candida*, que inhibía la proliferación celular y sugiriendo la ausencia de un mecanismo de desintoxicación eficiente para este metal en *Candida*. Además, el metal bioacumulado proporciona picos de difracción muy pequeños que podrían explicarse con la presencia de partículas cristalinas diminutas ("cuánticas") como se informó previamente en la literatura (Williams y cols., 1996). Los picos son más pronunciados en el patrón de *C. glabrata* y su posición se asemeja a las posiciones esperadas de los picos para una fase cúbica $F-43m$ Hawleyite (CdS) (Malik y cols., 1993; Barnes y Bosch, 2006; Shakouri-Arani y Salavati-Niasari, 2014) (Fig. 14). Con esto se comprueba que el método utilizado para obtener nanocristales, microcristales o puntos cuánticos de sulfuro de cadmio (II), mercurio (II) o de plomo (II) por las especies de *Candida* se lleva a cabo con un 100% de especificidad, debido a que no se han reportado anteriormente en este género y este es el primer reporte de su utilidad. Con esto se comprueba que el método utilizado para obtener nanocristales, microcristales o puntos cuánticos de sulfuro de cadmio (II), mercurio (II) o de plomo (II) por las especies de *Candida* se lleva a cabo con un 100% de especificidad, debido a que no se han reportado anteriormente en este género y este es el primer reporte de su utilidad.

La formación de nanocristales, microcristales o puntos cuánticos de sulfuro de cadmio (II), mercurio (II) o de plomo (II) en otras especies filogenéticamente relacionadas a las especies del género *Candida*, podrán utilizar la misma metodología que se presenta en la presente invención. Algunas de estas especies pueden ser las siguientes, aunque no se encuentran limitadas exclusivamente a ellas: *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces castelli*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces kudriavzevii*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces paradoxus*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces waltii*, *Ashbya gossypii*, *Kluyveromyces lactis* y *Yarrowia lipolytica*.

10 Análisis comparativo del método de síntesis *in vitro* vs el método de síntesis *in vivo* de la presente invención

Con el objeto de probar cabalmente la ventaja competitiva del método desarrollado en la presente invención contra los métodos de síntesis *in vitro* tradicionales, a continuación se hace un comparativo de los tiempos de ambos métodos:

15 Método de síntesis tradicional *in vitro*. Este método consiste en sintetizar los cristales de PbS, HgS y CdS mediante el método del gel utilizando dos tipos de hidrogeles: el primero era un agarosa de bajo punto de fusión, y el segundo era un gel obtenido por la neutralización de la solución de metasilicato de sodio con ácido acético. Tiempo de obtención: 3 semanas.

Método de síntesis de la presente invención: 2 días.

Una modalidad adicional de la presente invención comprende un método de obtención de nanocristales, microcristales o puntos cuánticos de sulfuro

de cadmio (II), mercurio (II) o de plomo (II) con alguna de las especies filogenéticamente cercanas a las especies de *Candida* o levaduras con las cuales compartan características. Variantes en utilizar alguno de estos microorganismos serán fácilmente deducibles por un técnico en la materia y quedan comprendidas dentro del alcance de la presente solicitud.

5

10

15

REIVINDICACIONES

1.- Un método *in vitro* para la obtención de nanocristales, microcristales o puntos cuánticos de sulfuro de cadmio (II), mercurio (II) o de plomo (II) por especies del género *Candida* que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) Exponer células del género *Candida*, que se encuentren en fase exponencial a una OD_{600nm} 1.0, a una concentración en el intervalo de 0- 2.0 mM de cada uno de los metales pesados Pb²⁺, Hg²⁺ o Cd²⁺ e incubarlas con agitación (100 a 280 rpm) a 28°C durante 48 h, para permitir que las células alcancen la fase estacionaria.
- 10 b) Centrifugar a 3500 x g durante 15 min a 4 °C las células de cada una de las especies de *Candida* en fase estacionaria tanto de los cultivos control como los tratados con los distintos metales , obteniendo la formación de las respectivas pastillas celulares.
- c) Lavar cuatro veces con agua desionizada estéril las pastillas celulares.
- d) Ajustar las pastillas celulares a una OD_{600nm} de 1.0, en 1.0 ml de regulador de lisis, el cual contiene 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 0.8 M sorbitol, 0.8 M KCl, 10 mM MgSO₄,
15 15 mM β-mercaptoetanol y 0.25 mg de liticasa e incubar a 37 °C.
- e) Después de 3 h, observar las células con un microscopio Zeiss Axiostar (Carl Zeiss, Jena, Germany) para asegurar que las células perdieron la pared celular (protoplastos).
- f) Colectar los protoplastos y lisarlos mediante resuspensión en 500 µL de agua
20 desionizada estéril para liberar los cristales.
- g) Obtener de los restos celulares por medio de una centrifugación a 120 x g durante 3 min los nanocristales, microcristales o puntos cuánticos de sulfuro de cadmio (II), mercurio (II) o de plomo (II).

2.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el microorganismo a utilizar sea de organismos filogenéticamente cercanos o comparta características con las especies del género *Candida*, seleccionados preferentemente de entre *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* o *C. parapsilosis*.

5 3.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la concentración de plomo, cadmio o mercurio presente en el medio de cultivo de *Candida* comprende de 0 a 100 mM.

4.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque las sales que se adicionan al medio de cultivo comprenden cloruros, nitratos, sulfatos, carbonatos o cromatos de cadmio, mercurio o plomo.

10

5.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la temperatura de crecimiento de los microorganismos comprende un intervalo de 25 a 38 °C.

6.- El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque se puede utilizar una sal o una combinación de varias sales del mismo metal u otro metal.

15 7.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el medio de cultivo es YP, YPD, YNB, PDA, agar Biggy, agar cerebro de corazón, agar de Czapek-Dox, agar extracto de malta, agar maltosa de sabouraud, agar de Littman con bilis de buey, caldo corazón, caldo de Czapek-Dox, caldo extracto de malta o caldo triptona soya, tanto en medio líquido como sólido.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención describe y reclama un método *in vivo* de obtención de nanocristales, microcristales o puntos cuánticos de sulfuro de cadmio (II), mercurio (II) o de plomo (II) por especies del género *Candida*, así como el uso de los mismos.

5

10

15

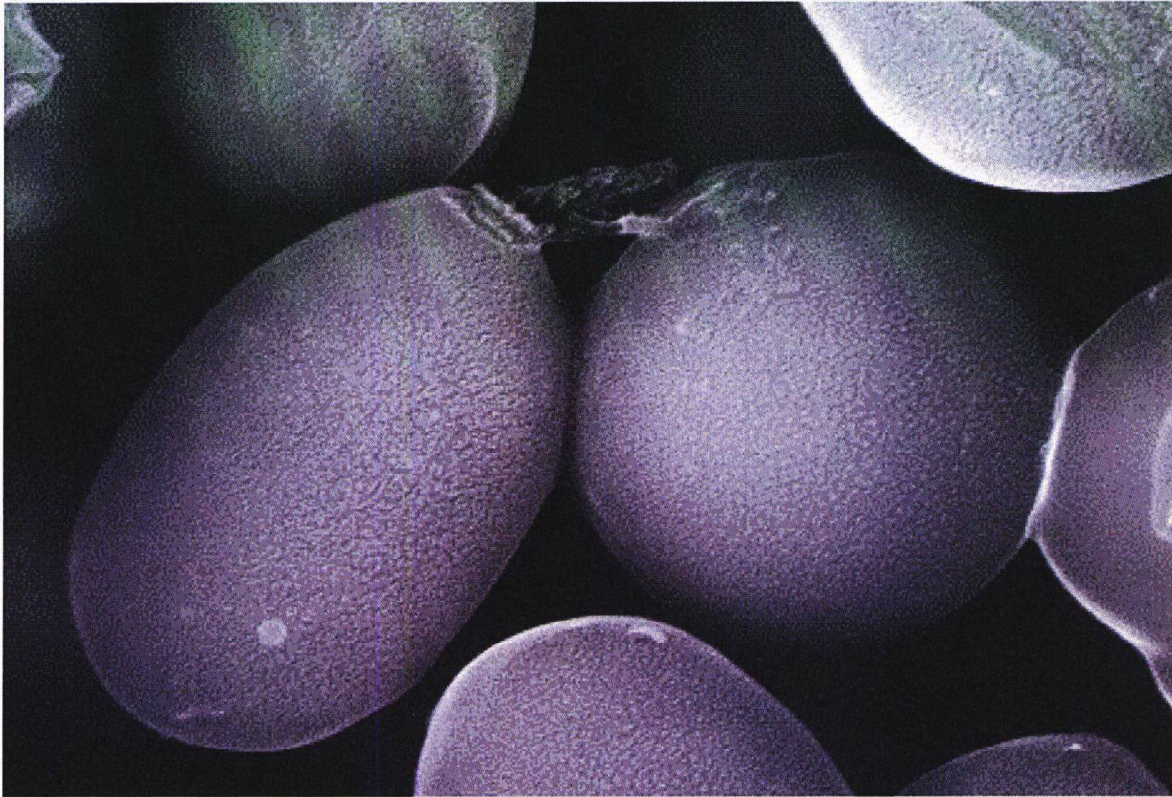


FIGURA 1

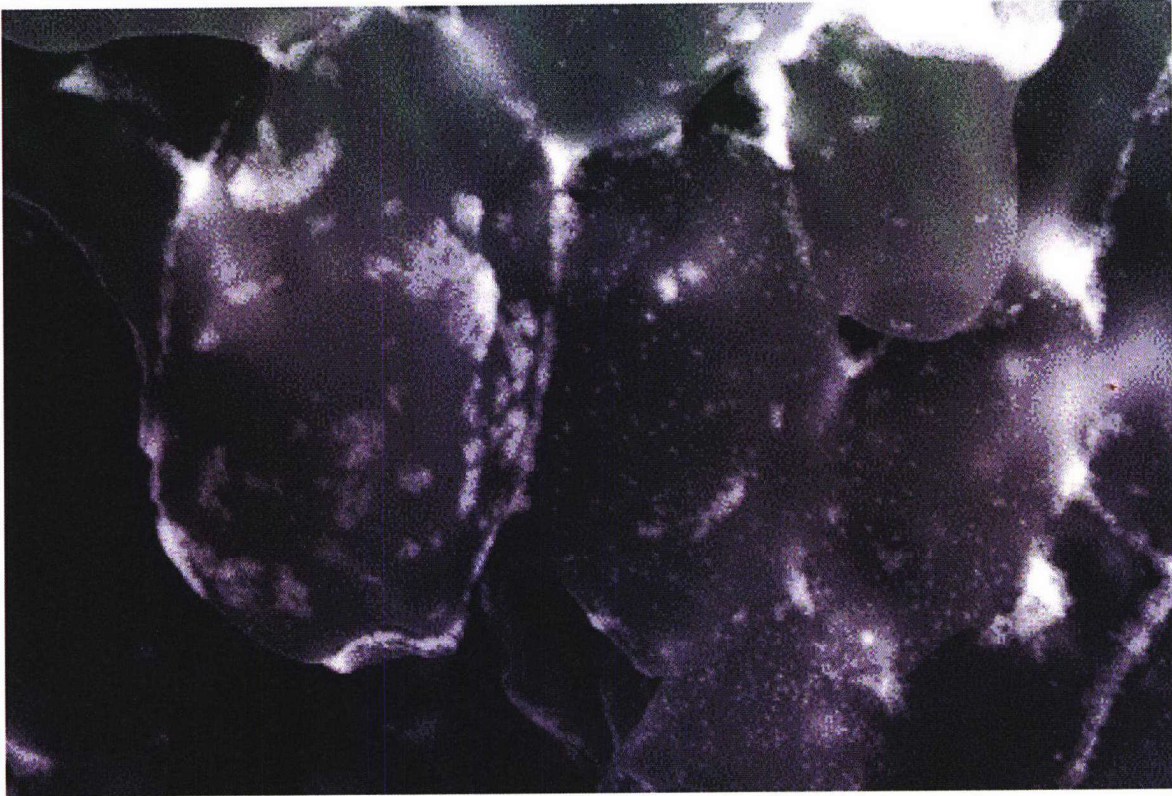


FIGURA 2

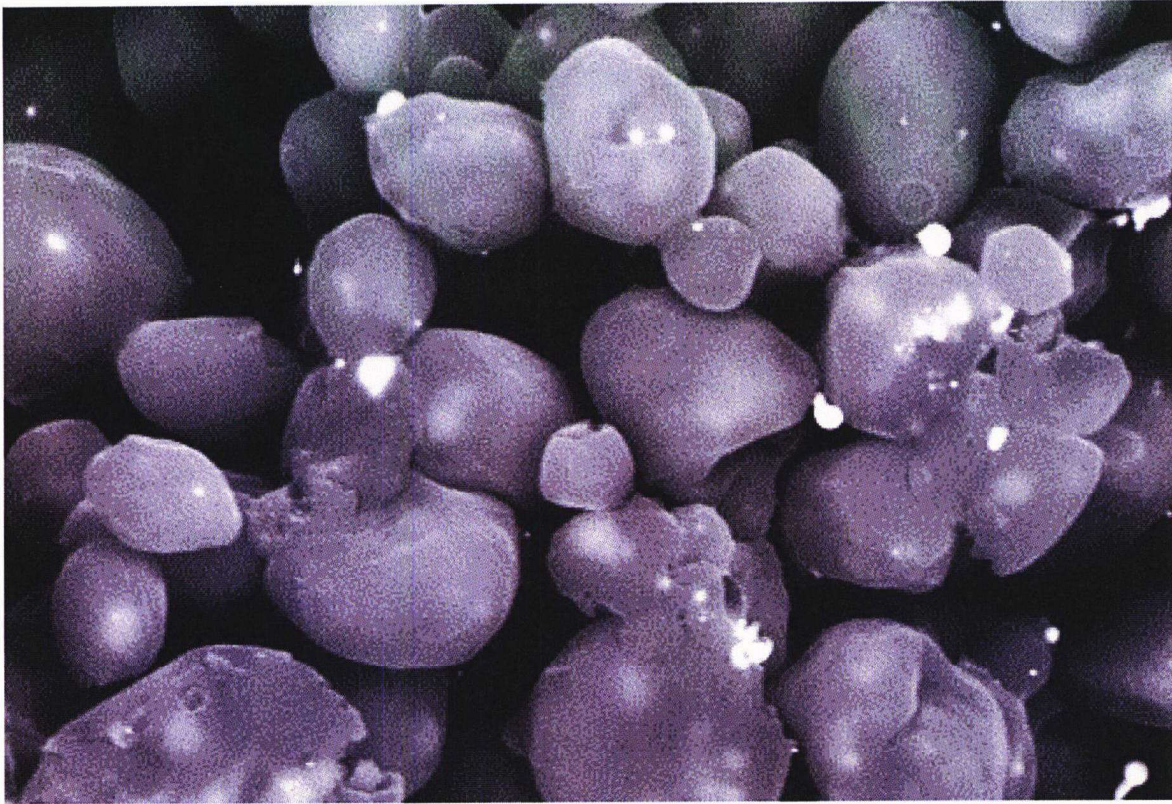


FIGURA 3



FIGURA 4

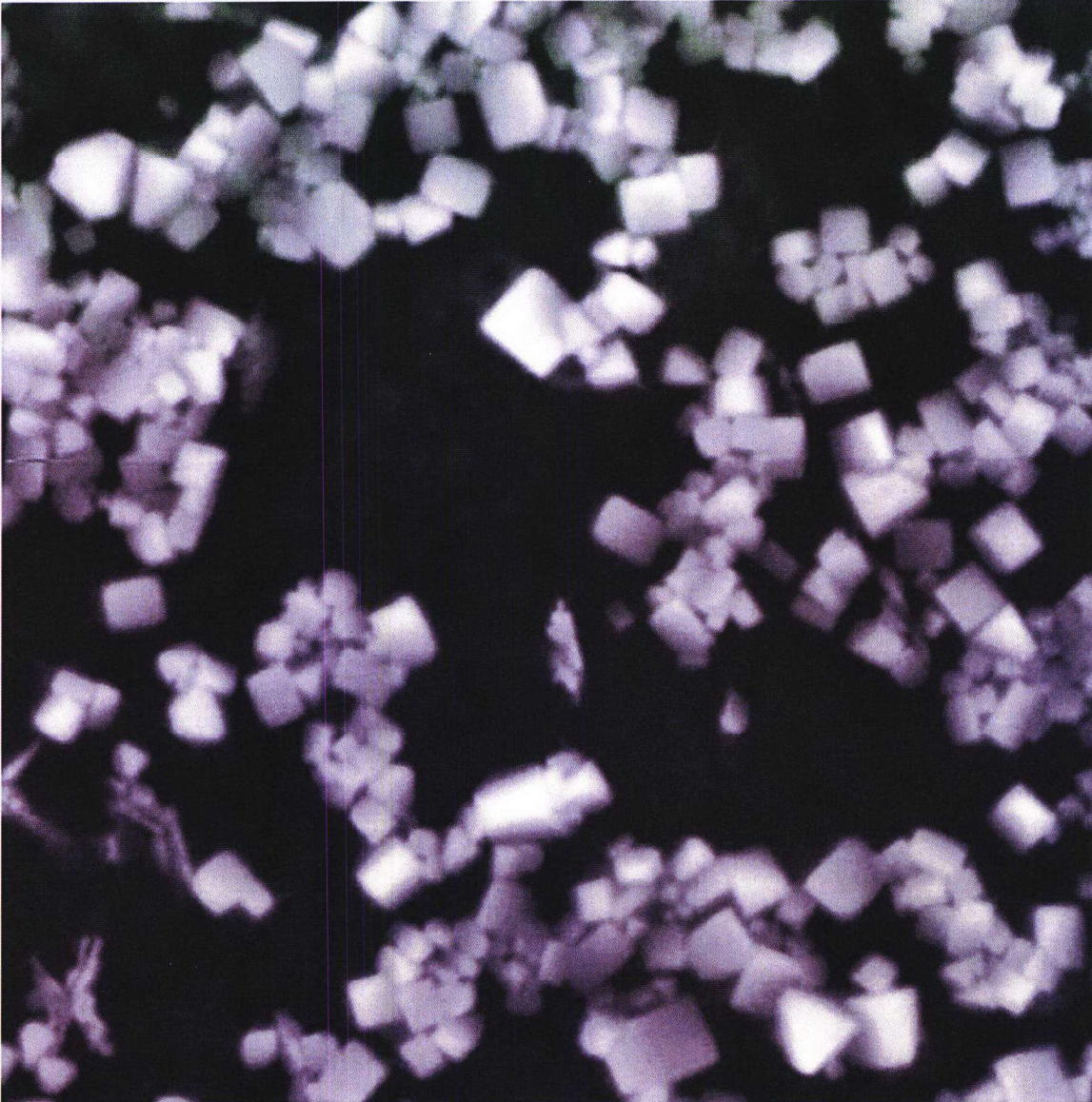


FIGURA 5



FIGURA 6

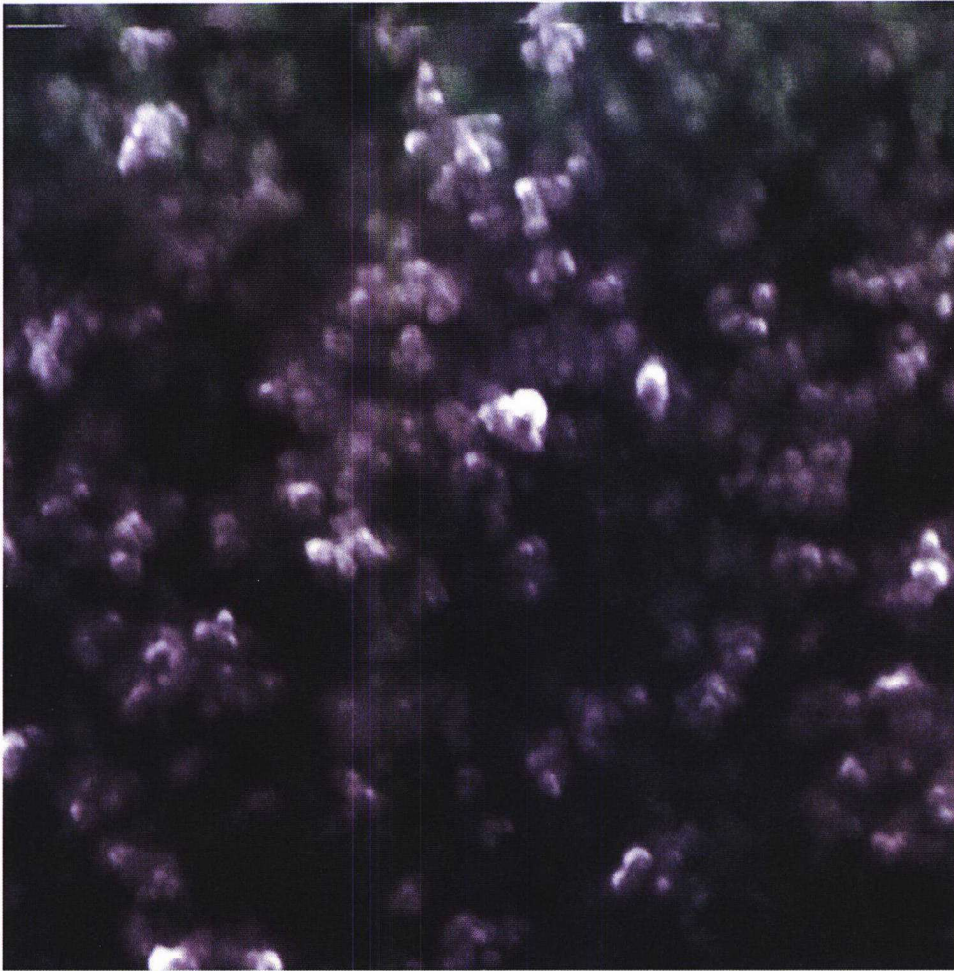


FIGURA 7

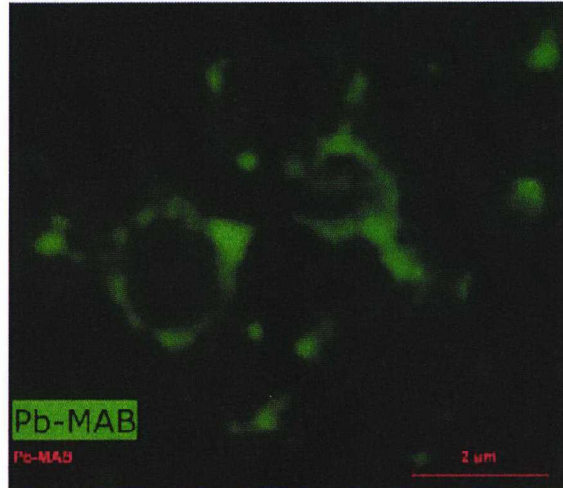
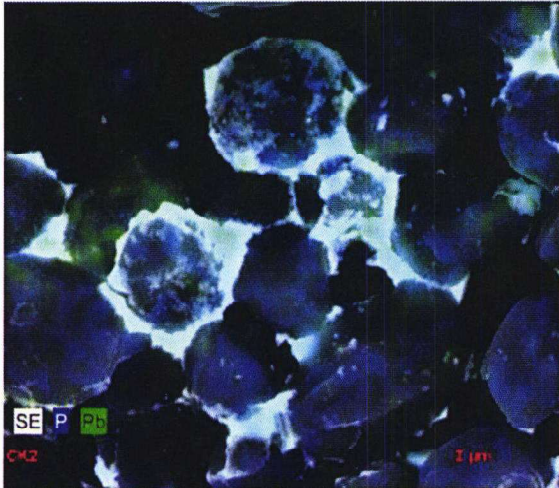


FIGURA 8

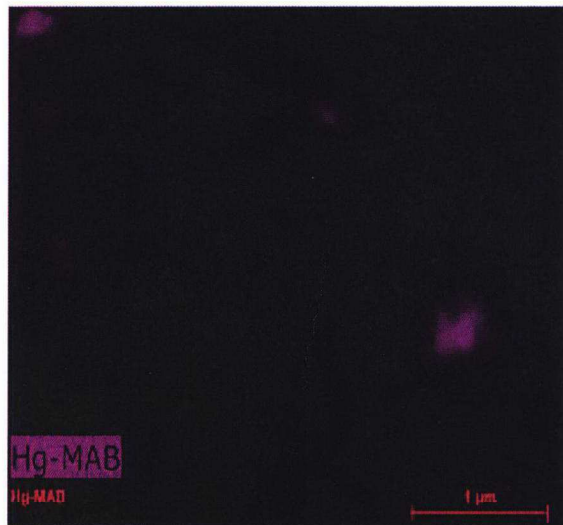
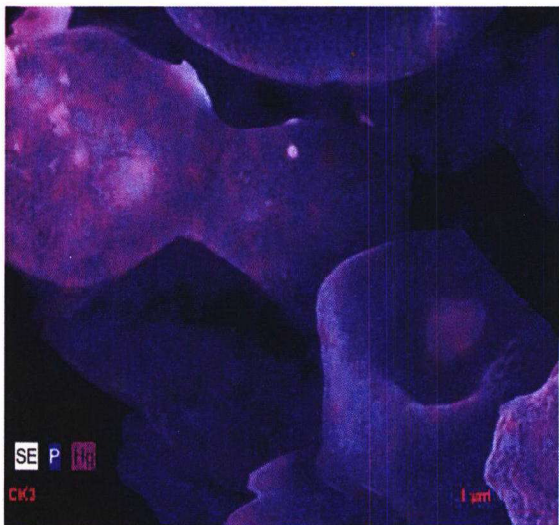


FIGURA 9

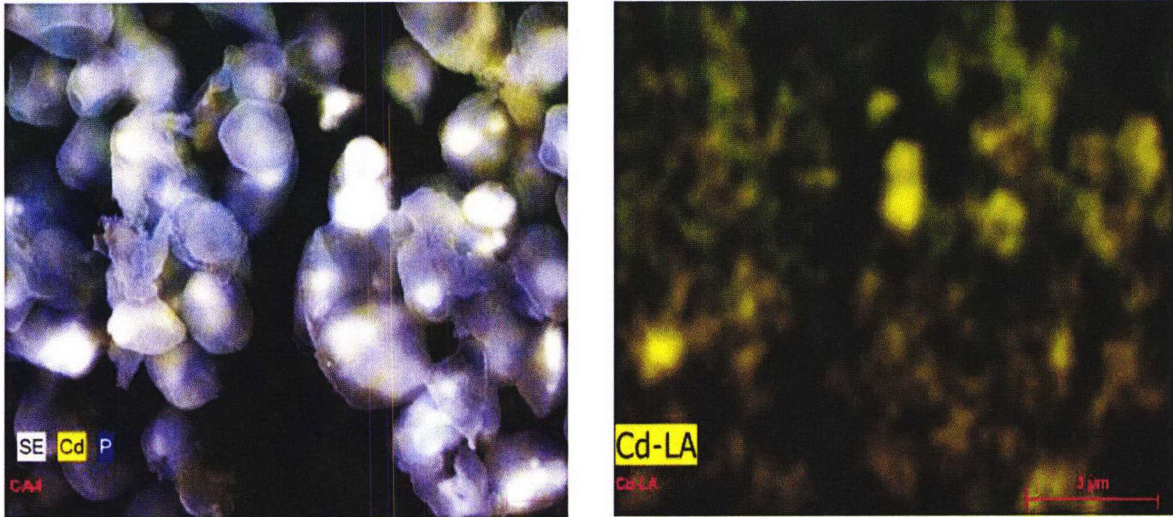


FIGURA 10

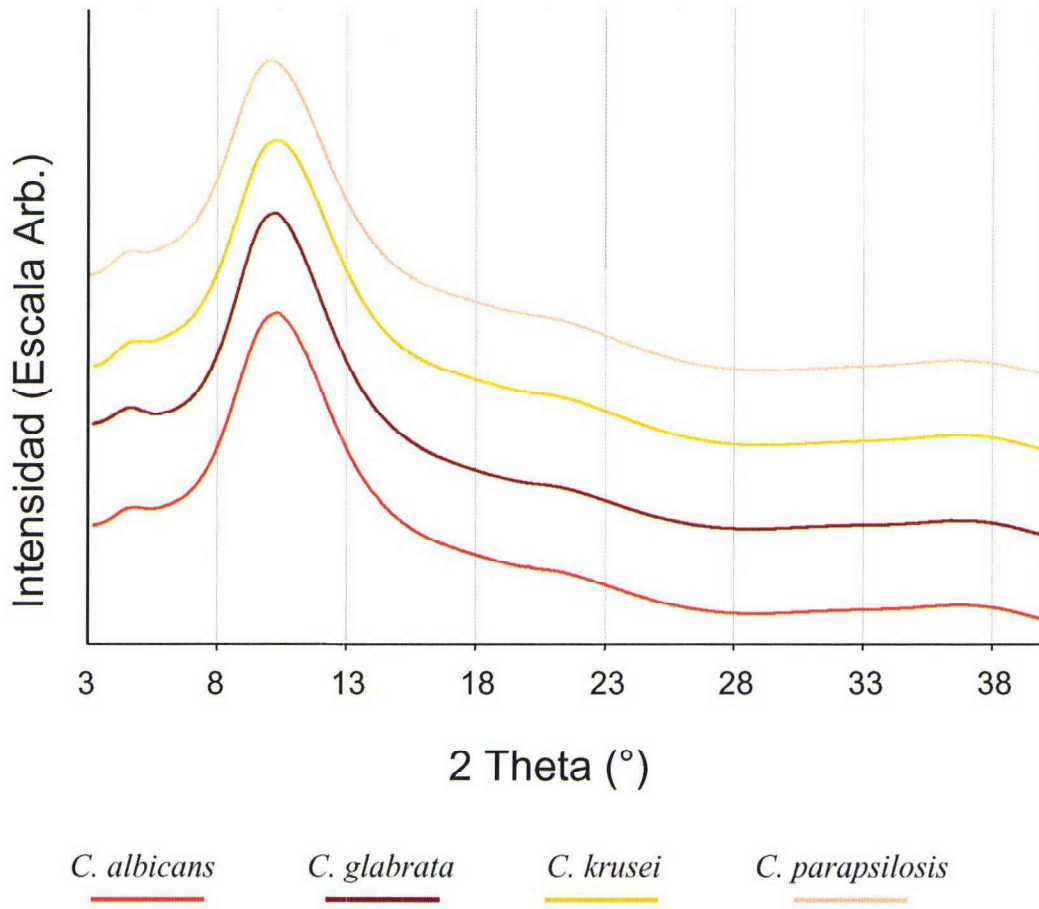


FIGURA 11

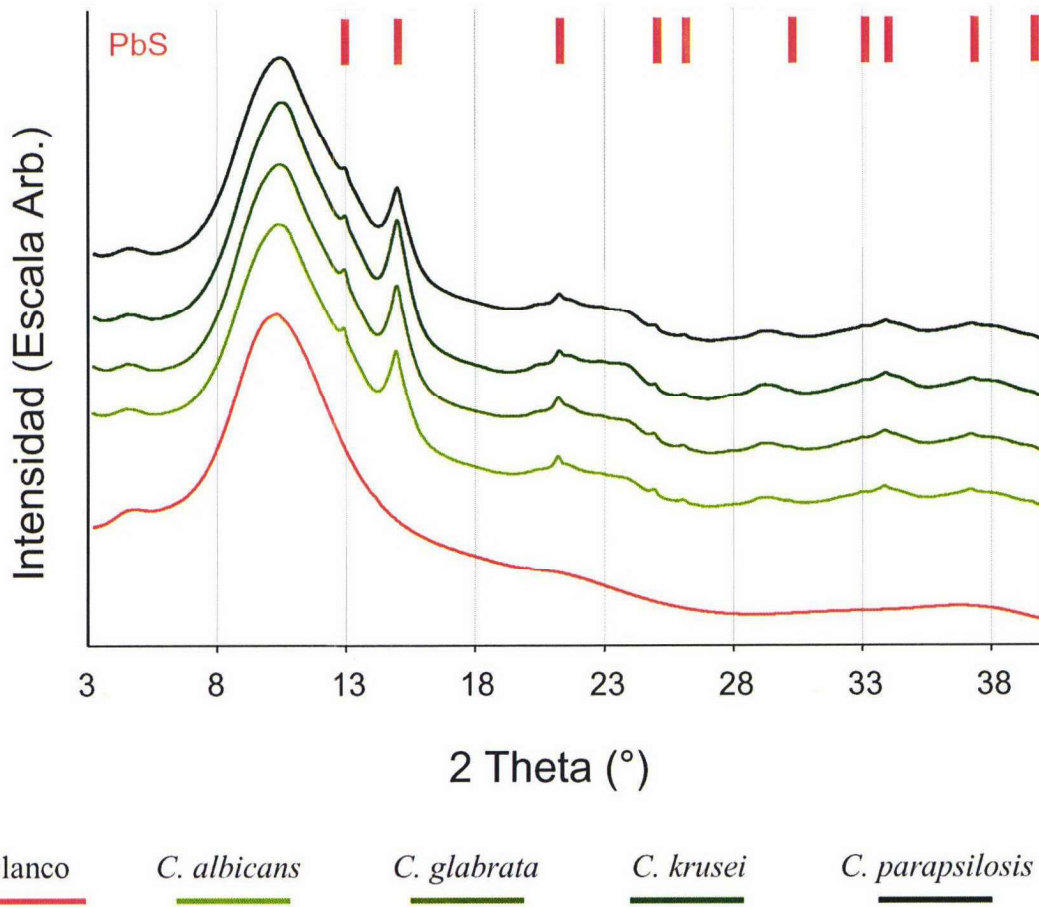


FIGURA 12

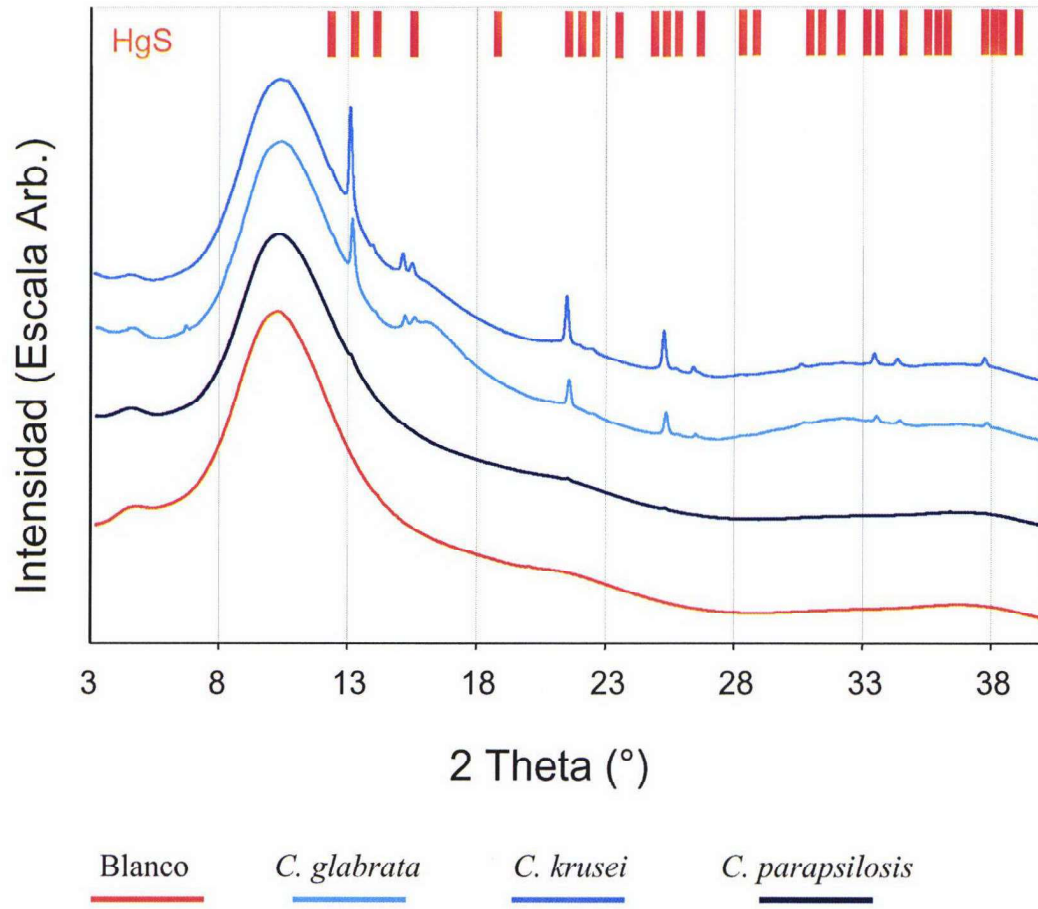


FIGURA 13

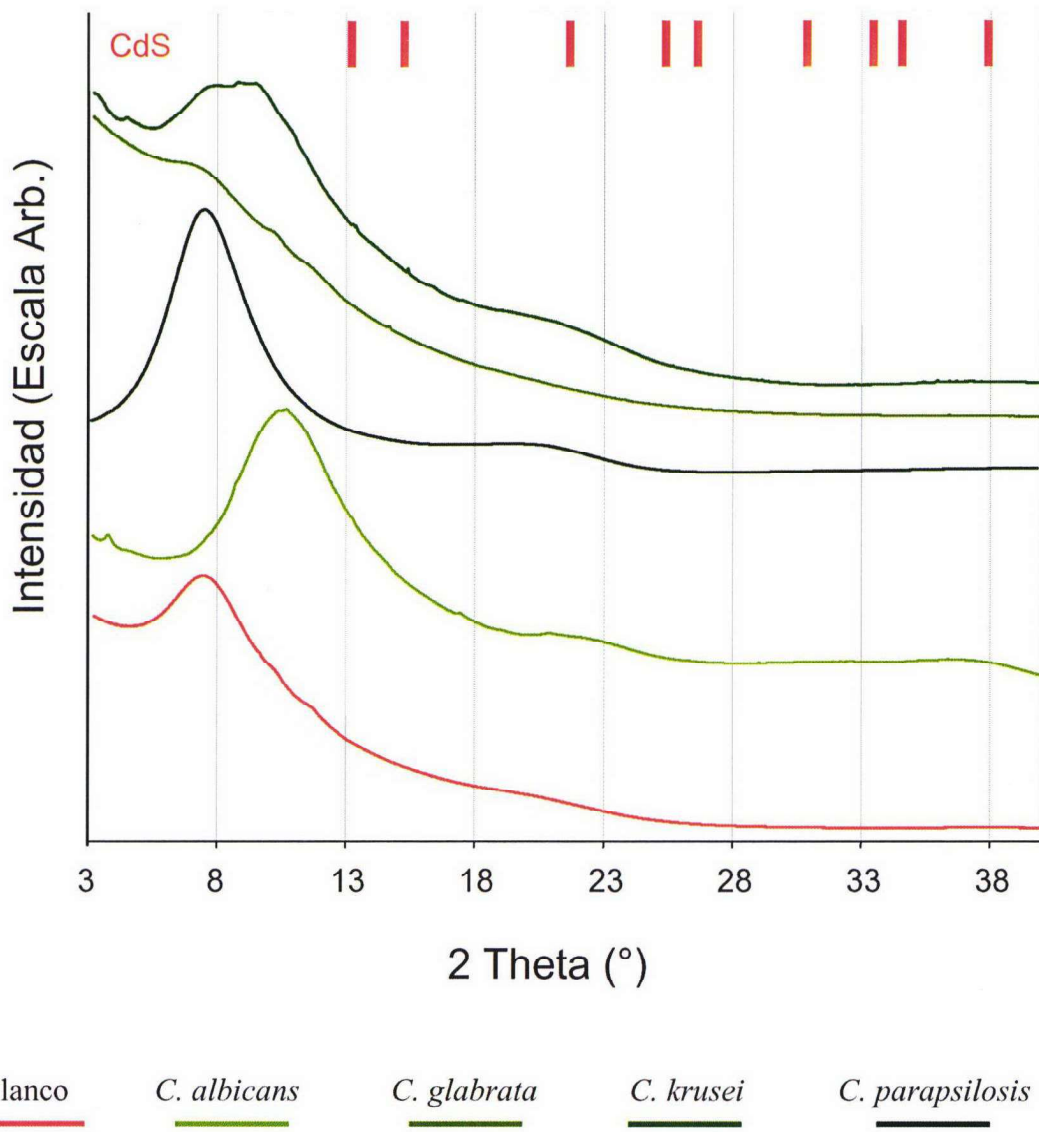


FIGURA 14