



Cinvestav-Monterrey

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Monterrey

# **Inactivación de *Escherichia coli* con feomelanina y radiación UV-VIS**

**Tesis que presenta**

MC. Denisse Fuentes López

**Para obtener el grado de**

Doctora en Ciencias

en Ingeniería y Física Biomédicas

**Directora de Tesis:**

Dra. Hilda Josefina Mercado Uribe

Apodaca, Nuevo León

Julio 2022

# Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mi periodo de estudios de Doctorado.

A mi tutora de tesis, la Dra. Hilda J. Mercado Uribe por brindarme la confianza y el apoyo para realizar este proyecto.

A mis sinodales el Dr. Daniel P. Sánchez Herrera y el Dr. Jesús Santana Solano por sus comentarios y correcciones a este proyecto.

A mi sinodal, el Dr. Carlos Ruiz Suárez por sus comentarios, correcciones y por facilitarme el uso de su laboratorio, el cual fue esencial para la realización de diferentes tipos de mediciones, para cumplir los objetivos de este proyecto.

A mi sinodal, el Dr. José Luis Hernández García por sus comentarios, correcciones y apoyo brindado durante la realización de este proyecto.

A la Dra. María Antonieta Fernández Herrera, por sus comentarios, apoyo y por facilitarme el uso de su laboratorio y realización de mediciones para la caracterización de mis muestras.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) Unidad Monterrey por el apoyo extraordinario otorgado para la terminación de este proyecto y a todos los profesores que contribuyeron en mi formación académica.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) Unidad Mérida y a todos los profesores técnicos y estudiantes por su apoyo técnico para la realización de este proyecto.

A Daniel por sus conocimientos y apoyo en la realización del arreglo optoelectrónico utilizado en este proyecto.

Al proyecto SEP-CONACYT A1-S-8125, que se destinó parcialmente para realizar este trabajo.

A mis amigos Carol, Eduardo, Ricardo Rodríguez, Jorge y Jautzi quienes siempre estuvieron apoyándome y dándome ánimos cuando más lo necesité.

Agradezco a mi familia quienes siempre han estado pendiente de mí en todo momento. Principalmente a mi mamá Magdalena, mis hermanos Alex, Eduardo y Jennifer.

# Índice

Índice de figuras.....	I
Índice de tablas .....	IV
Resumen.....	V
Abstract.....	VI
INTRODUCCIÓN .....	1
Hipótesis .....	3
Objetivos... ..	3
1. Inactivación fotodinámica antimicrobiana .....	4
1.1. Radiación electromagnética: luz azul y UV-A .....	4
1.2. Resistencia microbiana .....	6
1.3. Fotoinactivación microbiana .....	8
1.4. Características ideales de un fotosensibilizador.....	10
1.5. Vías de generación de ROS .....	12
1.6. Células bacterianas: dianas de la terapia fotodinámica .....	14
1.6.1. Peptidoglicano.....	15
1.6.2. Membrana externa de bacterias Gram-negativas: el lipopolisacárido (LPS).....	16
1.6.3. <i>Escherichia coli</i> .....	18
1.6.4. EDTA: agente desorganizante de la membrana externa de bacterias Gram-negativas.....	19
1.6.5. Daño oxidativo celular .....	22
2. Síntesis y caracterización de nanopartículas de feomelanina .....	25
2.1. Feomelanina: propiedades y características .....	26
2.1.1. Síntesis de feomelanina.....	27
2.2. Materiales y métodos .....	28

2.2.1. Preparación de nanopartículas de feomelanina .....	28
2.2.2. Métodos de caracterización.....	29
2.3. Resultados y discusión .....	32
2.4. Conclusión .....	39
3. Inactivación de <i>Escherichia coli</i> con nanopartículas de feomelanina .....	40
3.1. Fotooxidación en feomelanina.....	41
3.2. Materiales y métodos .....	44
3.2.1. Cultivo y preparación de bacterias.....	44
3.2.2. Arreglo optoelectrónico.....	45
3.2.3. Proceso de fotoinactivación de <i>E. coli</i> .....	47
3.2.4. Cuantificación del efecto de la foto-inactivación en <i>Escherichia coli</i> .....	49
3.3. Resultados y discusión .....	50
3.4. Conclusión.....	64
3.5. Perspectivas .....	65
BIBLIOGRAFÍA .....	66

# Índice de figuras

Figura 1.1. Parte del espectro electromagnético en donde se muestra el rango de la luz visible.....	4
Figura 1.2. Espectro de absorción de los principales cromóforos de la piel.....	5
Figura 1.3. Mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias Gram-negativas... .....	8
Figura 1.4. Mecanismo fundamental fotofísico y fotoquímico simplificado de aPDT. <sup>0</sup> PS: fotosensibilizador en estado basal; <sup>1</sup> PS: fotosensibilizador en estado singlete; <sup>3</sup> PS: fotosensibilizador en estado triplete excitado; hv: fotón; <sup>3</sup> O <sub>2</sub> : oxígeno en estado basal; <sup>1</sup> O <sub>2</sub> : oxígeno en estado singlete; P: F: fluorescencia; C: calor; ISC: cruce intersistema; P: fosforescencia; O <sub>2</sub> <sup>-</sup> : anión superóxido; OH: radical hidroxilo; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : peróxido de hidrógeno.....	10
Figura 1.5 Estructura del peptidoglicano. A) Estructura presente en <i>E. coli</i> y otras gram-negativas. B) Estructura universal del peptidoglicano (G=N-acetilglucosamina; M= ácido N-acetilmurámico). .....	16
Figura 1.6. Estructura general del LPS de bacterias Gram-negativas. Aunque la composición varía entre especies, en general está formado por lípido A- KDO, cetodesoxioctanato. Hep= heptosa, Glu=Glucosa, Gal=galactosa, GlcN=glucosamina, GluNac=N-acetilglucosamina, P= fosfato.....	17
Figura 1.7. Pared celular de bacterias Gram-negativas. A) Distribución del LPS, el lípido A, los fosfolípidos, porinas y lioproteínas en la membrana externa de bacterias Gram-negativas. B) Modelo de las porinas, proteína formada por 3 subunidades transmembranales.....	18
Figura 1.8. Micrografía de <i>Escherichia coli</i> . A) Micrografía electrónica de barrido de <i>E.</i> <i>coli</i> . B) Pared celular de <i>E. coli</i> observada por microscopia electrónica de transmisión mostrando el periplasma, la membrana interna y externa.....	19
Figura 1.9. Estructura química del EDTA completamente desprotonada.....	20
Figura 1.10. A) Membrana externa de bacterias Gram–negativas. Se observa el LPS y cationes como el Ca <sup>+</sup> que estabilizan la membrana externa mediante interacciones electrostáticas entre las sales y los grupos fosfato (P <sup>-</sup> ). B) Proceso simplificado de quelación de los cationes Ca <sup>+</sup> presentes en la membra de bacterias Gram–negativas mediante EDTA.....	21
Figura 1.11. Daño oxidativo causado por ROS en lípidos y proteínas. ....	22

Figura 1.12. Proceso de peroxidación lipídica.....	23
Figura 2.1. Estructura modelo de la feomelanina. Se conforma por dos oligómeros principalmente: Benzotiazina (U1 + U2, U6 +U7) y Benzotiazol (U4 + U5). Las cadenas laterales de Dopaquinona pueden ciclarse (U3). Las flechas indican puntos posibles de crecimiento de la feomelanina.....	27
Figura 2.2. Vía de síntesis de la feomelanina por oxidación de L-tirosina y L-Dopa..	28
Figura 2.3. Equipo Labconco FreeZone 2.5 5 Liter Dry system (7670520) para la liofilización de las nanopartículas de feomelanina.....	30
Figura.2.4. Espectro de absorbancia UV-Vis de L-DOPA monitoreado durante 24 horas. Los espectros fueron tomados con intervalos de una hora. La flecha indica el momento en el que se le agrega cisteína y $KMnO^4$ a la solución.....	33
Figura.2.5. Espectro de absorbancia UV-Vis de la feomelanina (rojo) y la eumelanina (café).....	33
Figura.2.6. Distribución de tamaño de partícula de las nanopartículas de feomelanina en PBS.....	34
Figura.2.7. Nanopartículas de feomelanina obtenida mediante microscopía electrónica de barrido.....	35
Figura 2.8. Potencial zeta de nanopartículas de feomelanina en función de la concentración en diferentes medios dispersantes.....	36
Figura 2.9. Espectro de difracción de rayos X de las nanopartículas de feomelanina (rojo) y eumelanina (café).....	38
Figura. 2.10. Espectro FT-IR de feomelanina, comparada con eumelanina comercial.....	39
Figura 3.1. Formación de radicales benzotiazinólicos y benzotizólicos debido a la fotoexcitación de la feomelanina.....	42
Figura 3.2 Especies reactivas de oxígeno generadas por la eumelanina y la feomelanina. En los melanocitos, la principal especie generada por acción de la radiación UV-A es el anión superóxido.....	43
Figura 3.3. Proceso de cultivo bacteriano de <i>E.coli</i> . Solución A) Activación de la cepa (overnight). Solución B) Regularización del tiempo de generación de las bacterias para obtener una D. O= 0.3. Solución. C) Lavado por centrifugación de la solución bacteriana.....	45
Figura 3.4. Sistema optoelectrónico para la irradiación de bacterias <i>E. coli</i> controlado mediante interfaz Arduino-Labview.....	46

Figura 3.5. Representación de la preparación de los cultivos sólidos para la cuantificación de CFU en <i>E.coli</i> en las suspensiones control e irradiadas.....	49
Figura 3.6. Fotoinactivación de <i>E.coli</i> con nanopartículas de feomelanina a diferentes concentraciones .....	51
Figura 3.7. Toxicidad en condiciones de oscuridad (círculos) y el efecto bactericida con luz azul de 450 nm y 1 h de exposición (triángulos) en la inhibición del crecimiento de <i>E. coli</i> , en función de la concentración de las nanopartículas de feomelanina.....	52
Figura 3.8. Fotoinactivación de <i>E.coli</i> con nanopartículas de feomelanina (166 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), excitadas con luz azul.....	53
Figura 3.9. Fotoinactivación de <i>E.coli</i> con nanopartículas de feomelanina con una concentración fija de 166 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , en presencia de EDTA (10 Mm) y excitadas con luz azul.....	56
Figura 3.10. Fotoinactivación de <i>E.coli</i> con nanopartículas de feomelanina. A) 123 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; B) 166 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las muestras fueron excitadas con radiación UV-A incubadas durante 1 h.....	58
Figura 3.11. Fotoinactivación de <i>E.coli</i> con nanopartículas de feomelanina. A) 123 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; B) 166 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Ambas muestras fueron excitadas con radiación UV-A incubadas durante 1 h.....	60
Figura 3.12. Fotoinactivación de <i>E.coli</i> con nanopartículas de feomelanina (166 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). .....	61
Figura 3.13. Imágenes de muestras de <i>E. coli</i> después de 3 horas de fotoinactivación con radiación UV-A en presencia de nanopartículas de feomelanina 166 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y EDTA (10 mM). .....	62
Figura 3.14. Fotoinactivación de <i>E. coli</i> con nanopartículas de feomelanina (166 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), EDTA (10 mM), y fluencias de A) 180 $\text{J}/\text{cm}^2$ y B) 270 $\text{J}/\text{cm}^2$ . Ambas excitadas con radiación UV-A. *P < 0.05.....	63



# Índice de tablas

Tabla 1. Configuración electrónica en el orbital $2\pi^*$ de moléculas de oxígeno diatómico .....	14
Tabla 2. Porcentaje promedio de los elementos presentes en distintas muestras de feomelanina (PM). Los porcentajes de eumelanina se muestran para efectos comparativos.....	37
Tabla 3. Grupos experimentales de irradiación con luz azul y UV-A bajo diferentes fluencias de energía ( $90, 180$ y $270 J/cm^2$ ),, concentraciones de feomelanina ( $83, 123, 166$ y $247 \mu g/mL$ ) y con adición de EDTA. ....	47
Tabla 4. Unidades formadoras de colonias (CFU) por mL para muestras control y expuestas a luz azul a diferentes concentraciones y una fluencia de $90 J/cm^2$ .....	51
Tabla 5. Unidades formadoras de colonia (CFU) por mL para muestras control y expuestas a luz azul a diferentes fluencias de energía con una concentración fija ( $166 \mu g/mL$ ).....	54
Tabla 6. Unidades formadoras de colonia (CFU) por mL para muestras control y expuestas a luz azul en presencia de feomelanina con una concentración fija de $166 \mu g/mL$ y EDTA a diferentes fluencias de energía. ....	57
Tabla 7. Unidades formadoras de colonia (CFU) por mL para muestras control y expuestas a radiación UV-A a diferentes concentraciones con una fluencia de energía fija de $90 J/cm^2$ . ....	59
Tabla 8. Unidades formadoras de colonia (CFU) por mL para muestras control y expuestas a radiación UV-A, a diferentes concentraciones de feomelanina con EDTA ( $10 mM$ ) y una fluencia de energía de $90 J/cm^2$ .....	60
Tabla 9. Unidades formadoras de colonia (CFU) por mL para muestras control y expuestas a luz azul a diferentes fluencias de energía con una concentración fija ( $166 \mu g/mL$ ).....	62
Tabla 10. Unidades formadoras de colonia (CFU) por mL para muestras control y expuestas a radiación UV-A a diferentes fluencias de energía con una concentración fija de $166 \mu g/mL$ . ....	63

## Resumen

En este proyecto se investigó el efecto de la fotosensibilización con nanopartículas de feomelanina, luz azul y la radiación UV-A en la bacteria Gram–negativa *Escherichia coli*; para ello se realizó primero la síntesis química de nanopartículas de feomelanina. Obtuvimos partículas nanométricas dispersables en medios acuosos con algunas diferencias respecto a las sintetizadas por otro grupo de investigación, dichas nanopartículas fueron caracterizadas mediante distintas técnicas espectroscópicas. Mediante dispersión dinámica de luz, se encontró que el potencial zeta es negativo. Por otra parte, el efecto de la fotosensibilización fue medido mediante el conteo de unidades formadoras de colonias con análisis estadísticos de las gráficas correspondientes para cada uno de los grupos irradiados. Los resultados obtenidos muestran que las bacterias irradiadas con UV-A y feomelanina a fluencias de energía de  $270 \text{ J/cm}^2$  tuvieron un mayor grado de inactivación respecto a las irradiadas con luz azul, dicho efecto fue potenciado por el uso de un agente desestabilizante de la pared celular de estos microorganismos, que a su vez reduce el potencial zeta de las nanopartículas, haciendo que estas se acerquen más a la membrana y el efecto producido por las especies reactivas de oxígeno generadas sea más potente y pueda dañar estructuras externas como lípidos y proteínas. Nuestros resultados demuestran que es necesario el uso de agentes desestabilizantes de membrana para obtener el mayor grado de inactivación a fluencias altas de energía con UV-A y feomelanina para aniquilar eficazmente bacterias *E. coli*.

# Abstract

In this project, the effect of photosensitization with pheomelanin nanoparticles, blue light and UV-A radiation on the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* was investigated, for which it was first performed the chemical synthesis of pheomelanin nanoparticles. We obtained nanometric particles dispersed in aqueous media with some differences compared to those synthesized by another research group. These nanoparticles were characterized by different spectroscopic techniques. By using dynamic light scattering, we found that the zeta potential was negative. On the other hand, the effect of photosensitization was measured by counting colony-forming units with a statistical analysis of the corresponding graphs for each one of the irradiated groups. The results obtained show that the bacteria irradiated with UV-A and pheomelanin at energy fluences of  $270 \text{ J/cm}^2$  had a higher degree of inactivation compared to those irradiated with blue light. The effect was enhanced by the use of a destabilizing agent of the cell wall of these microorganisms, which in turn reduces the zeta potential of the nanoparticles, making them come closer to the membrane and the effect produced by the reactive oxygen species generated is more powerful and can damage external structures such as lipids and proteins. Our results demonstrate that the use of membrane destabilizing agents is necessary to obtain the highest degree of inactivation at high energy fluences with UV-A and pheomelanin to effectively kill *E. coli* bacteria.

# INTRODUCCIÓN

La radiación ultravioleta (UV) e incluso la luz visible alteran la estructura y el funcionamiento de algunas biomoléculas, como el ADN y las proteínas. Ejemplo de ello es la generación de cataratas y queratopatía y fotoenvejecimiento [1]. Pese a todos estos efectos negativos, también se han observado efectos benéficos, por ejemplo, el uso de UV ayuda a combatir el cáncer, y beneficios en el tratamiento de la ictericia. Además, se utiliza en el tratamiento de aguas, para la desinfección provocada por microorganismos.

La inactivación fotodinámica antimicrobiana (aPDI, por sus siglas en inglés) es un nuevo método que está siendo aplicado actualmente en áreas como la odontología y oncología [2]. Consiste en el uso de radiación visible o ultravioleta, en conjunto con una molécula fotosensibilizante, la cual absorbe esta radiación y genera en presencia de oxígeno molecular, especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Recientemente la aPDI ha retomado importancia con el aumento de la resistencia de los microorganismos a los antibióticos [3]. Existen distintos tipos de fotosensibilizadores, con características específicas y funcionales para distintos tipos de microorganismos. Su uso depende del blanco o diana en donde se aplicará, los más eficaces para atacar bacterias son por lo regular aquellos con carga positiva y pico de absorción en el rango de la luz roja. Lo anterior es debido a la carga neta negativa de las bacterias que permite el acercamiento de este tipo de fotosensibilizadores a la pared celular de estos microorganismos y a la aplicabilidad *in vivo* de los fotosensibilizadores en la piel, cuya mejor penetrabilidad en la piel se da con la luz roja.

Por otro lado, la feomelanina es un pigmento encontrado en la piel principalmente y se han descubierto sus propiedades fotosensibilizantes [4-9], incluso ya se ha usado para eliminar células cancerígenas [8]. Sin embargo, aún no se ha reportado su uso en células microbianas. En este trabajo se investiga la inactivación fotodinámica de *Escherichia coli* usando luz azul y radiación UV-A y nanopartículas de feomelanina sintetizadas químicamente.

En el capítulo 1 se describen los elementos necesarios para la inactivación fotodinámica antimicrobiana. Los tipos de radiación electromagnética utilizados, los

mecanismos de acción de la inactivación fotodinámica, las características de los fotosensibilizadores, así como las estructuras bacterianas sensibles a la fotoinactivación.

En el capítulo 2 se presenta el proceso de síntesis química de las nanopartículas de feomelanina y su caracterización mediante distintas técnicas espectroscópicas y de imagen como espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés) y microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés).

En el capítulo 3 se presenta el estudio experimental del efecto de la inactivación fotodinámica antimicrobiana de *E.coli* con nanopartículas de feomelanina a distintas longitudes de onda, concentraciones y fluencias de energía. Este efecto es medido mediante el análisis estadístico del conteo de unidades formadoras de colonias.

# Hipótesis

Es posible la fotoinactivación de *Escherichia coli* usando radiación UV-Vis y feomelanina como fotosensibilizador.

# Objetivos

## Objetivo general:

Investigar el efecto de la fotosensibilización con radiación UV-Vis y feomelanina en *E.coli* (Gram - negativa).

## Objetivos particulares:

- Establecer un protocolo de síntesis para la obtención de feomelanina.
- Caracterizar la feomelanina mediante diferentes técnicas.
- Establecer los parámetros experimentales con feomelanina y radiación UV-Vis para la fotoinactivación de *E. coli*.
- Realizar el conteo de unidades formadoras de colonias para medir el grado de fotoinactivación microbiana.
- Detectar las especies reactivas de oxígeno (oxígeno singlete y radical hidroxilo) generadas por la fotosensibilización.

# 1. Inactivación fotodinámica antimicrobiana

## 1.1. Radiación electromagnética: luz azul y UV-A

La radiación electromagnética se divide en varias regiones, las más importantes en inactivación fotodinámica son la radiación ultravioleta (UV, 100 - 400 nm) y la región del espectro visible (400-700 nm) (figura 1.1). La radiación UV, está dividida en 3 regiones: UV-A (315 nm – 400 nm), UV-B (280 nm - 315 nm) y UV-C (100 nm - 280 nm). A nivel del mar, recibimos aproximadamente 6 % de radiación UV-A, 50% de radiación visible y 40% de radiación infrarroja. La radiación UV-A que recibimos del sol es mayor que la UV-B, en tanto que, la radiación UV-C es absorbida completamente por la capa de ozono. Debido a las diferencias en la dispersión y la absorción, la relación de UV-B a UV-A depende de varios factores, como la latitud, altitud, ángulo cenital (ángulo perpendicular con respecto al suelo), estación del año, entre otros [10].

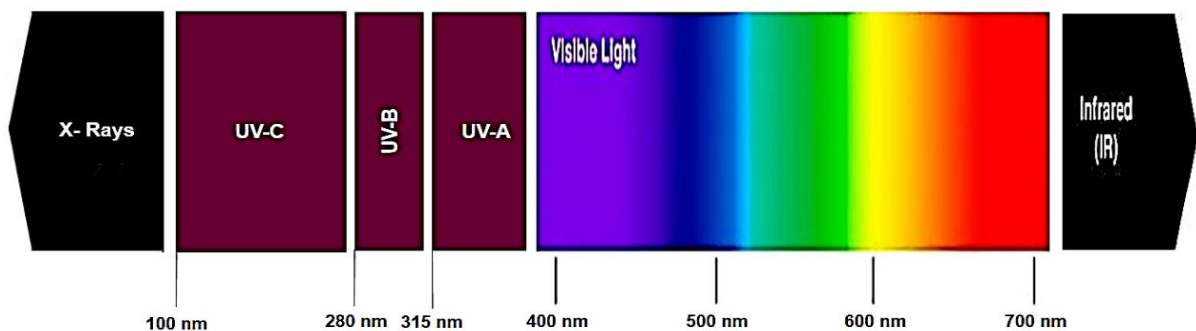


Figura 1.1. Parte del espectro electromagnético en donde se muestra el rango de la luz visible.

Los efectos dañinos de la radiación ultravioleta se han estudiado ampliamente. Es conocido que esta radiación altera la estructura y el funcionamiento de algunas biomoléculas, como el ADN y las proteínas[11 - 12]. Aunque también hay efectos positivos; por ejemplo, el uso de UV pulsada ayuda a combatir el cáncer, y la fototerapia produce beneficios en enfermedades como la ictericia. Por otra parte, los residuos aromáticos de las proteínas absorben fuertemente en el rango de la UV-B y UV-C. Algunos de los efectos que produce este tipo de radiación son: los

entrecruzamientos, el desplegamiento o desnaturalización y agregación de proteínas. En el ADN se producen daños de bases, ruptura de una sola o doble cadena, formación de dímeros de pirimidinas, entre otros [12]. A nivel orgánico, se ha demostrado que también puede generar cataratas y queratopatía, es decir, proteínas alteradas que se concentran en la superficie de la córnea, lo cual produce opacidad [13]. En la piel, por ejemplo, la radiación UV-A a altas dosis produce fotoenvejecimiento, y la radiación UV-B produce radicales libres, eritema, y cáncer de piel (melanoma) [1]. En el caso de las plantas, este tipo de radiación afecta el crecimiento y captura de energía, altera la fotosíntesis e incrementa el dióxido de carbono.

En la terapia fotodinámica, para aplicaciones *in vivo*, el uso de radiación visible es la más apropiada debido a las propiedades de dispersión y absorción específicas de la piel. Estas propiedades dependen de los cromóforos presentes en ella (figura 1.2), puesto que cada uno de ellos, tiene picos de absorción específicos (en su mayoría, dentro del espectro visible), a excepción de la melanina, de la cual se hablará más adelante. Por lo tanto, a mayor longitud de onda, mayor penetración en la piel.

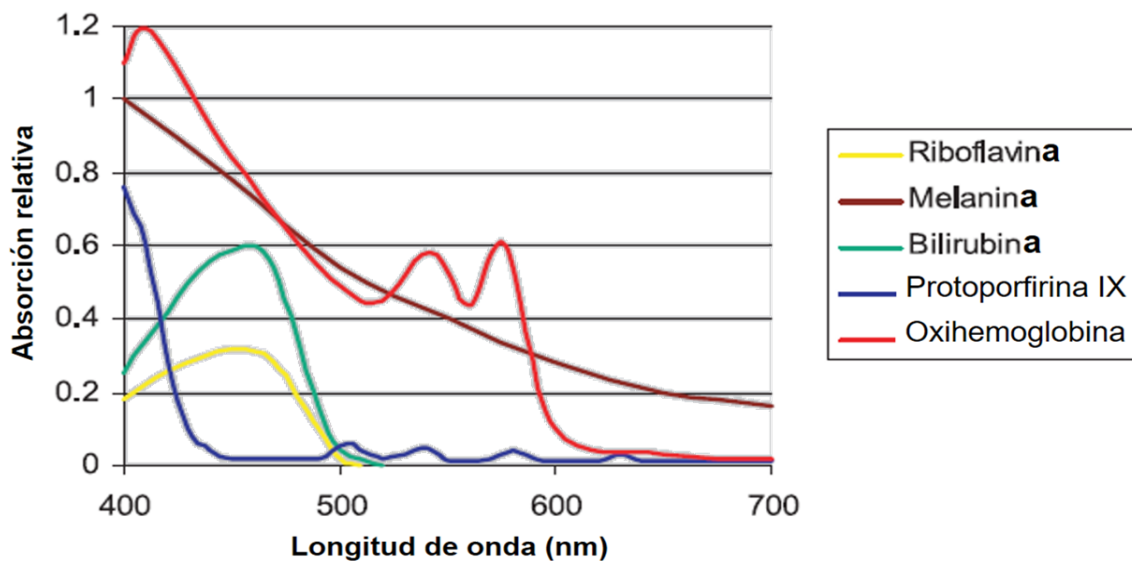


Figura 1.2. Espectro de absorción de los principales cromóforos de la piel [1].

Cada longitud de onda tiene asociada cierta energía, determinada por la ecuación de Plack:

$$E = h \frac{c}{\lambda} \quad (1.1)$$



donde  $E$  es la energía de los fotones con longitud de onda  $\lambda$ ,  $c$  es la velocidad de la luz ( $3 \times 10^8$  m/s) y  $h$  es la constante de Planck ( $6.63 \times 10^{-34}$  J·s). Así, los fotones con una longitud de onda pequeña tienen asociada una alta energía.

A lo largo del tiempo se han utilizado distintas fuentes de emisión, entre los más usados e importantes se encuentran [14]:

1. *El Láser*. Tienen la ventaja de ser monocromático, coherente y está colimado. Produce luz de alta energía en tiempo de exposición.
2. *Diodos emisores de Luz (LED, por sus siglas en inglés)*. Son materiales semiconductores que emiten luz y generan muy poco calor, abarcan un ancho de banda de 50 nm en promedio. Son muy populares porque son pequeños, seguros, baratos y, por lo tanto, fáciles de utilizar.
3. *Diodos láser*. Generalmente están hechos de arseniuro de galio-aluminio. Son dispositivos semiconductores, a diferencia de los láseres, abarcan un ancho de banda mayor que estos, pero más estrechos que los LEDs.

El tipo de dispositivo emisor de luz a utilizar, dependerá principalmente de la aplicación que se le dará. Particularmente, en terapia fotodinámica es importante incluir otros parámetros para dicha elección, como la zona u órgano que se tratará, la dosis a utilizar, y el tipo de fotosensibilizador.

Si bien, las longitudes de onda óptimas para la terapia fotodinámica se encuentran entre 650 nm - 850 nm, debido a que el esparcimiento de la luz será mínima y la penetración en tejidos será el máximo; esto no implica que no se puedan usar otras longitudes de onda más cortas y energéticas, como la luz azul y la radiación UV-A, puesto que existen fotosensibilizadores que responden a estas longitudes de onda.

## **1.2. Resistencia microbiana**

Desde hace millones de años han existido microorganismos con diferentes características. Estos microorganismos han logrado prevalecer hasta la actualidad

gracias a la adaptación a las diferentes condiciones del planeta. Muchos de estos microorganismos son patógenos y pueden dañar su medio circundante, incluyendo a los humanos. En este sentido, la humanidad continuamente ha buscado protegerse de estos patógenos mediante el uso de antibióticos, antivirales, antisépticos y otros agentes antimicrobianos. En el proceso de adaptación, los microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia para protegerse del medio.

A pesar de la creación y descubrimiento de antibióticos, antivirales y antimicrobianos, la resistencia a estos últimos es un fenómeno biológico que ocurre naturalmente en los microorganismos, pero esto llega a ser un problema muy grave cuando se hace mal uso de los antibióticos debido al desconocimiento o a la exposición continua de los medicamentos, para tratar infecciones en dosis no recomendadas.

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 hasta la actualidad, muchos fármacos han perdido su efectividad frente los microorganismos, principalmente a las bacterias [15]. Debido a lo anterior, las enfermedades generadas por estas bacterias son un problema mundial serio, las tasas de mortalidad y gastos económicos han aumentado considerablemente y se estima que para el año 2050 habrá 300 millones de muertes, con un costo para la economía mundial de \$100 billones de dólares [2].

En los microorganismos, la resistencia puede clasificarse de la siguiente forma [16]:

- Resistencia intrínseca o natural: en ésta, los microorganismos no poseen las dianas para los fármacos que se están utilizando. Normalmente se refiere a fármacos que necesitan entrar a la célula microbiana.
- Resistencia adquirida: Cuando el microorganismo que es susceptible a un fármaco adquiere nuevos mecanismos que en el futuro evitan que este mismo fármaco los afecte. Este tipo de resistencia puede darse debido a varios factores (figura 1.3):
  - Enzimas que inactivan el agente microbiano.
  - Mutaciones en las dianas a las que ataca el agente microbiano, haciendo que la unión se reduzca.

- Modificaciones postranscripcionales o postraduccionales de la diana, reduciendo la unión.
- Reducción de la absorción del agente microbiano por parte de la célula bacteriana.
- El antimicrobiano sale de la célula por acción de bombas de eflujo.

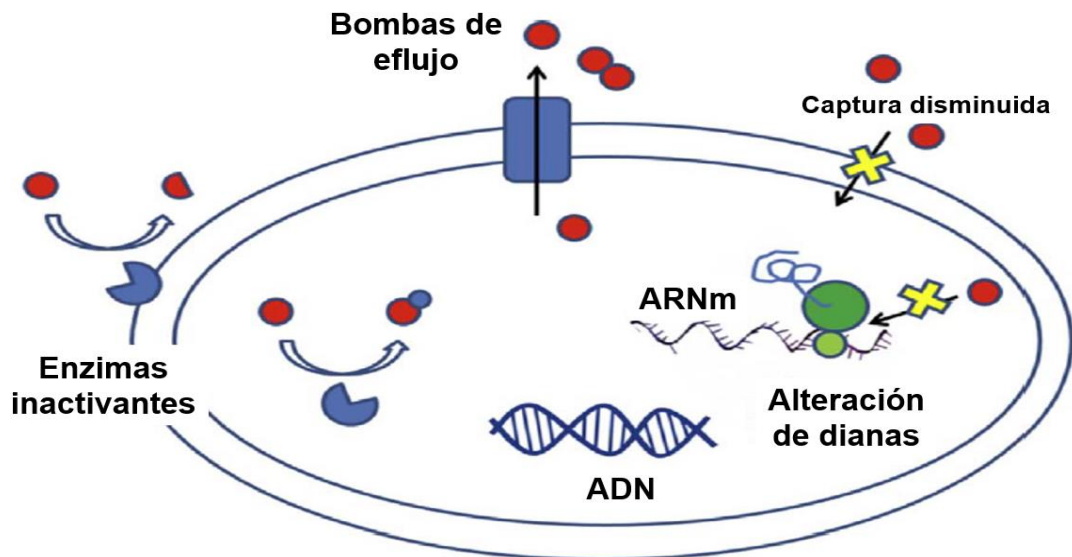


Figura 1.3. Mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias Gram-negativas. Modificado de [16].

A pesar de la lucha contra este problema mundial por parte de farmacéuticas y gobiernos de distintos países, la resistencia de los microorganismos continúa siendo una amenaza en la actualidad. Esto genera la necesidad de buscar nuevas alternativas antimicrobianas que sean eficientes y que principalmente no permitan que las bacterias generen resistencia. En la siguiente sección se describirán los fundamentos de la inactivación fotodinámica antimicrobiana (aPDI), que es una de las alternativas actuales que ha dado buenos resultados científicos.

### 1.3. Fotoinactivación microbiana

La aPDI se basa en la fotosensibilización, un proceso fotoquímico en el cual participan 3 componentes: el fotosensibilizador (PS, por sus siglas en inglés), el oxígeno molecular y la radiación electromagnética. Los PS son moléculas cromóforas que

interaccionan con fotones de diversas longitudes de onda, son capaces de llegar a un estado excitado y ceder energía para formar especies reactivas de oxígeno (ROS).

La inactivación fotodinámica antimicrobiana consiste en la aplicación de una molécula, el PS, el cual es fotoactivado a una longitud de onda específica en la presencia de oxígeno para generar especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales dañan a los microorganismos. El proceso general es el siguiente (figura 1.4):

1. El PS absorbe un fotón una  $\lambda$  específica y pasa desde su estado basal ( $^0\text{PS}$ ) a un estado de mayor reactividad, el estado singlete excitado ( $^1\text{PS}$ ).
2. El PS puede perder energía mediante la emisión de fluorescencia (F) o calor (C), regresando a su estado singlete basal ( $^0\text{PS}$ ). Sin embargo, para que suceda la fotosensibilización, el PS pasa de forma no radiativa del estado singlete excitado ( $^1\text{PS}$ ) a un estado de menor energía, el estado triplete excitado ( $^3\text{PS}$ ) de vida más larga y estable mediante el mecanismo de cruce intersistemas (ISC, por sus siglas en inglés), en donde, el PS disminuye su energía mediante una transición entre dos estados electrónicos con distinta multiplicidad de espín. La multiplicidad muestra las diferencias en la última subcapa electrónica de una molécula. Esta diferencia se debe al espín electrónico, propiedad que modifica el momento angular total de un electrón, alterando ligeramente la energía de dicha partícula [18].
3. De ese estado ( $^3\text{PS}$ ), el fotosensibilizador puede regresar a su estado basal por emisión de fosforescencia (P) o por dos mecanismos al reaccionar con oxígeno molecular y generar ROS. Cuando el  $^3\text{PS}$  colisiona con una molécula de oxígeno molecular (la cual puede estar disuelta en el medio donde se encuentra el PS), se elimina el triplete y se invierte el espín de los electrones más externos del oxígeno molecular, entonces el PS libera su energía mediante reacciones tipo I o tipo II:
  - a. Tipo I: Transferencia de carga (electrones) para generar radicales libres como superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidróxilo ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^{\cdot}$ , respectivamente).
  - b. Tipo II: Transferencia de energía generando oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ).

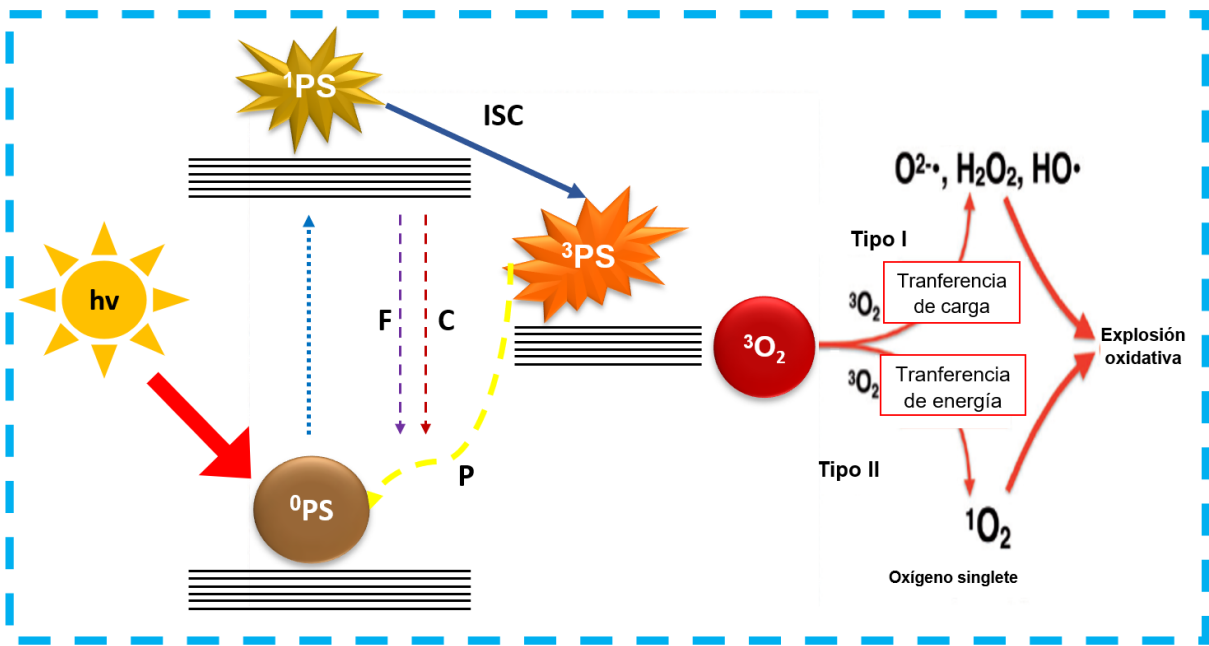


Figura 1.4. Mecanismo fundamental fotofísico y fotoquímico simplificado de aPDT.  $^0\text{PS}$ : fotosensibilizador en estado basal;  $^1\text{PS}$ : fotosensibilizador en estado singlete;  $^3\text{PS}$ : fotosensibilizador en estado triplete excitado;  $h\nu$ : fotón;  $^3\text{O}_2$ : oxígeno en estado basal;  $^1\text{O}_2$ : oxígeno en estado singlete; P: F: fluorescencia; C: calor; ISC: cruce intersistema; P: fosforescencia;  $\text{O}_2^{\cdot-}$ : anión superóxido;  $\text{OH}\cdot$ : radical hidroxilo;  $\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrógeno. Adaptado de [3].

## 1.4. Características ideales de un fotosensibilizador

Para elegir un fotosensibilizador, es necesario tomar en cuenta diversos factores. Uno de los principales es su nivel de penetración en la piel; este grado de penetración depende de la longitud de onda a la que éste absorba. La penetración de la luz en el tejido aumenta a mayor longitud de onda, esto quiere decir que los fotosensibilizadores más efectivos tienden a poseer bandas de absorbancia entre los 600 y 800 nm (rojo-infrarrojo). Sin embargo, también existen fotosensibilizadores que responden a longitudes de onda más cortas. Las longitudes de onda utilizadas comúnmente abarcan el ultravioleta A (UV-A, 330 a 400 nm), azul (400 a 490 nm), verde (490 a 550 nm), amarillo (550 a 600 nm), rojo (600 a 700 nm) e infrarrojo cercano (NIR) (700–810 nm) [2]. Con base a lo anterior existen diferentes tipos de fotosensibilizadores, se pueden clasificar dependiendo de su carga y de su estructura química. Por ejemplo, entre ellos podemos encontrar [14]:

- *Tetrapirrol*: Grupo principal utilizado en terapia fotodinámica para cáncer. Cuando son fotoexcitados tienden a producir oxígeno singlete. Ejemplos: clorina, bacterioclorofila, porfirinas.
- *Tintes naturales*: Compuestos extraídos de plantas u otros organismos que absorben luz blanca o UV-A. Ejemplos: curcumina e hipericina.
- *Tintes sintéticos*: Los principales son los tintes derivados de fenotiazinas, como el azul de metileno (MB, por sus siglas en inglés) o el azul de toluidina (TB, por sus siglas en inglés); debido a su carga catiónica, actualmente son muy utilizadas en aPDI. Existen otros tintes derivados de xantinas como el rosa de bengala, con carga aniónica; con amplia aplicación como antimicrobianos.
- *Nanoestructuras*: Las nanopartículas han sido utilizadas tanto para terapia fotodinámica en cáncer como para aPDI, y pueden llegar a encapsularse para mejorar su efectividad. Por sí solas, mejoran la inactivación considerablemente respecto a PS de otras clases, debido a que las ROS generadas se concentran localmente, es decir son más eficaces a las generadas por otros PS que generan ROS uniformemente por todo el medio. Además, mediante el uso en conjunto de estas nanoestructuras y otras como los liposomas y otros tipos de PS, se ha logrado una mejor penetración en la membrana de diferentes microorganismos; aunque se sabe que no necesariamente se requiere que penetren.

Al existir distintos tipos de fotosensibilizadores, sabemos que cada uno tiene sus ventajas y desventajas, algunos pueden funcionar mejor que otros en distintos microorganismos debido a su carga, longitud de onda de absorción (y, por ende, penetración tisular), coeficiente de extinción, entre otros. Debido a lo anterior, se ha propuesto que el fotosensibilizador ideal debería reunir las siguientes características [17 - 18]:

- Hidrofobicidad.
- Carga positiva para una mejor unión a las paredes celulares de las bacterias.
- Bajo peso molecular
- Alto rendimiento cuántico de  $^1\text{O}_2$ .
- Alta foto-estabilidad durante la irradiación

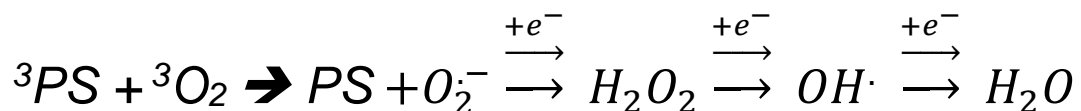
- Sin toxicidad en condiciones de oscuridad (la cual puede ser generada por las interacciones que genere con su medio circundante o los residuos de su degradación).
- Concentración efectiva (ventana terapéutica), sin dañar a otras células.

Cabe resaltar que, al ser condiciones ideales, muchos de estas características no se cumplen en la mayoría de los PS.

## 1.5. Vías de generación de ROS

Cómo ya se ha mencionado anteriormente, existen dos tipos de reacciones que se generan a partir de la interacción del PS en su estado triplete excitado ( $^3\text{PS}$ ) y el oxígeno molecular ( $^3\text{O}_2$ ): por transferencia de carga o por transferencia de energía.

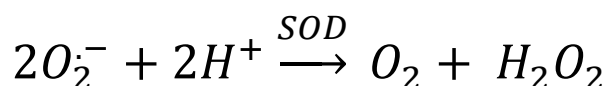
El proceso general para el mecanismo de transferencia de energía química es el siguiente:



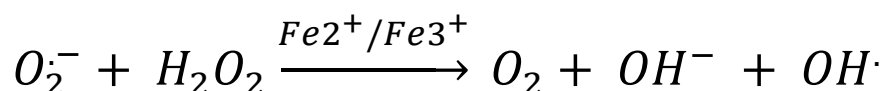
La formación del radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) sucede debido a la reducción del oxígeno; es decir, cuando el oxígeno acepta un electrón. Esta especie, no es tan reactiva, es inestable y generalmente se oxida nuevamente a oxígeno molecular. El anión superóxido, al ser inestable, continúa aceptando electrones hasta que logra estabilizarse. Este proceso se genera mediante una reducción univalente, ya que el oxígeno molecular posee dos electrones en giro paralelo, y esto le dificulta tomar dos electrones libres con giro antiparalelo, debido a esto, sólo puede recibir electrones de uno en uno. Estas características se deben a los siguientes factores [19–21].

1. *Carga electrónica.* No es tan reactivo en comparación a otras ROS debido a que las biomoléculas con una alta carga electrónica repelen este radical ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), ya que posee carga negativa.
2. *Baja difusión.* El daño oxidativo sólo es generado en regiones cercanas a donde fue producido este radical.
3. *Bajo tiempo de vida.* Se transforma a otras especies reactivas rápidamente.

Debido a lo anterior, las moléculas del radical anión superóxido, reaccionarán rápidamente para generar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Este radical, es formado por la enzima superóxido dismutasa (SOD) o por la dismutación espontánea del radical hidroperóxilo ( $HOO\cdot$ , forma protonada de  $O_2^{\cdot-}$ ), esta reacción genera oxígeno molecular y  $H_2O_2$  [21]:



Si bien el  $H_2O_2$  no es un radical libre, se le considera un oxidante ya que tiene una gran lipofiliidad que hace que pueda atravesar membranas celulares. Así también, puede reaccionar con otros radicales como  $O_2^{\cdot-}$  en presencia de metales de transición como el hierro ( $Fe^{2+}$  y  $Fe^{3+}$ ) y generar radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ) (reacción de Haber-Weiss):



Por otro lado, la generación de oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), se da mediante transferencia de energía desde el PS en estado triplete en presencia del oxígeno molecular ( $^3O_2$ ):



El oxígeno molecular (o dioxígeno) posee dos átomos de oxígeno unidos por un enlace covalente. Una característica particular es que tiene dos electrones desapareados paralelos, es decir, cada electrón ocupa dos orbitales moleculares diferentes (orbitales  $\pi$ ). Este estado es el estado basal también llamado estado triplete (Tabla 1).



Tabla 1. Configuración electrónica en el orbital  $2\pi^*$  de moléculas de oxígeno diatómico [21].

Especie de oxígeno	Configuración electrónica en el orbital $2\pi^*$
Dioxígeno ( $O_2$ )	$\uparrow \uparrow$
Oxígeno singlete ( $^1O_2$ )	
forma $^1\Sigma$	$\uparrow \downarrow$
forma $^1\Delta$	$\uparrow\downarrow \text{ —}$

El oxígeno singlete se forma cuando el oxígeno molecular absorbe energía y uno de sus electrones desapareados cambia su orientación (tabla 1). Al formarse el oxígeno singlete, se presenta en dos formas [21]:

- *Sigma* ( $\Sigma$ ): Este es un radical libre, ya que dos de sus electrones se encuentran desapareados en los orbitales moleculares externos  $2\pi^*$ . A diferencia del oxígeno molecular, que también tiene sus electrones desapareados, la forma sigma tiene un electrón en giro paralelo y otro electrón con giro antiparalelo. Esta forma es inestable, tiene una vida muy corta y se relaja al estado delta.
- *Delta* ( $\Delta$ ): Tiene dos electrones apareados en un solo orbital, no es un radical libre. En sistemas biológicos esta forma es la más importante.

## 1.6. Células bacterianas: dianas de la terapia fotodinámica

Las células bacterianas son organismos procariontes, tienen un tamaño que oscila entre los  $0.2 \mu m$  y  $750 \mu m$  de diámetro. Su morfología puede ser esférica (coco) o cilíndrica. Se clasifican mediante tinciones diferenciales. Específicamente la tinción de Gram. Dependiendo del resultado de la tinción, las bacterias se pueden clasificar en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Las bacterias Grampositivas se tornan color morado y las Gramnegativas color rosa. Esta diferencia de color es resultado de las diferentes estructuras y componentes de la pared celular de las bacterias. Las bacterias Gramnegativas tienen dos membranas en su pared celular y las

Grampositivas tienen una sola membrana. Ambas comparten el peptidoglicano en su estructura, del cual se hablará a continuación [22].

### 1.6.1. Peptidoglicano

El péptidoglicano (figura 1.5) es un polisacárido compuesto por N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico y algunos aminoácidos como L-alanina, D-alanina, D-ácido glutámico y L-lisina y el ácido diaminopimélico (DAP), formando un tetrapéptido de glicano. Las cadenas de péptidoglicano están conectadas por entrecruzamientos de aminoácidos, y los azúcares lo hacen mediante enlaces glucosídicos covalentes en las cadenas de glicano y proporcionan rigidez. El entrecruzamiento del peptidoglicano en bacterias Gram-negativas está formado por un enlace peptídico entre el grupo amino de DAP y el grupo carboxilo de la D-alanina de las cadenas de glicano adyacentes. En *E. coli* y otras bacterias gram negativas no se observan estos puentes peptídicos. El entrecruzamiento de peptidoglicano en este tipo de bacterias se produce a través de un puente peptídico pero los aminoácidos varían dependiendo la especie. Una particularidad del peptidoglicano es la presencia de dos aminoácidos del estereoisómero D: D-alanina y ácido D-glutámico, ya que normalmente las proteínas están formadas por L-aminoácidos. La porción de glicano en el peptidoglicano está formada por N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico, enlazado por el enlace glucosídico  $\beta$  -1,4. Dependiendo la especie, lo que varía son los entrecruzamientos o puentes peptídicos [22].

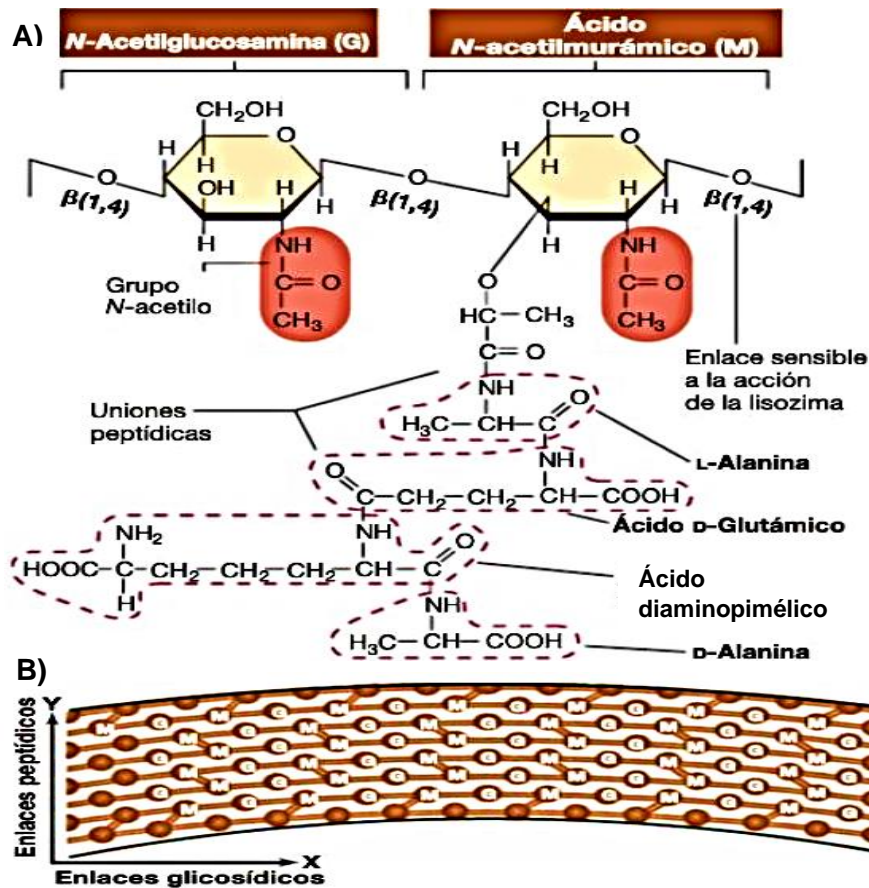


Figura 1.5 Estructura del peptidoglicano. A) Estructura presente en *E. coli* y otras gram-negativas. B) Estructura universal del peptidoglicano (G=N-acetilglucosamina; M= ácido N-acetilmurámico). Modificado de [22].

## 1.6.2. Membrana externa de bacterias Gram-negativas: el lipopolisacárido (LPS)

La mayor parte de la pared celular de bacterias Gram-negativas está formada por la membrana externa, la cual es una segunda membrana compuesta por proteínas, lípidos y polisacáridos conocido en conjunto como lipopolisacárido o LPS (figura 1.6). Este sirve de anclaje entre la membrana externa y el peptidoglicano. El LPS consta básicamente de dos partes: el núcleo del polisacárido y el polisacárido O específico. El primero se conforma de cetodesoxioctanato (KDO), heptosas, glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina. El polisacárido O específico está unido al núcleo, y contiene galactosa, glucosa, ramnosa, manosa y algunas didesoxihexosas como abecuesa, colitosa, paratosa y tivelosa. El LPS también tiene una porción lipídica llamada lípido

A. En este lípido en particular, los ácidos grasos están unidos mediante grupos amino del disacárido formado por 2 fosfatos de glucosamina. El disacárido está unido al núcleo del polisacárido mediante el KDO. Algunos de los ácidos grasos presentes en el KDO son el caproico, mirístico, laúrico, palmítico y esteárico. El LPS tiene la propiedad de ser tóxico, algunos problemas gastrointestinales se deben a este debido a que el lípido A se considera una endotoxina.

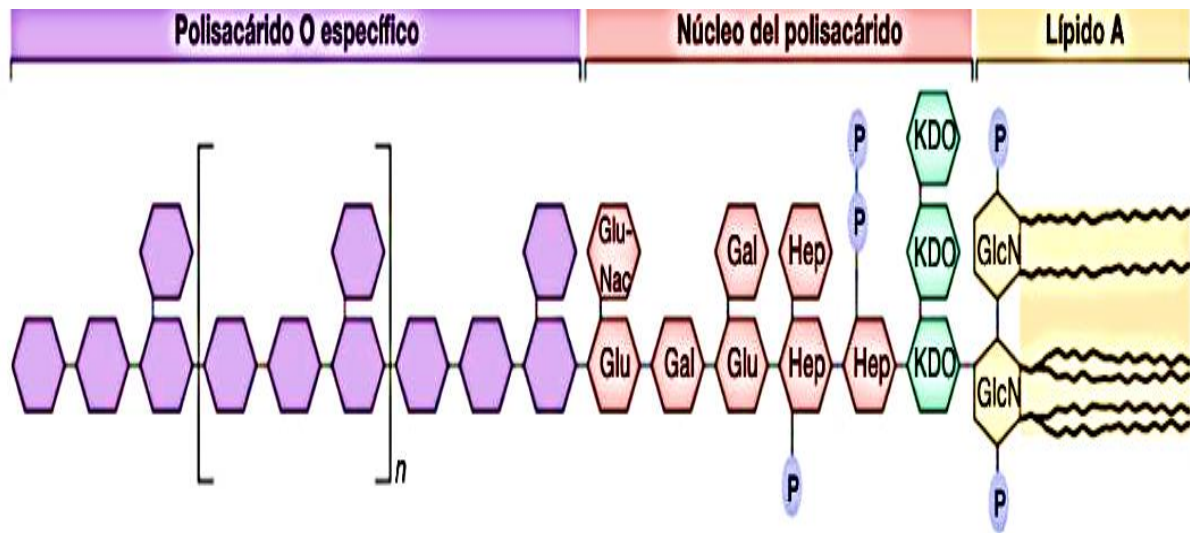


Figura 1.6. Estructura general del LPS de bacterias Gram-negativas. Aunque la composición varía entre especies, en general está formado por lípido A-KDO, cetodesoxioctanato. Hep= heptosa, Glu=Glucosa, Gal=galactosa, GlcN=glucosamina, GluNac=N-acetilglucosamina, P= fosfato. Modificado de [22]

Otro componente que es parte de la membrana externa es el periplasma, en el cual se encuentran muchas de las proteínas que realizan funciones fuera de la membrana plasmática. El periplasma tiene un grosor de aproximadamente 15 nm y es de consistencia gelatinosa debido a las proteínas que se encuentran en el medio. Otra parte importante en la estructura de las bacterias son las porinas, proteínas que se encuentran en la membrana externa. Estas proteínas toman una conformación en forma de canal que permite la entrada o salida de sustancias específicas (mediante sitios de unión) o inespecíficas (figura 1.7).

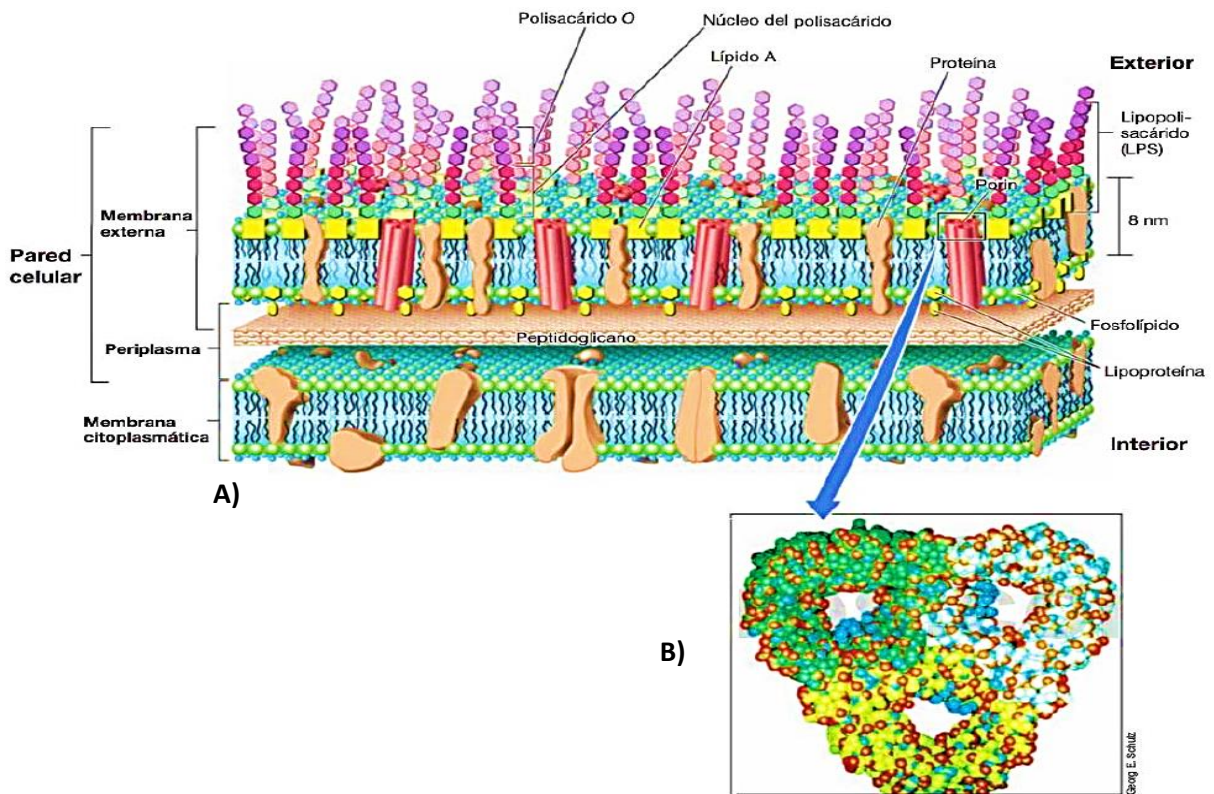


Figura 1.7. Pared celular de bacterias Gram-negativas. A) Distribución del LPS, el lípido A, los fosfolípidos, porinas y lipoproteínas en la membrana externa de bacterias Gram-negativas. B) Modelo de las porinas, proteína formada por 3 subunidades transmembranales. Modificado de [23].

### 1.6.3. *Escherichia coli*

La bacteria *E. coli* (figura 1.8) pertenece al reino *Bacteria*, dominio Prokariota, familia *Enterobacteriaceae*. Tiene morfología cilíndrica con un tamaño de  $1 \times 2 \mu m$  y se considera un báculo Gram-negativo anaerobio facultativo, es decir, que puede vivir con o sin oxígeno. Esta bacteria metaboliza la lactosa y puede sobrevivir en el tracto gastrointestinal. En su membrana cuenta con una acuaporina llamada Aqpz que importa o exporta agua hacia o desde el citoplasma. En su estructura tiene un ADN circular. Su tasa de replicación es de aproximadamente 20 minutos. Cuenta con flagelos en forma de cola extendidos desde su membrana. Es un comensal en los organismos y en humanos puede llegar a causar enfermedades como diarrea, meningitis, entre otras. Para iniciar la infección en los organismos, *E. coli* tiene estructuras llamadas fimbrias, que son apéndices en forma de brazos que se

extienden para poder llegar a otras membranas mucosas. Entre los tipos de fimbria se encuentran, las que se unen al tejido en el tracto urinario y otras que se unen a los intestinos, por mencionar algunas. Una vez establecida la bacteria en el área a infectar, produce toxinas facilitando el desarrollo de la infección [23].

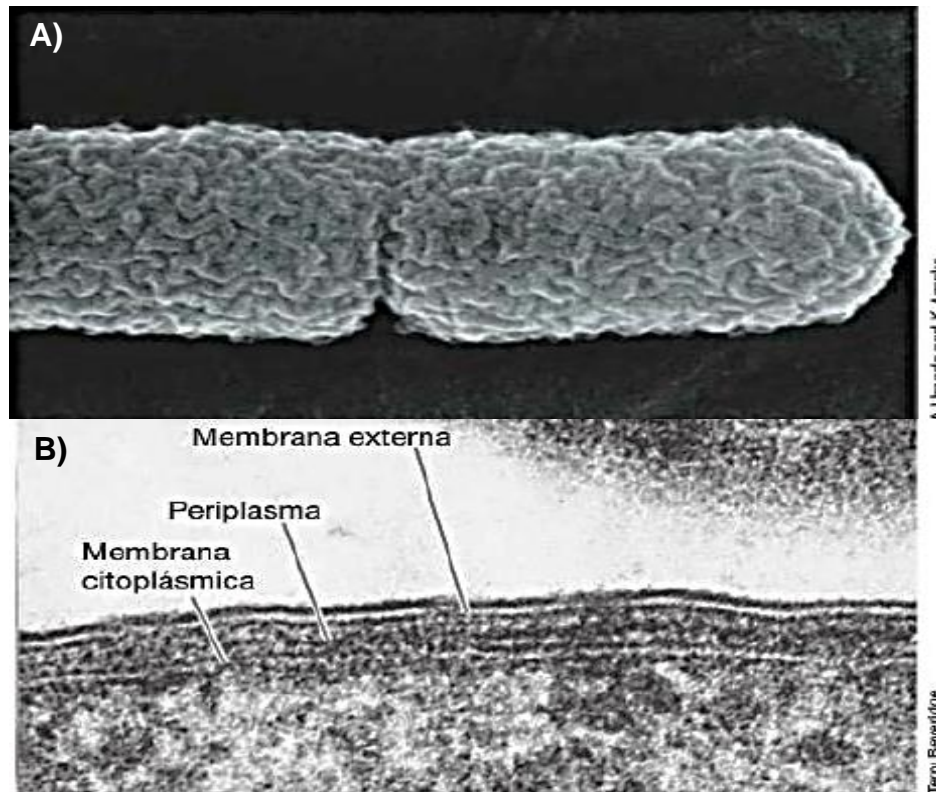
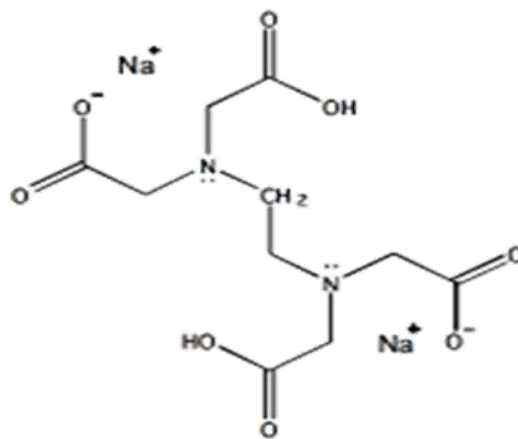


Figura 1.8. Micrografía de *Escherichia coli*. A) Micrografía electrónica de barrido de *E. coli*. B) Pared celular de *E. coli* observada por microscopía electrónica de transmisión mostrando el periplasma, la membrana interna y externa. Modificado de [23].

#### 1.6.4. EDTA: agente desorganizante de la membrana externa de bacterias Gram-negativas

En general, un problema a resolver en la aPDI es lograr que el fotosensibilizador sea efectivo, tanto para bacterias Gram-negativas, como Gram-positivas. Para ello, es necesario que el fotosensibilizador cumpla con la mayoría, si no todas las características del fotosensibilizador ideal, es deseable que el PS pueda entrar al interior de la bacteria. Para ello existen distintas alternativas, como que el PS esté cargado positivamente o se utilice un agente que permeabilice la membrana, por ejemplo el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, por sus siglas en inglés). El EDTA

es un agente quelante capaz de “secuestrar” compuestos metálicos o iones como el calcio y el magnesio. En cuanto a la estructura del EDTA, a pH muy bajo predomina la forma  $H_6EDTA^{2+}$  que está protonada y a pH muy alto (muy básico), prevalece la forma  $EDTA^{4-}$  completamente desprotonada (figura 1.9). La unión de compuestos metálicos en el EDTA ocurre en sus dos aminas y los cuatro grupos carboxilato. Existen distintas composiciones y combinaciones hechas con EDTA, las más usadas y efectivas en cuanto a propiedades antisépticas y microbianas están formadas por al menos una sal de EDTA. Las más usadas son las sales disódicas, trisódicas y

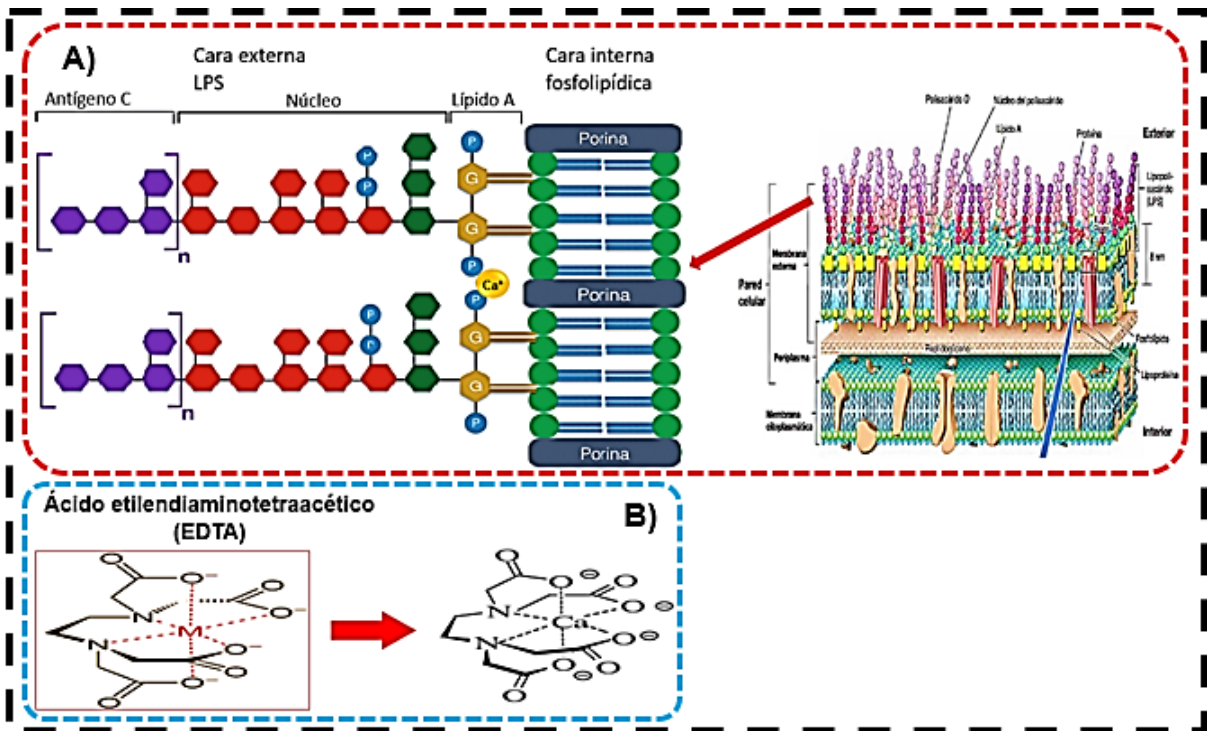


tetrasódicas.

Figura 1.9. Estructura química del EDTA completamente desprotonada [24].

El efecto producido por el EDTA sobre las bacterias se conoce desde hace más de 50 años. Como se mencionó anteriormente, el EDTA se ha usado en la aPDI en conjunto con los PS para mejorar la inactivación de bacterias. Ya se ha reportado que bacterias Gram-negativas tratadas con EDTA pueden llegar a perder hasta el 50 % de su lipopolisacárido, haciéndolas más sensibles a los PS, sobre todo a PS catiónicos debido a la carga negativa de la pared celular de la bacteria [25]. Esto sucede porque la integridad de la membrana exterior de las bacterias Gram-negativas se mantiene mediante interacciones hidrofóbicas del lipopolisacárido (LPS) e interacciones de las proteínas-LPS. Los cationes divalentes presentes en la membrana de las bacterias como el  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  son primordiales para estabilizar las cargas negativas del oligosacárido del LPS. Cuando la bacteria se encuentra en un medio que contiene EDTA, este quelante atrapa los iones  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  de la pared celular externa de las bacterias Gram-negativas, liberando hasta el 50% de las moléculas de LPS y exponiendo los fosfolípidos de la membrana interna, las cargas de los grupos fosfatos

se repelen entre sí, lo que hace que la bacteria sea más permeable (figura 1.10); esto mejora la eficacia de los antimicrobianos como los PS. Actualmente se utiliza como agente sensibilizante para el tratamiento de afecciones microbianas en odontología, y



en medicina veterinaria por mencionar algunos. [24]

Figura 1.10. A) Membrana externa de bacterias Gram-negativas. Se observa el LPS y cationes como el  $Ca^{2+}$  que estabilizan la membrana externa mediante interacciones electrostáticas entre las sales y los grupos fosfato ( $P^-$ ). B) Proceso simplificado de quelación de los cationes  $Ca^{2+}$  presentes en la membrana de bacterias Gram-negativas mediante EDTA.

Walsh y colaboradores [26] sugieren que el debilitamiento de la pared microbiana de *Staphylococcus aureus* planctónico pueden ser responsables de la potenciación del daño hacia esta bacteria. Sharma y colaboradores [27] informaron que el EDTA mejora el uso de moléculas fotosensibilizadoras contra biofilms de *S. aureus*, al secuestrar iones de  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) de la biopelícula.



## 1.6.5. Daño oxidativo celular

La aPDI, se enfoca en dañar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (figura 1.11), Hamblin y Hasan, mencionan que el daño oxidativo en la membrana citoplasmática y en el ADN en bacterias es el principal responsable de la muerte de bacterias [28], [29]. Lo anterior se explica porque el daño oxidativo generado depende de la localización celular del PS y de la máxima longitud de difusión (dependiente del tiempo) de cada PS. Por ejemplo, se ha reportado que el tiempo de vida del  $^1\text{O}_2$  es en promedio de 3-4  $\mu\text{s}$  y el tiempo de difusión para este periodo es de aproximadamente 0.3  $\mu\text{m}$ , dependiendo del medio circundante [30]. Por su parte, Alves y colaboradores, afirman que el daño oxidativo es generado en las vecindades del fotosensibilizador, es decir, pueden ocurrir las siguientes situaciones [31]:

1. El PS puede estar cercano a la bacteria sin unirse, lo cual limita el daño oxidativo a estructuras externas como la pared celular o la membrana citoplasmática.
2. El PS se une a la bacteria mediante interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno o interacciones Van-der-waals. El daño oxidativo es similar al punto anterior.
3. El PS entra al citoplasma de la bacteria, en donde puede dañar estructuras internas como el ADN y proteínas.

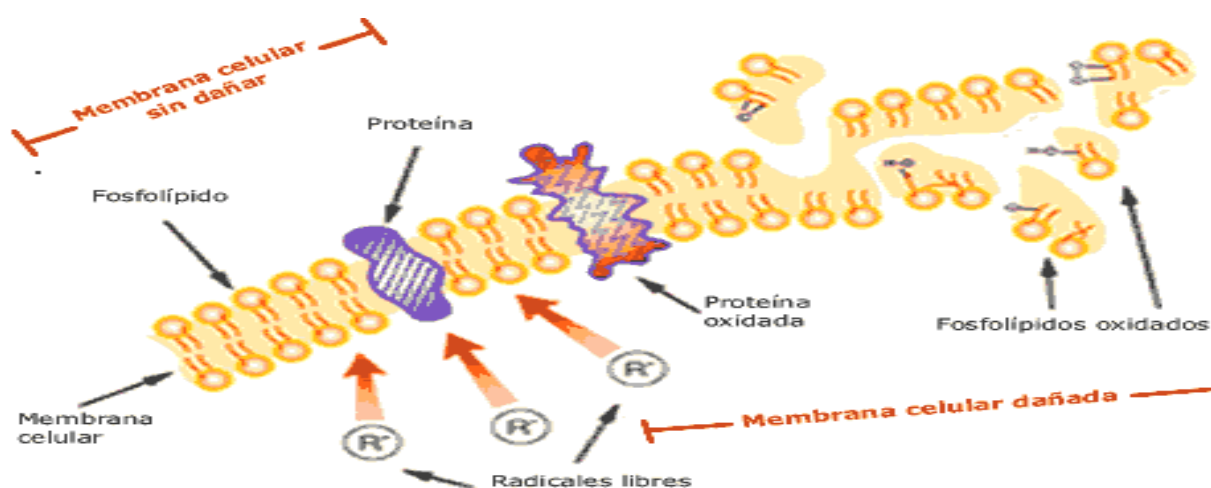


Figura 1.11. Daño oxidativo causado por ROS en lípidos y proteínas [32].

En los lípidos, el daño producido es generado principalmente por el radical hidroxilo que da lugar a la peroxidación lipídica (figura 1.12). Esto sucede de la

siguiente manera: este radical extrae un átomo de hidrógeno alílico del grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-) unido a un carbono de la cadena hidrocarbonada del lípido. Esto lleva a una reacción en cadena ya que un átomo de hidrógeno posee un electrón desapareado, por lo que al ser extraído deja un electrón desapareado en el átomo de carbono al cual estaba inicialmente unido, formándose un lípido radical. Ocurre entonces una reorganización en los enlaces para estabilizar el lípido radical. El radical alílico reacciona con el oxígeno molecular y forma un radical peroxil en el lípido, que extrae de nuevo un átomo de hidrógeno del grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-) de otro lípido y produce un lípido peróxido y un nuevo lípido radical, logrando dañar un gran número de lípidos. Este proceso de oxidación terminará cuando dos especies reactivas se encuentren y formen especies no radicales o cuando haya la suficiente cantidad de antioxidantes [33].

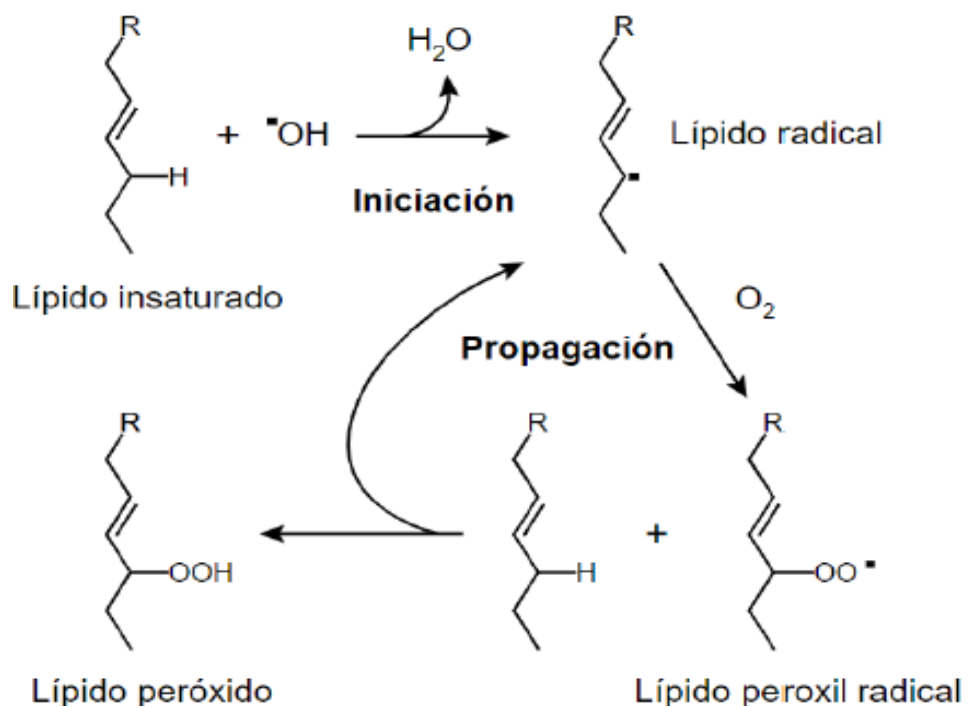


Figura 1.12. Proceso de peroxidación lipídica [34].

En las proteínas, el daño oxidativo puede ser específico o inespecífico. El primero que puede ser mediado por algún compuesto, por ejemplo, metales que generan especies reactivas como el radical hidroxilo y en el segundo caso, la oxidación ocurre por radiación produciendo generalmente oxígeno singlete. Las especies reactivas de oxígeno generadas dañan a las proteínas a través de cuatro mecanismos: la carbonilación, la ruptura de enlaces peptídicos, la nitración y la

formación de enlaces proteína-proteína que terminan en la degradación, desnaturalización y agregación de proteínas [35].

Cuando el radical hidroxilo reacciona con átomos de hidrógeno unidos a los carbonos de la estructura principal de las proteínas, genera más radicales, como el peroxilo, el cual produce  $HO_2^\bullet$  y una imina, que al hidrolizarse rompe el enlace peptídico. Por otro lado, el radical resultante en el enlace de carbono (formado cuando se pierde el átomo de hidrógeno), obtiene un átomo de hidrógeno de otra proteína o molécula cercana, generando un hidroperóxido y posteriormente un radical alcoxilo, produciendo también la ruptura del enlace peptídico. Cuando no hay oxígeno, el radical generado en el carbono de la cadena principal de la proteína puede reaccionar con otro igual y formar enlaces proteína. Si la reacción de oxidación es catalizada por un metal, se produce la reacción del  $H_2O_2$  con un metal de transición ( $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ ) produciendo el radical hidroxilo (reacción de Fenton), al mismo tiempo este radical reacciona con las cadenas laterales de los aminoácidos que se encuentran adyacentes al sitio donde se une el metal a la proteína [35].

## 2. Síntesis y caracterización de nanopartículas de feomelanina

La síntesis de la feomelanina ha sido un tema de estudio importante desde hace décadas, debido a que no se puede obtener fácilmente de la naturaleza. Existe de forma natural en la piel humana, plumas de aves y algunos microorganismos. Particularmente, en los humanos la vía de síntesis parte de la oxidación del aminoácido tirosina, a través de la enzima tirosinasa; en la presencia de cisteína, incorpora compuestos sulfurados y se producen unidades de benzotiazina y benzotiazol; la feomelanina se obtiene de la polimerización de estas dos moléculas. [36], [37] Dado que naturalmente tanto la feomelanina como la eumelanina están unidos a proteínas, se utilizan métodos que requieren el uso de ácidos y bases que dañan la estructura del pigmento. Sumado a esto, cabe mencionar que dichos métodos producen un pigmento insoluble en medios acuosos, lo que genera la necesidad de utilizar disolventes no biológicos para su estudio.

Entre los métodos antes mencionados se encuentran los de extracción a partir de otros organismos biológicos o mediante el uso de compuestos químicos, como por ejemplo, la extracción del pigmento de cabellos amarillos hasta rojizos y en plumas de aves; también puede obtenerse mediante síntesis enzimática. En la literatura este último es el método más usado [37]–[41]. Los primeros en lograr la síntesis enzimática óptima de la feomelanina usando la enzima tirosinasa fueron Ito y colaboradores [42].

El uso de este pigmento es un tópico importante en estudios relacionados con fotobiología, melanoma, implicaciones fisiopatológicas y como generador de radicales libres, mediante la absorción de la radiación (principalmente radiación UV y visible). Recientemente Pyo y colaboradores obtuvieron por primera vez, un método de síntesis química para la obtención de nanopartículas de feomelanina redispersable en soluciones acuosas y medios fisiológicos, dichas nanopartículas fueron reportadas con morfología similar a la que poseen las feomelaninas naturalmente [8].

Este capítulo se enfoca en la síntesis química y caracterización de nanopartículas de feomelanina. Exploramos las propiedades y características distintivas de la feomelanina mediante el uso de técnicas como espectroscopía de

absorbancia UV-VIS, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X (XRD, por sus siglas en inglés) y análisis elemental (EDS, por sus siglas en inglés). Se tomó como base el protocolo utilizado por Pyo y colaboradores con ligeras modificaciones. [8] Se encontró que, a diferencia de los autores, nuestras nanopartículas cuentan con un mayor tamaño (aproximadamente 200 nm), además, el pH fisiológico se obtuvo únicamente cuando son redispersadas en PBS.

## **2.1. Feomelanina: propiedades y características**

La melanina es un biopolímero muy complejo; existen distintos tipos, el más conocido, se encuentra en los seres vivos como pigmento y es uno de los principales cromóforos de la piel. Todas las melaninas tienen un espectro de absorción que aumenta exponencialmente a menor longitud de onda. Además, es insoluble en medios acuosos y difícil de definir debido a la variación en su composición, color, y tamaño. Una definición que incluye a todos los tipos de melanina es: polímero heterogéneo derivado de la oxidación de fenoles y posterior polimerización de fenoles intermedios y las quinonas resultantes [43].

Las melaninas en general son de color café oscuro, pero también las hay de tonos rojizos a amarillentos, dependiendo dónde se encuentren [44]. Es la principal pigmentación en los seres humanos; aquí la podemos encontrar en la piel, los ojos, el cerebro, el cabello, y en el interior del oído, y se encuentra en 3 formas: neuromelanina, eumelanina y feomelanina. En este trabajo, utilizaremos la feomelanina por lo que sólo describiremos esta especie.

La feomelanina pura no es encontrada en la naturaleza, a diferencia de otras melaninas como la eumelanina; esta se puede disolver en medios alcalinos. Su estructura no está bien definida, pero un modelo aceptado es el que se muestra en la figura 2.1; está formada principalmente por dos moléculas, Benzotiazina y Benzotiazol. A diferencia de la eumelanina que funciona como protector contra la radiación UV-VIS, la feomelanina genera radicales libres, es decir tiene propiedades fotosensibilizantes.

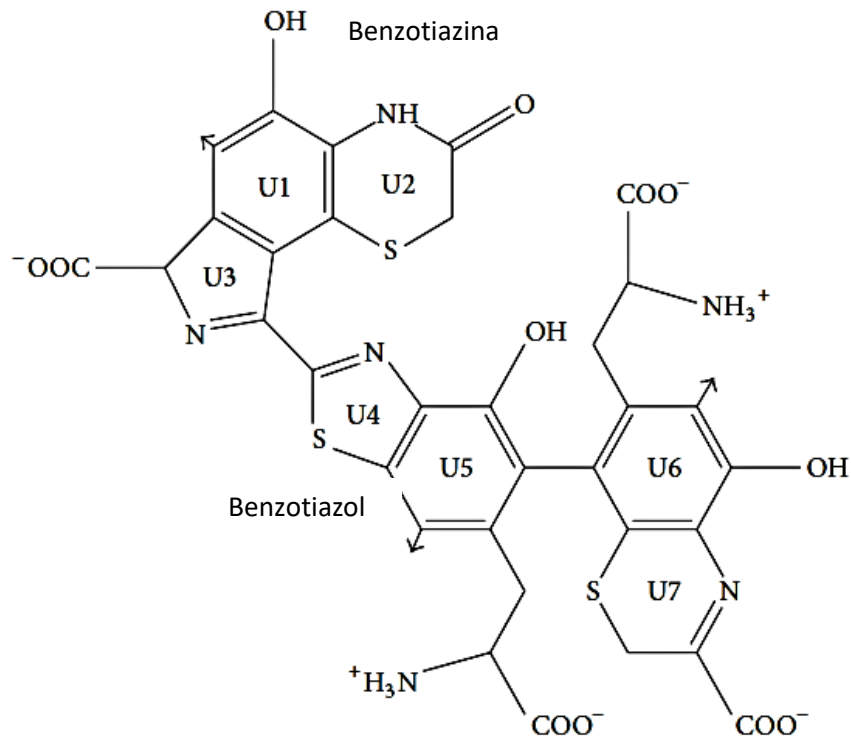
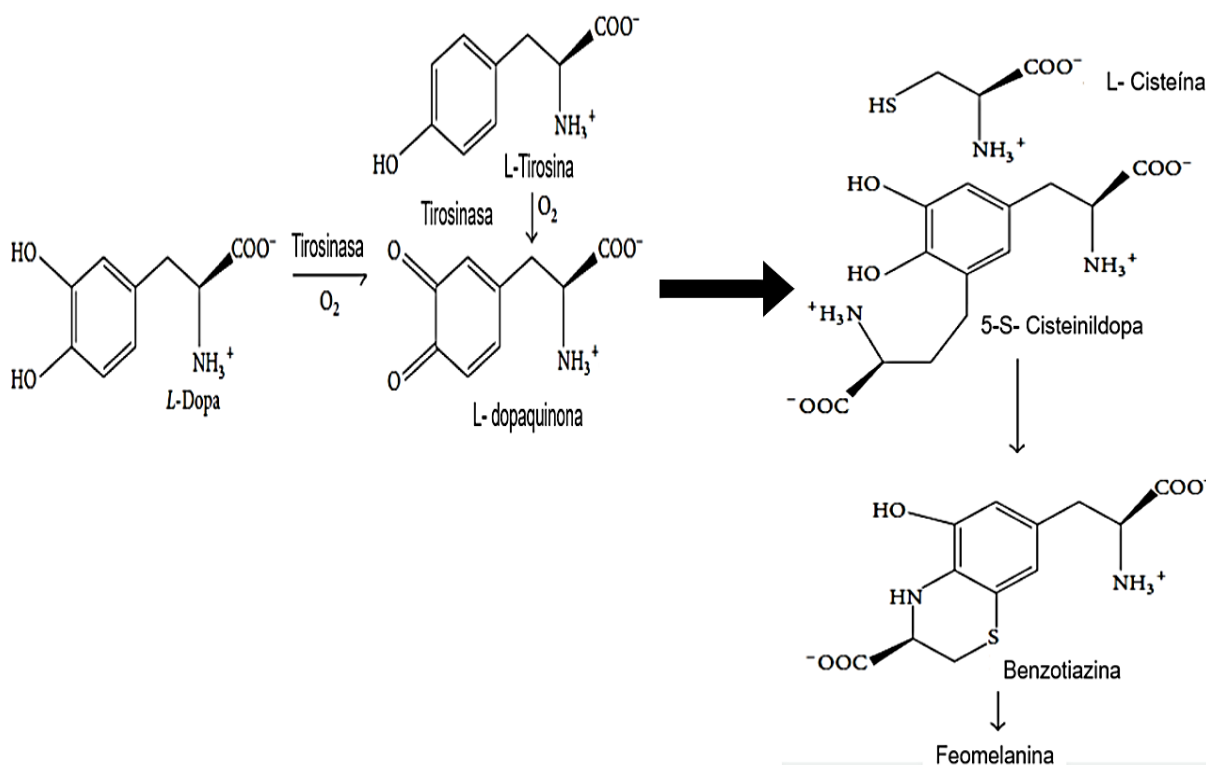


Figura 2.1. Estructura modelo de la feomelanina. Se conforma por dos oligómeros principalmente: Benzotiazina (U1 + U2, U6 + U7) y Benzotiazol (U4 + U5). Las cadenas laterales de Dopaquinona pueden ciclarse (U3). Las flechas indican puntos posibles de crecimiento de la feomelanina. Modificado de [43].

### 2.1.1. Síntesis de feomelanina

La síntesis de feomelanina o feomelanogénesis, se realiza por medio de la oxidación del aminoácido L-tirosina o la oxidación de L-Dopa, mediante la actividad catalizadora de la enzima tirosinasa. Entonces, al principio, se llevan a cabo 2 procesos consecutivos con esta enzima, tirosina hidroxilasa y dopa oxidasa, las cuales dan lugar a L-Dopaquinona que es el punto de partida para dar como resultado eumelanina o feomelanina. La diferencia en este punto para la generación de feomelanina es la presencia de azufre, proveniente del aminoácido L-cisteína. Este aminoácido se añade a L-Dopaquinona en varias posiciones del anillo y se forman isómeros como 5-S-cisteinildopa (el más predominante, figura 2.2) o 5-S-glutatióndopa. La feomelanina, por lo tanto, se forma por la polimerización de dos oligómeros principalmente, benzotiazina y benzotiazol. Las unidades de benzotiazina se forman

primero a partir de cisteinildopa, pero se ha demostrado su conversión en benzotiazol, sin embargo, más estudios son necesarios para dilucidar la formación de su estructura



[43].

Figura 2.2. Vía de síntesis de la feomelanina por oxidación de L-tirosina y L-Dopa. Modificado de [43].

## 2.2. Materiales y métodos

### 2.2.1. Preparación de nanopartículas de feomelanina

Para la síntesis se usaron los siguientes reactivos de alta pureza: 70 mg (0.35 mmol) de L-DOPA (D9628), 85.6 mg (0.70 mmol) de L-Cisteína (C7352) y 360  $\mu$ L (1N) de KMnO<sub>4</sub> (223468); todos obtenidos de Sigma-Aldrich.

La L-DOPA fue disuelta en 50 mL de agua Mili-Q (18.2 M $\Omega$ ) a 50 °C, debido a la poca solubilidad a temperatura ambiente del reactivo. En todo momento, la solución se mantuvo en agitación constante (1500 RPM) y condiciones mínimas de iluminación para evitar la oxidación de los compuestos durante el proceso de preparación. Cuando

la solución se encontraba a temperatura ambiente, se procedió a agregar L-cisteína y enseguida  $\text{KMnO}_4$ . La reacción se dejó continuar durante 24 horas y fue monitoreada mediante espectroscopía de absorbancia UV-Vis. Las nanopartículas fueron recolectadas mediante centrifugación (10 minutos, 20000 RPM). Posteriormente, el precipitado obtenido se resuspendió en 50 mL de agua desionizada mezclando 1 mL de HCl (1M), esto con el fin de intercambiar iones  $\text{Mn}^{2+}$  en la solución. Para elevar el pH de la muestra, la solución fue lavada 6 veces más a 20000 RPM. Una última centrifugación (10 minutos, 4500 RPM) fue realizada para descartar agregados de gran tamaño. El pH final obtenido fue de 6, diferente al reportado por los autores antes mencionados. Las partículas se redispersaron en PBS con el fin de obtener un pH fisiológico, necesario para cultivos celulares. El pH final fue de 7.4. Finalmente, las partículas fueron almacenadas en un frasco ámbar a 4 °C para su posterior uso.

## **2.2.2. Métodos de caracterización**

### **2.2.2.1. Espectroscopia UV-Vis**

El proceso de síntesis de las nanopartículas de feomelanina se controló evaluando el cambio en el pico de absorbancia máxima de L-DOPA (280 nm) conforme transcurría la reacción química. Se usó un espectrofotómetro (Multiskan GO, Thermo Scientific). Una vez obtenidas las partículas de feomelanina, se vertió 1 mL de la solución en una celda de poliestireno y se obtuvo el espectro de absorbancia de 200 nm a 1000 nm.

### **2.2.2.2. Liofilización**

La solución de feomelanina se liofilizó utilizando un sistema Labconco FreeZone 2.5 5 Liter Dry system, 7670520 (Figura 2.3). Esto con el fin de caracterizar las partículas con técnicas como FT-IR, EDS, SEM y XRD. Primero, la solución se centrifugó a 20000 r. p. m para eliminar el exceso de agua. Después, las muestras se colocaron en un frasco ámbar y se liofilizaron a una presión y temperatura de 0.133 mBa y - 40 °C



durante 2 horas. Finalmente, el polvo de nanopartículas obtenido se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  entre 1 y 3 días antes de la caracterización.



Figura 2.3. Equipo Labconco FreeZone 2.5 5 Liter Dry system (7670520) para la liofilización de las nanopartículas de feomelanina.

### 2.2.2.3. Dispersión dinámica de luz

Se midió el tamaño de partícula y el potencial zeta mediante dispersión dinámica de luz (DLS, Zetasizer NanoZS, Malvern, UK). De la solución de partículas redispersadas en PBS se tomó 1 mL, se colocó en una cubeta de poliestireno desechable y se expuso a un láser He-Ne de 633 nm, a una temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  y tiempo de equilibrio de 120 segundos, con la posición del detector colocado a un ángulo de  $173\text{ }^{\circ}$  respecto a la muestra. El potencial zeta fue evaluado a distintas concentraciones de feomelanina (83, 123, 166 y  $247\text{ }\mu\text{g/mL}$ ), y en distintos solventes para conocer cómo se modificaba la distribución de carga con cada uno: agua Mili-Q ( $18.2\text{ M}\Omega$ ), PBS y EDTA (disuelto en PBS). Cada muestra se midió 3 veces y cada una de éstas fue un promedio de 12 iteraciones.

### 2.2.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y microanálisis elemental (EDS)

Se obtuvieron imágenes de las nanopartículas de feomelanina mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, JEOL-JSM-7600F) operado bajo un voltaje de aceleración de 2 kV. Las muestras liofilizadas fueron cubiertas con una aleación de oro-paladio y colocadas sobre una superficie de cobre con una cinta de níquel. Al mismo tiempo, la composición porcentual de los elementos químicos se obtuvo usando microanálisis elemental mediante espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS). Se analizaron 7 muestras distintas comparadas con una muestra comercial de eumelanina (M8631, Sigma Aldrich). Posteriormente los datos fueron analizados mediante el software Inca.

### **2.2.2.5. Difracción de Rayos X (XRD)**

Esta técnica nos da información de materiales con estructura cristalina. En el caso de las melaninas, al ser un compuesto amorfo, la respuesta esperada es un espectro de difracción amplio. Dada la naturaleza de la síntesis también nos dará información del proceso de síntesis realizado (detección de residuos cristalinos). Las muestras fueron analizadas por XRD (Difractómetro Bruker D-8 Advance, 40 kV, 30mA) con los parámetros siguientes: radiación  $CuK\alpha_1$ ,  $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$ , tiempo de paso= 0.5 segundos y tamaño de paso=  $0.02^\circ$ . El experimento fue realizado 7 veces con un rango  $2\theta$  de  $3^\circ$  a  $60^\circ$ .

### **2.2.2.6. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)**

Los grupos funcionales presentes en las muestras sintetizadas permiten evaluar la pureza de las partículas de feomelanina. Dichos grupos son determinados mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR, Agilent Cary 630). Las mediciones fueron realizadas usando un accesorio ATR (DATR Agilent, reflectancia total atenuada) con cristal de diamante (RI= 2.4) en el modo de transmitancia, con una longitud de paso  $\sim 2.6 \mu m$ , resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$  a temperatura ambiente. El espectro fue medido en la región entre  $4000$  a  $650 \text{ cm}^{-1}$ , con un ángulo de incidencia de  $45^\circ C$ . Se realizaron en total 32 scans. La muestra liofilizada de nanopartículas fue colocada en el cristal del ATR. Todos los espectros se restaron y suavizaron con la

función Savitsky-Golay de 7 puntos para reducir el ruido blanco. Los datos se analizaron con el software Origin 2016 y en total se midieron 10 muestras distintas.

### 2.2.2.7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se muestran como el promedio de los datos evaluados, con sus desviaciones estándar correspondientes. Se utilizó el software SPSS para Windows, versión 22 (IBM SPSS Statics, 32 bits). Se utilizaron los valores de al menos tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. El análisis de significancia estadística se realizó con análisis de pruebas no paramétricas de Mann-Whitney test. Los niveles de significancia se establecieron en  $P < 0.05$ .

## 2.3. Resultados y discusión

### 2.3.1. Espectroscopia UV-Vis

La síntesis del pigmento se monitoreó mediante espectroscopía UV-Vis. Dicho proceso se muestra en la Figura. 2.4 y se controló a través de la evolución del espectro de absorbancia del precursor L-DOPA hasta que el pico máximo de absorbancia desapareció (alrededor de 12 h). Esto nos asegura que la reacción ha terminado.

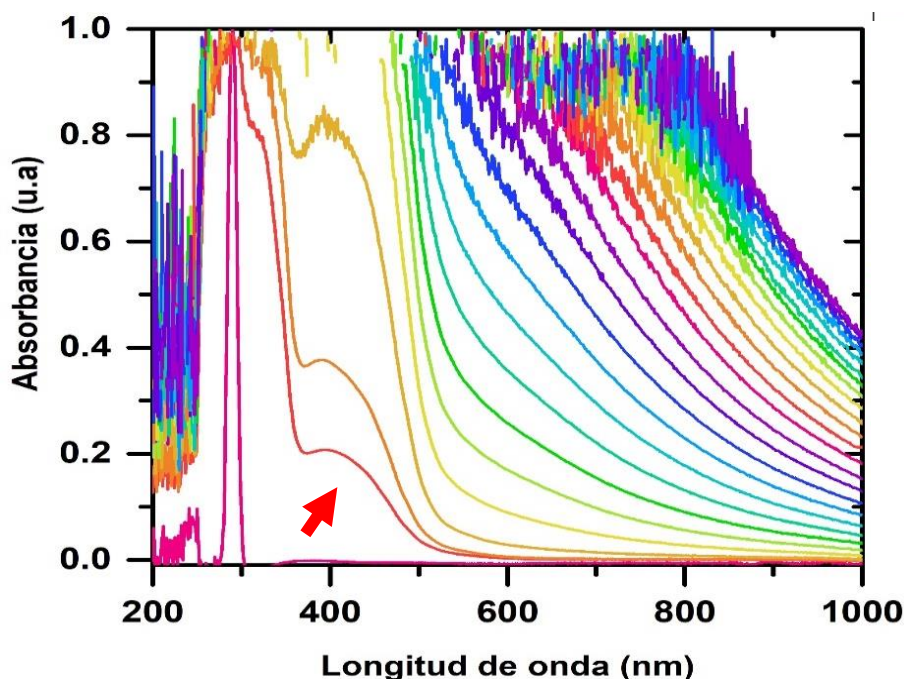


Figura.2.4. Espectro de absorbancia UV-Vis de L-DOPA monitoreado durante 24 horas. Los espectros fueron tomados con intervalos de una hora. La flecha indica el momento en el que se le agrega cisteína y  $\text{KMnO}_4$  a la solución.

En la Figura. 2.5 se muestra el espectro de absorbancia UV-Vis de la feomelanina sintetizada y la eumelanina comercial mostrando la similitud entre los dos pigmentos. Este tipo de espectro de absorción amplio no es común en los cromóforos orgánicos. Ambos casos exhiben una fuerte absorción en la región entre 300 y 450 nm, con un comportamiento de decaimiento exponencial que se extiende a la región infrarroja. Se ha simulado el espectro de absorción de estas melaninas mediante la contribución de moléculas con diferentes brechas energéticas (diferentes bandas de absorción). Debido a la complejidad en la estructura de estas moléculas y a los diferentes monómeros que la conforman, se ha propuesto que esta banda ancha, puede indicar que tanto la eumelanina como la feomelanina contienen diversos componentes químicos presentes en su estructura que contribuyen a la formación de dicha banda de absorbancia mostrada por estos pigmentos. En general, la feomelanina mostró una mayor absorción en el espectro completo, volviéndose más significativa en la región visible [45].

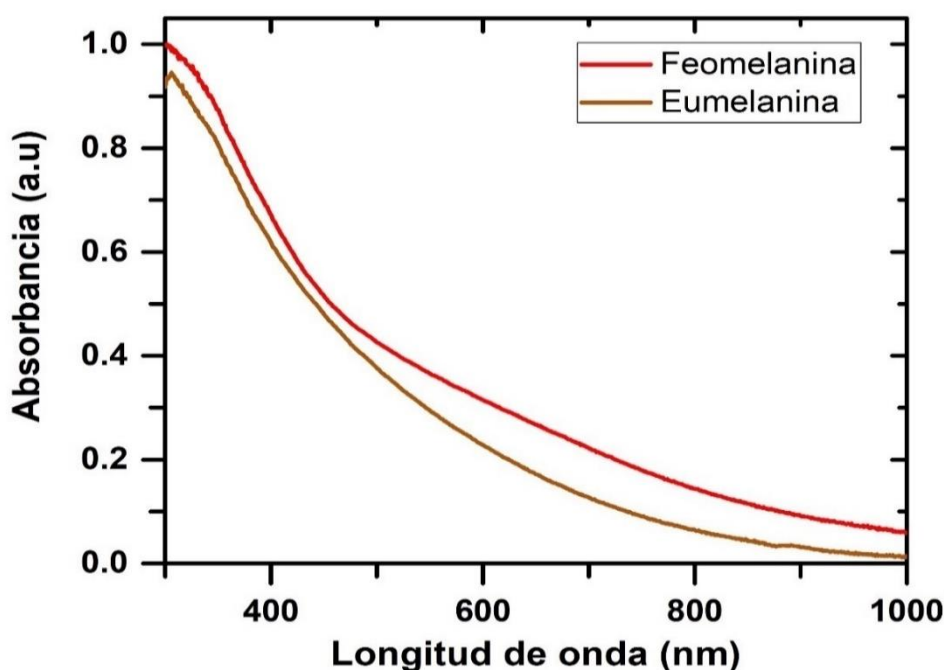


Figura.2.5. Espectro de absorbancia UV-Vis de la feomelanina (rojo) y la eumelanina (café).

### 2.3.2. Dispersión dinámica de luz y microscopia electrónica de barrido

La distribución del tamaño de las nanopartículas de feomelanina dispersas en PBS fue obtenido mediante DLS (figura 2.6). Estos datos son congruentes con los resultados obtenidos mediante microscopia electrónica de barrido. Ambos resultados son similares y se complementan; mediante DLS se obtuvo un tamaño promedio de  $200 \pm 17$  nm, en SEM, se observó que las nanopartículas tienen una forma esférica, con diámetros que oscilan entre 90 a 180 nm (figura 2.7). Estos resultados demuestran que las nanopartículas cuentan con las características en las que las melaninas se encuentran naturalmente [36], [46].

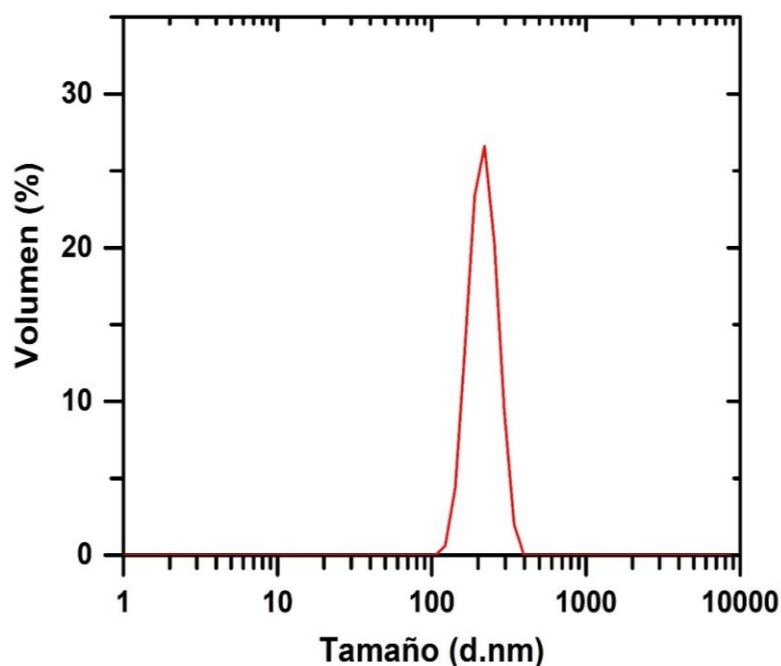


Figura.2.6. Distribución de tamaño de partícula de las nanopartículas de feomelanina en PBS.

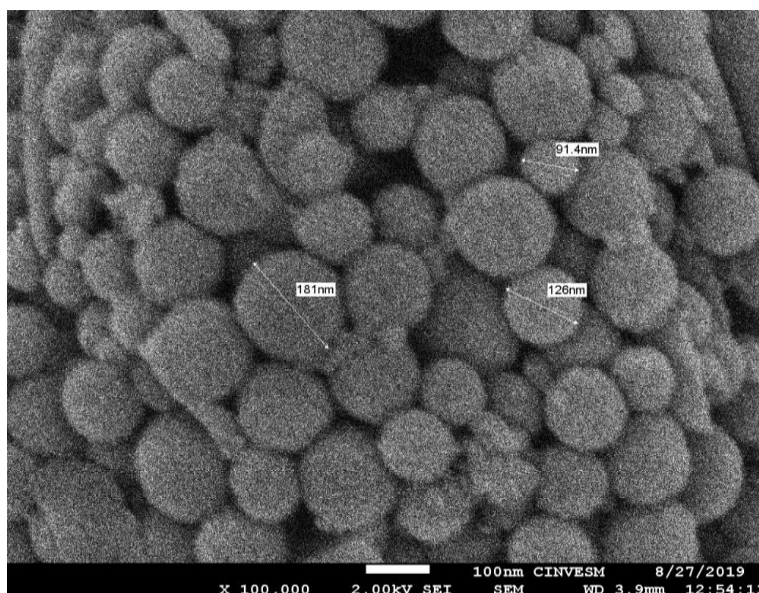


Figura.2.7. Nanopartículas de feomelanina obtenida mediante microscopía electrónica de barrido.

También se midió el potencial zeta de las nanopartículas (figura 2.8) en función de la concentración y el medio dispersante (agua Mili-Q, PBS y EDTA en PBS). Lo primero que hay que notar es que el potencial zeta de las nanopartículas es negativo sin importar el medio dispersante utilizado. Esta carga negativa es más pronunciada cuando las nanopartículas están dispersas en agua Milli-Q con un valor de - 34.4 mV para la concentración usada en la mayoría de los experimentos de inactivación ( $166 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). A esta misma concentración y cuando se encuentran redispersas en PBS, el potencial zeta cambió a - 22. 7 mV, esto indicó un efecto de apantallamiento debido a la cantidad de cationes disueltos en el medio. Finalmente, con la adición de un agente quelante (EDTA), el potencial zeta aumenta a -14.3 mV, teniendo un mayor efecto de apantallamiento. Esto puede tener impacto en los resultados de inactivación en bacterias que se mostrarán más adelante.

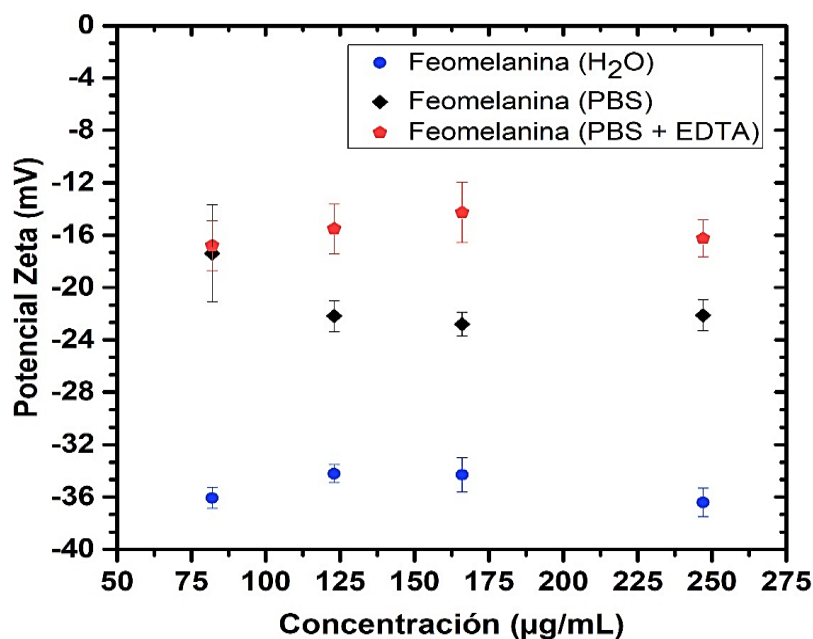


Figura 2.8. Potencial zeta de nanopartículas de feomelanina en función de la concentración en diferentes medios dispersantes.

### 2.3.3. Microanálisis elemental (EDS)

Las muestras sintetizadas de las nanopartículas de feomelanina fueron evaluadas mediante microanálisis elemental, con el fin de conocer la composición química de dichas muestras. Una de las huellas principales de la feomelanina es la presencia de azufre en su composición química, debido a la adición de cisteína en el proceso de síntesis. Los resultados obtenidos mediante esta técnica nos confirman la presencia de este compuesto en un porcentaje promedio de 4.36 % (tabla 2). En la tabla, se observa también la composición de una muestra comercial de eumelanina, incluida como referencia, en donde se puede ver que el azufre no se encuentra presente, esto último es lo esperado. Respecto a los demás elementos (C, N, O), hay que notar que están presentes en proporciones ya reportadas por otros grupos de investigación [47 - 48].

Tabla 2. Porcentaje promedio de los elementos presentes en distintas muestras de feomelanina (PM). Los porcentajes de eumelanina se muestran para efectos comparativos.

<b>Muestra</b>	<b>C (wt %)</b>	<b>N (wt %)</b>	<b>O (wt %)</b>	<b>S (wt %)</b>
<b>Eumelanina</b>	49.53	10.31	40.16	0
<b>PM 1</b>	56.87	12.15	27.19	3.78
<b>PM 2</b>	51.76	13.15	31.39	3.7
<b>PM 3</b>	55.69	10.03	29.83	4.45
<b>PM 4</b>	47.22	12.24	34.98	5.55
<b>PM 5</b>	50.18	14.41	31.33	4.08
<b>PM 6</b>	50.47	12.47	32.41	4.66
<b>PM 7</b>	50.86	12.47	32.39	4.28
<b>Promedio PM</b>	51.86	12.42	31.36	4.36
<b>DE PM</b>	3.34	1.31	2.42	0.63

### 2.3.4. Difracción de Rayos X (XRD)

El espectro XRD de las nanopartículas de feomelanina se muestra en la figura. 2.9, el cual es comparado con la eumelanina comercial. No se han reportado espectros XRD de feomelanina, sin embargo, el espectro obtenido en nuestras mediciones es similar al de la eumelanina. Este espectro se caracteriza por un pico de difracción amplio centrado en  $2\theta = 25^\circ$ . Este pico se debe a la difracción de rayos X de capas planas paralelas en la estructura de las melaninas. Además, esta amplitud es característica de compuestos desordenados y amorfos y son conocidos como espectros característicos non-Bragg, es decir, no hay dispersión coherente del haz incidente como ocurre en el caso contrario de estructuras cristalinas. Por otro lado, las nanopartículas fueron obtenidas mediante síntesis química, este estudio también permitió detectar si al final de la reacción quedaban residuos de compuestos cristalinos como la L - cisteína o el  $\text{KMnO}_4$  [49].



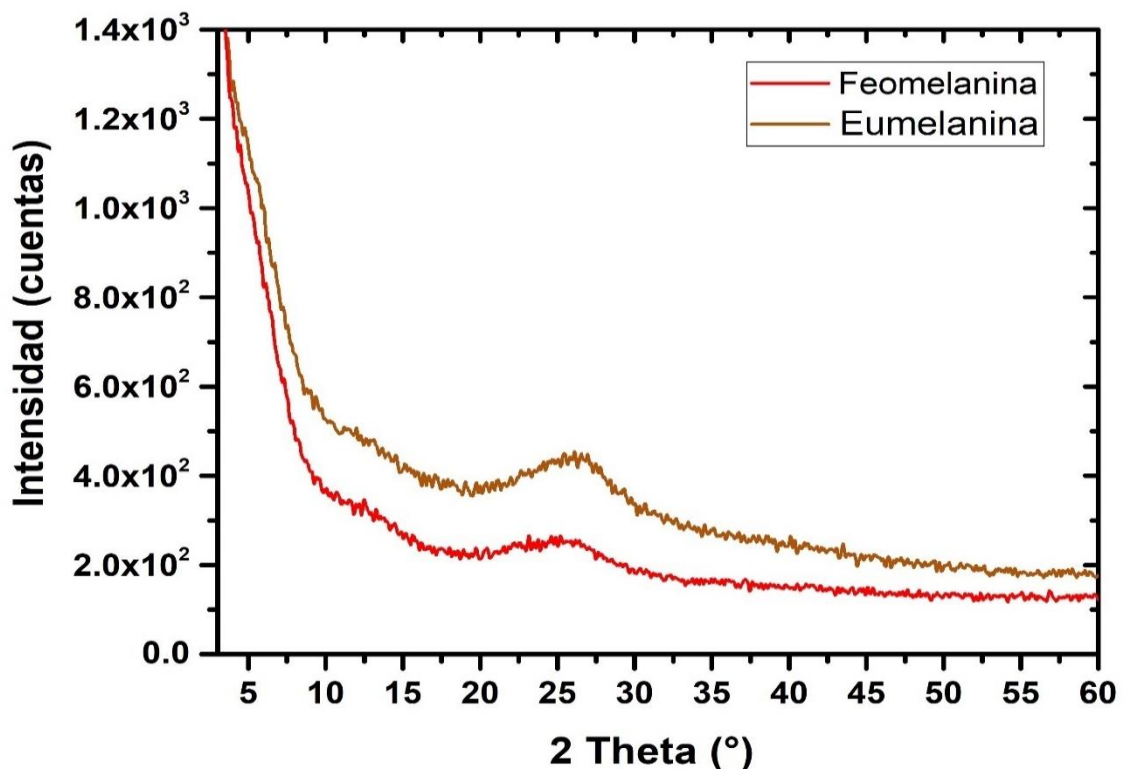


Figura 2.9. Espectro de difracción de rayos X de las nanopartículas de feomelanina (rojo) y eumelanina (café).

### 2.3.5. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

En la figura 2.10, se observa el espectro infrarrojo de la feomelanina comparada con una muestra comercial de eumelanina. La región de  $1000\text{ cm}^{-1}$  a  $1300\text{ cm}^{-1}$  es característica sólo de la feomelanina. El pico en  $1213\text{ cm}^{-1}$  representa la vibración en los enlaces S-O<sub>v</sub> generados por la oxidación de grupos sulfónicos. [50] La región entre  $600$  y  $700\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración del enlace C-S, el cual es muy variable en su posición e intensidad [51]. También se puede observar la vibración del enlace en  $800\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a bandas características de los anillos aromáticos C-H de C=C-H [52]. Por otro lado, se puede observar que hay una diferencia significativa entre el espectro de la feomelanina y la eumelanina. Por ejemplo, se puede diferenciar las vibraciones en los enlaces de la eumelanina, como el enlace (C=O)<sub>v</sub> de COOH en  $1710\text{ cm}^{-1}$  y la vibración en el enlace C-H en  $1280\text{ cm}^{-1}$  [53]. Otros enlaces típicos presentes en las melaninas incluyen las bandas entre  $3700$  y  $3000\text{ cm}^{-1}$

correspondientes a las vibraciones del enlace hidróxido (OH)<sub>v</sub> en grupos índole o pirrol, y finalmente el enlace (OH)<sub>δ</sub> en 1600 cm<sup>-1</sup>.

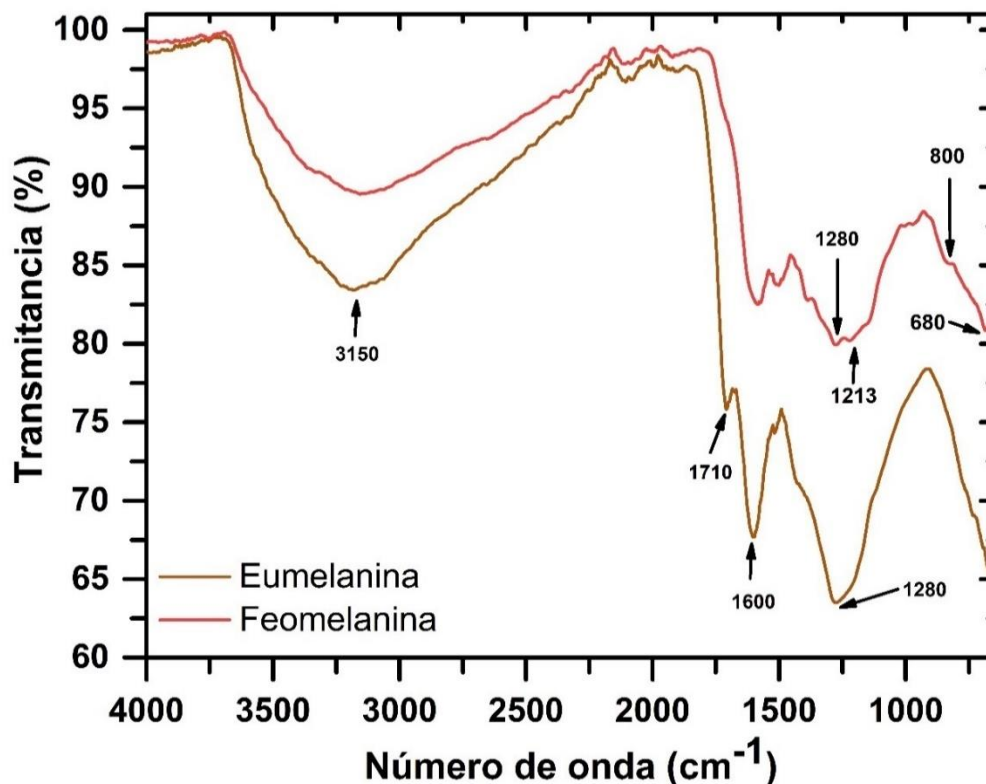


Figura. 2.10. Espectro FT-IR de feomelanina, comparada con eumelanina comercial.

## 2.4. Conclusión

Se logró sintetizar y reproducir con ligeras modificaciones las nanopartículas de feomelanina reportadas por Pyo y colaboradores [8]. Nuestras nanopartículas tuvieron un tamaño esférico uniforme de  $200 \pm 17$  nm en promedio, dispersables en agua y PBS con un potencial zeta de -34.4 mV (reportado por primera vez).

### 3. Inactivación de *Escherichia coli* con nanopartículas de feomelanina

Como se mencionó anteriormente, en la actualidad, se ha buscado eliminar microorganismos que generan enfermedades mediante la inactivación fotodinámica antimicrobiana. Uno de los principales modelos utilizados es la bacteria *E. coli*. Existen distintos fotosensibilizadores probados en este organismo modelo, como el azul de metileno, la curcumina, el rosa de bengala, entre otros. Este nuevo método fotodinámico para eliminar microorganismos mediante el uso de fotosensibilizadores está en constante estudio y actualización, por lo que cada vez hay nuevos fotosensibilizadores con diferentes propiedades, los cuales buscan llegar a ser el fotosensibilizador ideal.

En esta búsqueda de fotosensibilizadores ideales, se han sintetizado y utilizado distintos tipos de pigmentos que generan radicales libres al interactuar con la radiación electromagnética. Como se mencionó en el primer capítulo, la feomelanina es un pigmento natural presente en la piel de los humanos principalmente, y se sabe que es afectada por la luz del sol y tiene una propiedad importante y muy estudiada: su capacidad de generar radicales libres en presencia de radiación electromagnética y oxígeno [4]–[8], [54]–[59]. Respecto a esto último, cuando las melaninas son irradiadas, el oxígeno es consumido y genera fotorreacciones produciendo radicales libres. Esto implica que la feomelanina no funciona como protector de radicales libres a diferencia de la eumelanina que sí lo hace, por lo que la feomelanina se considera un fotosensibilizador y un alto productor de especies radicales tipo II como el radical hidroxilo y el anión superóxido al ser irradiado con UV en condiciones fisiológicas [43].

En este capítulo evaluamos la capacidad de nanopartículas de feomelanina como fotosensibilizador para inactivar bacterias *E. coli*. Para ello, se realizó un estudio bajo diferentes parámetros como el tipo de radiación utilizada, concentración del fotosensibilizador, fluencia de energía y adición de agentes que permeabilizan la membrana. Los resultados fueron medidos mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (CFU, por sus siglas en inglés). Se encontró que la feomelanina se puede utilizar como fotosensibilizador para inactivar bacterias *E. coli*, a una concentración de 166  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y fluencias de energía altas, en presencia de

EDTA que permeabilice la membrana de las bacterias. Así también se realizó la detección de las principales especies reactivas de oxígeno generadas durante el proceso de fotoinactivación, encontrando que ambos mecanismos están presentes.

### **3.1. Fotooxidación en feomelanina**

En general, todas las moléculas cromóforas tienen un umbral de absorción de energía incidente. Ya se ha mencionado que existen dos tipos principales de melaninas: la eumelanina y la feomelanina. Ambas reaccionan distinto a la radiación UV-Vis. El proceso en general se muestra en la figura 3.1. En el caso de la eumelanina, al excitarse, genera radicales indol semiquinónicos, los cuales pueden sufrir una reacción de desproporción (entran en una reacción de oxidación-reducción) para generar dihidroxiíndole e indolequinona, de modo que la absorción de energía fotónica se disipa en forma de calor, adentro de la estructura de esta molécula. Por otro lado, cuando la feomelanina sobrepasa este umbral, o la cantidad de especies reactivas superan su capacidad de absorción, su respuesta será la generación de más especies químicas que pueden dañar diferentes componentes celulares. El proceso inicia cuando los cromóforos de benzotiazina y benzotiazol de la feomelanina son excitados en longitudes de onda dentro del espectro UV-visible, los radicales formados a partir de estas moléculas no pueden sufrir una reacción de desproporción para estabilizar la molécula, contrario a lo que sucede con la eumelanina. La feomelanina no logra este mismo proceso debido a que en los anillos que contienen azufre, la formación de semiquinonas es improbable. Entonces, la molécula del radical benzotiazinólico podría transformarse en especies de benzotiazolio con la pérdida de un carbono (mecanismo poco conocido) [60].

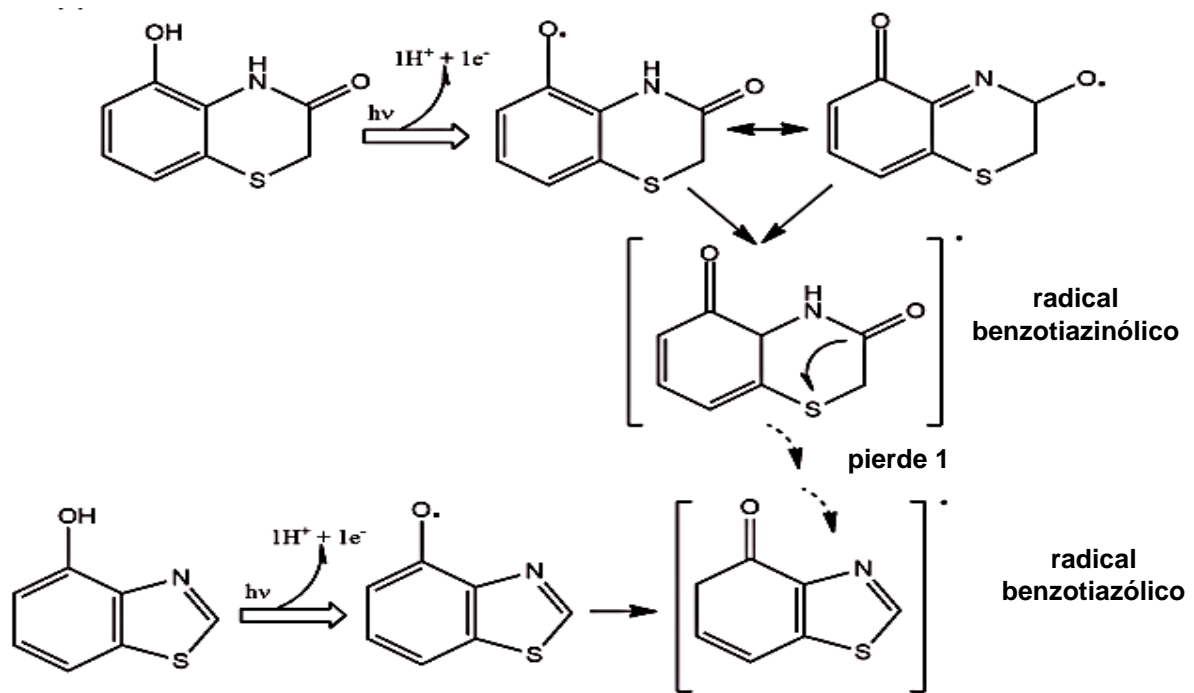


Figura 3.1. Formación de radicales benzotiazinónicos y benzotiazólicos debido a la fotoexcitación de la feomelanina [61].

En particular, en los melanocitos, cuando ambas melaninas son expuestas a radiación UV-A, la eumelanina funciona con un fotoprotector y raramente genera radicales libres. Por otro lado, la feomelanina funciona como un agente fototóxico y al no tener una ruta para generar especies no radicales a partir de especies radicales, interactúa con el oxígeno molecular, generando hasta 100 veces más radical anión superóxido respecto a la eumelanina, el cual a su vez genera otras especies reactivas de oxígeno; incluso, en la piel, la exposición a radiación UV-A, estimula la síntesis de óxido nítrico aumentando el óxido nítrico, y la reacción entre el superóxido y el óxido nítrico puede generar aniones peroxinitrito [62].

Todos estos radicales, pueden dañar moléculas como el ADN, proteínas y lípidos de las células (figura 3.2).

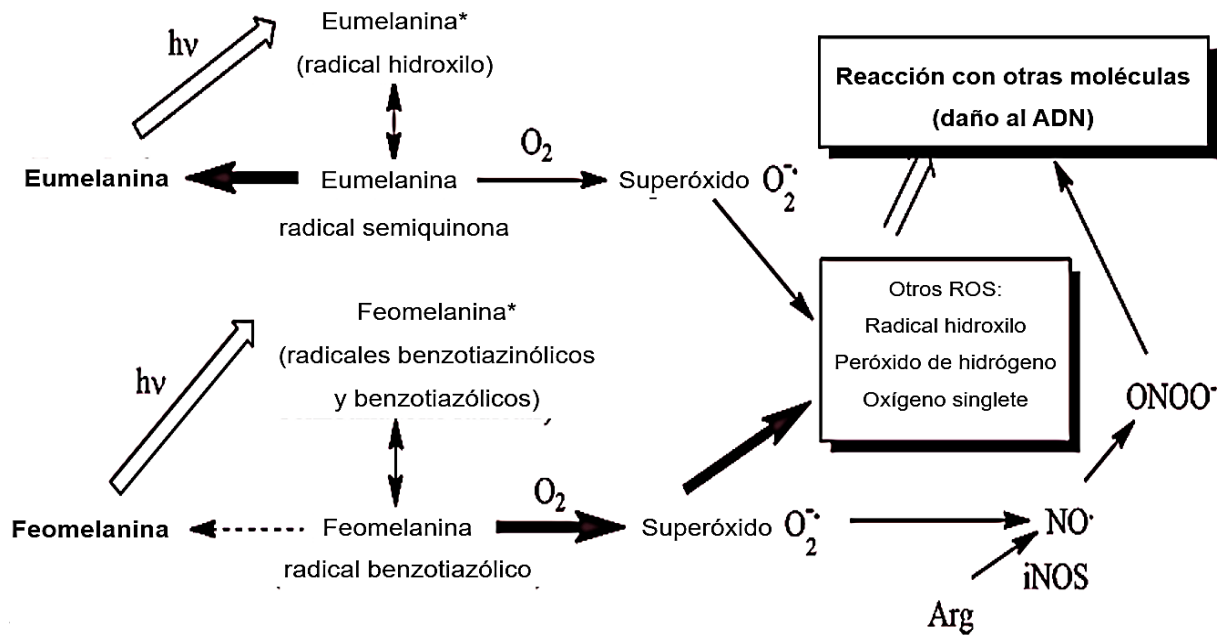


Figura 3.2 Especies reactivas de oxígeno generadas por la eumelanina y la feomelanina. En los melanocitos, la principal especie generada por acción de la radiación UV-A es el anión superóxido. Modificado de [61].

Existen muchos trabajos demostrando el papel fotosensibilizante de la feomelanina. Egil Kvam y Rex M. Tyrrell estudiaron el papel de la melanina en la inducción de daño oxidativo de bases de ADN de células de melanoma humano irradiadas con UV-A [55]. Ellos observaron que el aumento de la síntesis de melanina no protegió contra los rayos UV-A, en su lugar, el alto contenido de melanina mostró una doble cantidad de 8-hidroxi-desoxiguanosina, concluyendo que la inducción de síntesis de melanina, mas no la propia melanina, aumenta la susceptibilidad en células de melanoma humano al daño oxidativo premutagénico de bases de ADN. Se ha reportado que incluso la radiación visible en el rango de la luz verde (535 nm) puede dañar los melanocitos mediante fotosensibilización, decrementando la viabilidad celular, incrementando la permeabilidad de la membrana e incluso generando muerte celular, demostraron que la feomelanina produce mayor cantidad de oxígeno singlete (30 % más) que la eumelanina al ser irradiadas con luz visible y es más resistente al foto-blanqueamiento [5]. También Godley *et al.*, utilizaron cultivos de células epiteliales retínales primarias expuestas a la luz azul (390-550 nm a 2,8 mW/cm<sup>2</sup>) [63]. Los autores observaron que la luz en tiempos de exposición cortos causó un daño en el ADN mitocondrial, debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), confirmando que el anión superóxido es el principal responsable de estas lesiones,

como se observa en la figura 1.12. Ellos concluyen que la luz azul puede contribuir en el envejecimiento celular, patologías relacionadas con la edad y tumorigénesis. En otro trabajo, se concluye que la feomelanina irradiada con UV-B, fotosensibiliza e induce apoptosis en células adyacentes, independiente a la producida por caspasa-3 [4]. Pyo y colaboradores, también evaluaron el efecto de la radiación UV-C en nanopartículas de feomelanina para eliminar células Hela, obteniendo una disminución en la viabilidad celular del 50 %. Sin embargo, no hay evidencia en cuanto a su respuesta a la radiación UV-Vis en la inactivación de microorganismos [8].

## **3.2. Materiales y métodos**

### **3.2.1. Cultivo y preparación de bacterias**

Para el cultivo de bacterias se necesitó el siguiente material:

- *E. coli*, K12-MG1655
- 10 g de peptona de caseína (Tryptona).
- 5 g de extracto de levadura.
- 10 g de NaCl.
- 20 g/L de agar.

Para iniciar el cultivo de bacterias, se activó la cepa de *E. coli* K12-MG1655. Para ello se tomó una biomasa desconocida de la cepa y se colocó en 2 mL de medio de caldo Luria-Bertani (medio LB) (Fisher Reagents, USA). Esta solución se incubó durante una noche a 37 ° C (12 – 18 h), a una velocidad de 180 RPM en un agitador orbital (MaxQ 4450, ThermoFisher Scientific). Posteriormente, se regularizó el tiempo de generación de las bacterias. Para ello se tomaron 200  $\mu\text{L}$  del inóculo inicial y se colocaron en 20 mL de medio LB. Esta solución se mantuvo en agitación a 200 RPM a 37 °C, hasta alcanzar una OD de 0.3 unidades ( $\sim 1.7 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$ ). Se realizaron 3 diluciones posteriores, tomando 10 mL del medio anterior y colocándolo en 10 mL de medio LB nuevo. Estas 3 soluciones también fueron incubadas a 180 RPM y 37 °C. Después, se tomaron 10 mL del cultivo final y posteriormente este cultivo se lavó 3 veces con PBS por centrifugación a 4000 g durante 4 minutos, y finalmente se

volvieron a suspender en PBS para iniciar el proceso de irradiación. En la figura 3.3, se muestra el proceso resumido del protocolo utilizado para el cultivo de bacterias.



Figura 3.3. Proceso de cultivo bacteriano de *E. coli*. Solución A) Activación de la cepa (overnight). Solución B) Regularización del tiempo de generación de las bacterias para obtener una D. O= 0.3. Solución. C) Lavado por centrifugación de la solución bacteriana.

### 3.2.2. Arreglo optoelectrónico

Para el proceso de fotoinactivación se utilizó el arreglo optoelectrónico que se muestra en la figura 3.4 [34]. Dicho arreglo contaba con los siguientes elementos:

- 1) **Láser UV-A (Excelsior 375, Newport Spectra Physics).** Longitud de onda de 377 nm, con una potencia de 16.0 mW.
- 2) **Diodo láser azul (Laser Lands).** Longitud de onda de 450 nm, con potencia de 120 mW.
- 3) **Expansor de haz láser galileano.** Este arreglo estaba constituido por una lente divergente bicóncava y una lente convergente biconvexa. El objetivo de estas lentes fue colimar la mayor cantidad de radiación correspondiente proveniente de la fuente de luz e incrementar el tamaño del spot del láser de forma que el diámetro coincidiera con el diámetro del pozo de microcultivo donde se encontraban las bacterias y el fotosensibilizador.
- 4) **Filtro de densidad neutra.** Este filtro controló la potencia del haz láser, para que el sistema brindara la misma irradiancia tanto para la radiación UV-A como para la luz azul.



- 5) **Obturador electromecánico.** Este aditamento permitió garantizar que las bacterias *E. coli* fueran irradiadas por el intervalo de tiempo exacto programado. Esto se logró mediante la interrupción de la continuidad del haz láser que pasa por el sistema óptico.
- 6) **Espejo con recubrimiento de aluminio (PF10-03-F01, Thorlabs).** El objetivo de este componente fue reflejar y dirigir la radiación láser hacia el pozo de microcultivo específico. El espejo tiene un recubrimiento especial para reflejar la radiación UV-A principalmente y en segundo término la radiación visible.
- 7) **Sistema electro-computacional.** El objetivo de este fue definir la duración de la sesión de foto-inactivación, mediante el control del obturador electromecánico.
- 8) **Fuente de tensión.** Para la alimentación de los componentes electromecánicos del sistema óptico, se utilizó una fuente de tensión continua de 12.0 V, que aportaba una corriente máxima de 7.0 A.
- 9) **Placa Arduino Uno.** Es una placa con microcontrolador integrado. Se encargaba de leer la información proveniente del módulo Bluetooth y transformaba la señal a PWM para controlar la posición y tiempos del obturador electromecánico.
- 10) **Módulo Bluetooth de transmisión y recepción de datos.** Para comunicar la computadora con la placa Arduino se utilizó el módulo Bluetooth HC5.

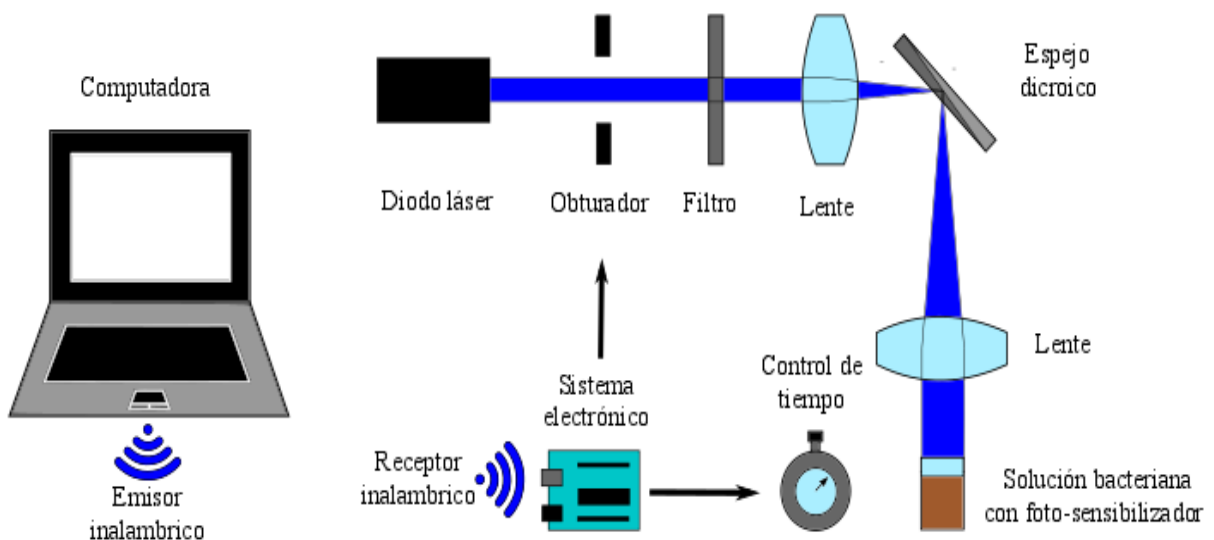


Figura 3.4. Sistema optoelectrónico para la irradiación de bacterias *E. coli* controlado mediante interfaz Arduino-Labview.

### 3.2.3. Proceso de fotoinactivación de *E. coli*

Las bacterias en solución fueron expuestas por separado en los grupos experimentales mostrados en la tabla 3. Las diferentes concentraciones fueron utilizadas para decidir cuáles de ellas tenían un mejor rendimiento en cuanto a la eliminación de las bacterias. Se aumentó la fluencia en función del tiempo de exposición en algunos casos con el fin de observar si este aumento mejoraba la inactivación antimicrobiana de *E. coli*.

Tabla 3. Grupos experimentales de irradiación con luz azul y UV-A bajo diferentes fluencias de energía (90, 180 y 270 J/cm<sup>2</sup>), concentraciones de feomelanina (83, 123, 166 y 247 µg/mL) y con adición de EDTA.

Grupo experimental	Radiación electromagnética		Fluencia de energía (J/cm <sup>2</sup> )			Concentración (µg/mL)				EDTA	
	Azul (450 nm)	UV-A (375 nm)	90 (1 h)	180 (2 h)	270 (3 h)	83	123	166	247	Si	No
1	X		X			X					X
2	X		X				X				X
3	X		X					X			X
4	X		X						X		X
5	X			X				X		X	
6	X			X				X			X
7	X				X			X		X	
8	X				X			X			X
9		X	X				X			X	
10		X	X				X				X
11		X	X					X		X	
12		X	X					X			X
13		X		X				X		X	
14		X		X				X			X
15		X			X			X		X	
16		X			X			X			X

Para el proceso de inactivación fotodinámica con luz azul, se llenaron alícuotas con 100 µL de la suspensión bacteriana y 900 µL de solución de feomelanina a diferentes concentraciones (83, 123, 166 y 247 µg/mL). En el caso de la inactivación con UVA, se

llenaron alícuotas con 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana y 900  $\mu\text{L}$  de solución de feomelanina a dos concentraciones: 123 y 166  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , estas concentraciones fueron elegidas en función de los resultados con luz azul obtenidos relacionada con el porcentaje de inactivación obtenido, de los cuales de hablará más adelante. Posteriormente, para cada tipo de radiación electromagnética utilizada se agregó un agente quelante, el EDTA, con el fin de mejorar la inactivación, ya que el EDTA reduce el potencial zeta de las nanopartículas de feomelanina (figura 2.8) y por ende la repulsión entre estas y la membrana negativamente cargada de *E. coli*. El EDTA se preparó a una concentración stock de 20 mM en PBS para obtener una concentración final de 10 mM.

Las bacterias fueron expuestas a estas soluciones químicas con el siguiente protocolo:

Se colocaron 450  $\mu\text{L}$  de feomelanina a las diferentes concentraciones arriba mencionadas, 450  $\mu\text{L}$  de EDTA y 100  $\mu\text{L}$  de la solución bacteriana. Se vertieron 300  $\mu\text{L}$  de cada muestra en una placa de microcultivo de 96 pozos (Costar 3595), que fueron incubadas durante 30 minutos en oscuridad antes de ser expuestas a la luz de diodos láser (luz azul) y el láser UVA a diferentes fluencias de energía. El arreglo óptico iluminó los pozos adaptando el tamaño del spot del láser al tamaño del pozo de microcultivo. El experimento se realizó en una habitación oscura. En la superficie de la placa, la potencia de salida del diodo láser se midió con el medidor de potencia en 8  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , dicha potencia de salida fue la misma para ambas fuentes de luz, obtenida con ayuda del filtro de densidad neutra.

Los grupos control con *E. coli* fueron los siguientes: feomelanina (123-166  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sin/con EDTA bajo condiciones de completa oscuridad, solución de feomelanina sin/con EDTA en la placa de micro cultivo, pero sin exposición directa a la luz láser, soluciones bacterianas en EDTA, y por último muestras bacterianas suspendidas en PBS (sin feomelanina ni tratamiento con luz). Terminado el proceso de fotoinactivación, las células bacterianas sobrevivientes se estimaron contando las unidades formadoras de colonias (CFU) en cada placa, comparadas con los controles antes mencionados. Todos los experimentos fueron realizados al menos por triplicado con 3 repeticiones cada uno.

### 3.2.4. Cuantificación del efecto de la foto-inactivación en *Escherichia coli*

Para cuantificar el grado de foto-inactivación obtenido después de la exposición de bacterias a la radiación electromagnética y al fotosensibilizador tanto en presencia como en ausencia del EDTA, se realizaron 5 diluciones seriadas y 5 cultivos sólidos para cada experimento de *E. coli* en agar LB, a partir de los controles y el experimento en cuestión. Para ello se extrajeron 100  $\mu\text{L}$  de las suspensiones bacterianas (irradiada y controles) y se colocaron en 25 mL de medio agar LB, se agitó para obtener una mezcla homogénea y se dejó enfriar. Los cultivos sólidos se incubaron 24 horas a 37 ° C y el conteo de las CFU se realizó a partir de las 48 horas. En la figura 3.5 se muestra una imagen representativa de la preparación de los cultivos sólidos de *E. coli*

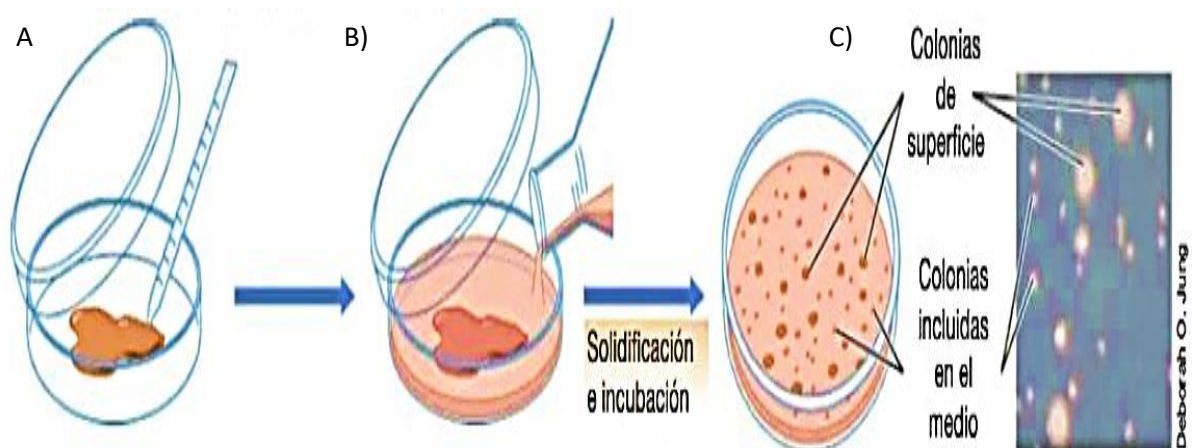


Figura 3.5. Representación de la preparación de los cultivos sólidos para la cuantificación de CFU en *E. coli* en las suspensiones control e irradiadas. A) Se colocan 100  $\mu\text{L}$  de la solución bacteriana en la caja Petri. B) Se agregan 25 mL de medio Agar-LB y se deja incubar de 24-48 h. C) CFU en superficie e incluidas en el medio listas para ser contadas. Modificado de [22].

## 3.3. Resultados y discusión

### 3.3.1. Fotoinactivación con feomelanina y luz azul

Los resultados para los distintos casos correspondientes a la irradiación de bacterias *E. coli* con feomelanina y luz azul, y su posterior cuantificación del efecto obtenido por la fotosensibilización se realizó mediante el conteo de CFU. Estos resultados se presentan a continuación:

El primer parámetro que se fijó fue la fluencia de energía a  $90 J/cm^2$ , que corresponde a 1 hora de irradiación. En este primer caso se varió la concentración de las nanopartículas de feomelanina utilizada. En la figura 3.6 se observan los resultados correspondientes para cada una de las concentraciones ya mencionadas en el apartado anterior. Para cada una de ellas, se puede observar en el eje X las siguientes muestras:

- *PBS control*: muestras bacterianas suspendidas en PBS.
- *PS control*: muestras bacterianas con fotosensibilizador en condiciones de oscuridad.
- *PS\* control*: muestras bacterianas con fotosensibilizador sin irradiación, pero expuestas en la misma placa que la muestra irradiada.
- *Blue L + PS*: muestras bacterianas con fotosensibilizador e irradiada con luz azul.

A partir de estos resultados, en el primer caso ( $83 \mu g/mL$ ) se puede observar que no hay reducción significativa ( $\sim 4\%$ ) de las CFU respecto a los distintos controles ya mencionados. Es probable que esto suceda porque la concentración de feomelanina es muy baja y no genera las suficientes ROS.

Posteriormente, con las concentraciones de  $123$  y  $166 \mu g/mL$  (figura 3.6), se observa una ligera disminución en las CFU respecto a la muestra *PS control*. Esta disminución corresponde al  $\sim 36\%$  y  $\sim 44\%$  respectivamente.

Al utilizar una concentración más alta,  $247 \mu g/mL$  (figura 3.6), no se observa disminución en las CFU respecto a la muestra *PS control*. De hecho, se puede observar que, a esta concentración, las nanopartículas de feomelanina son tóxicas

por sí solas, porque la cantidad de CFU entre las muestras *PS control* y *Blue L + PS* son similares, es decir, disminuyen sin la presencia de radiación. Los resultados anteriores están resumidos en la tabla 4.

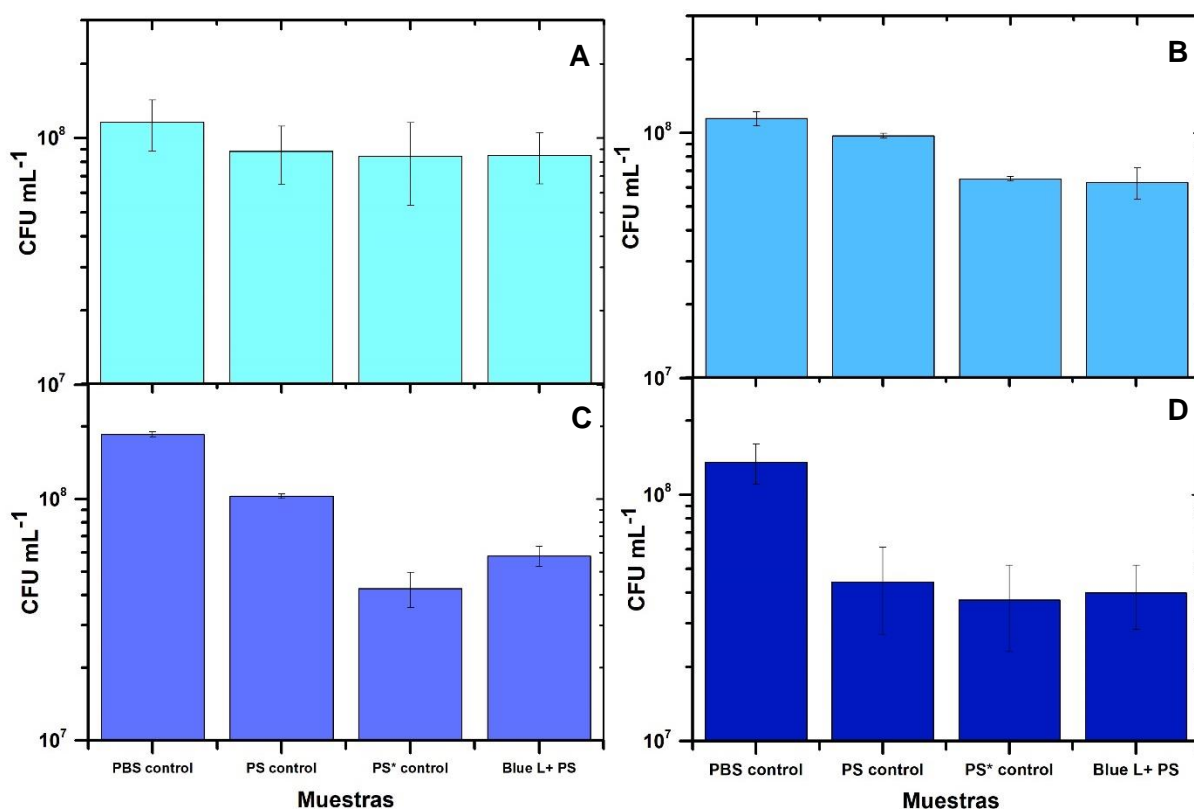


Figura 3.6. Fotoinactivación de *E.coli* con nanopartículas de feomelanina a diferentes concentraciones, excitadas con luz azul ( $90 \text{ J/cm}^2$ ). A)  $83 \mu\text{g/mL}$ . B)  $123 \mu\text{g/mL}$ . C)  $166 \mu\text{g/mL}$ , D)  $247 \mu\text{g/mL}$ .

Tabla 4. Unidades formadoras de colonias (CFU) por mL para muestras control y expuestas a luz azul a diferentes concentraciones y una fluencia de  $90 \text{ J/cm}^2$

Muestra	CFU ( $\log_{10}$ ) mL <sup>-1</sup>			
	PS			
	83 $\mu\text{g/mL}$	123 $\mu\text{g/mL}$	166 $\mu\text{g/mL}$	247 $\mu\text{g/mL}$
PBS	8.06 ± 0.10	8.06 ± 0.03	8.27 ± 0.02	8.13 ± 0.08
+PS	7.95 ± 0.13	7.99 ± 0.01	8.01 ± 0.01	7.65 ± 0.19
+PS*	7.93 ± 0.15	7.81 ± 0.01	7.63 ± 0.05	7.57 ± 0.19
Blue L + PS	7.93 ± 0.10	7.80 ± 0.06	7.76 ± 0.04	7.60 ± 0.15

En la figura 3.7 se puede observar con mayor claridad la supervivencia de las bacterias *E. coli* representada por las *CFU/mL* en función de la concentración de feomelanina. Aquí se puede observar a que las bacterias suspendidas en buffer PBS (Concentración cero de feomelanina) sin irradiación disminuyen dependiendo la concentración de las nanopartículas de feomelanina utilizada (toxicidad en condiciones de oscuridad). Sin embargo, esta disminución en el número de *CFU/mL* aumenta considerablemente en presencia de las nanopartículas con la luz azul ( $90 J/cm^2$ ) indicando que el efecto producido es debido a la contribución en conjunto de estos agentes.

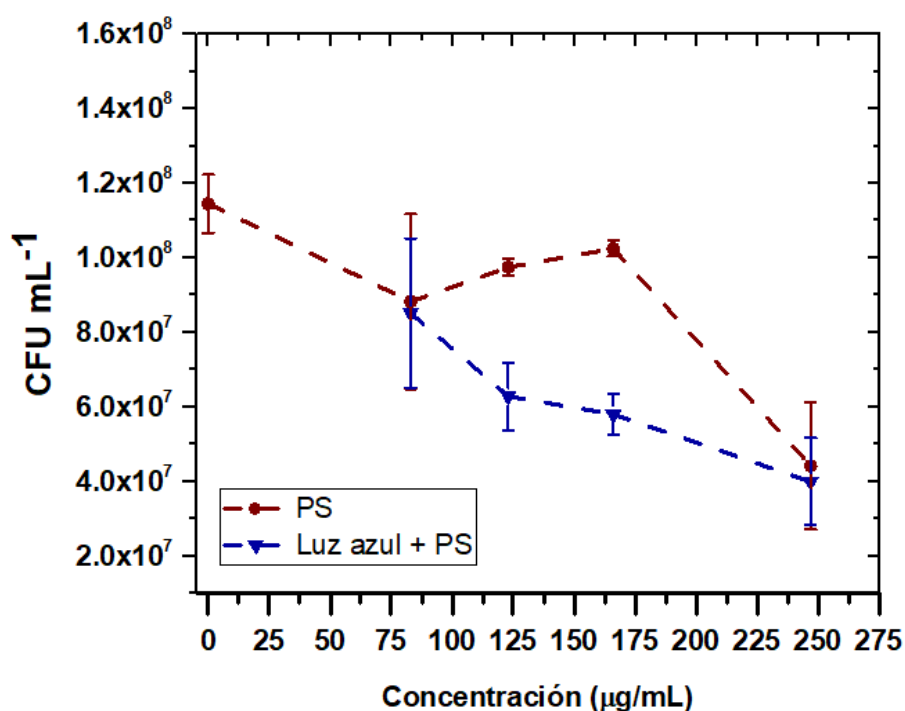


Figura 3.7. Toxicidad en condiciones de oscuridad (círculos) y el efecto bactericida con luz azul de 450 nm y 1 h de exposición (triángulos) en la inhibición del crecimiento de *E. coli*, en función de la concentración de las nanopartículas de feomelanina.

Con base a los resultados anteriores, se tomó la concentración de  $166 \mu g/mL$  para experimentos posteriores, debido a que es donde se presentó mayor inactivación en comparación con las otras concentraciones. Otros parámetros por considerar más adelante a esta longitud de onda son la fluencia de energía y el uso de EDTA.

Para los siguientes experimentos se fijó la concentración de  $166 \mu\text{g}/\text{mL}$  y se utilizó la fluencia de energía en  $180$  y  $270 \text{ J}/\text{cm}^2$  (2 y 3 horas respectivamente). En la figura 3.8 se muestran los resultados de estos experimentos. Se puede observar que con una fluencia de energía de  $180 \text{ J}/\text{cm}^2$ , no hay cambios significativos entre las muestras control e irradiada en presencia de las nanopartículas de feomelanina. Sin embargo, cuando se aumenta la fluencia de energía a  $270 \text{ J}/\text{cm}^2$  se muestra una ligera disminución en las CFU respecto a los controles que corresponde al  $\sim 70\%$  de inactivación (0.5 órdenes de magnitud). En la tabla 5, se resumen estos resultados. Reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Sociedad Americana de Microbiología (ASM), mencionan que un efecto antibacterial se da al demostrar una eficacia de reducción de  $3 \log_{10}$  en las CFU [19]. Como se puede observar en las gráficas y tablas de los casos mencionados anteriormente, este efecto no se obtuvo.

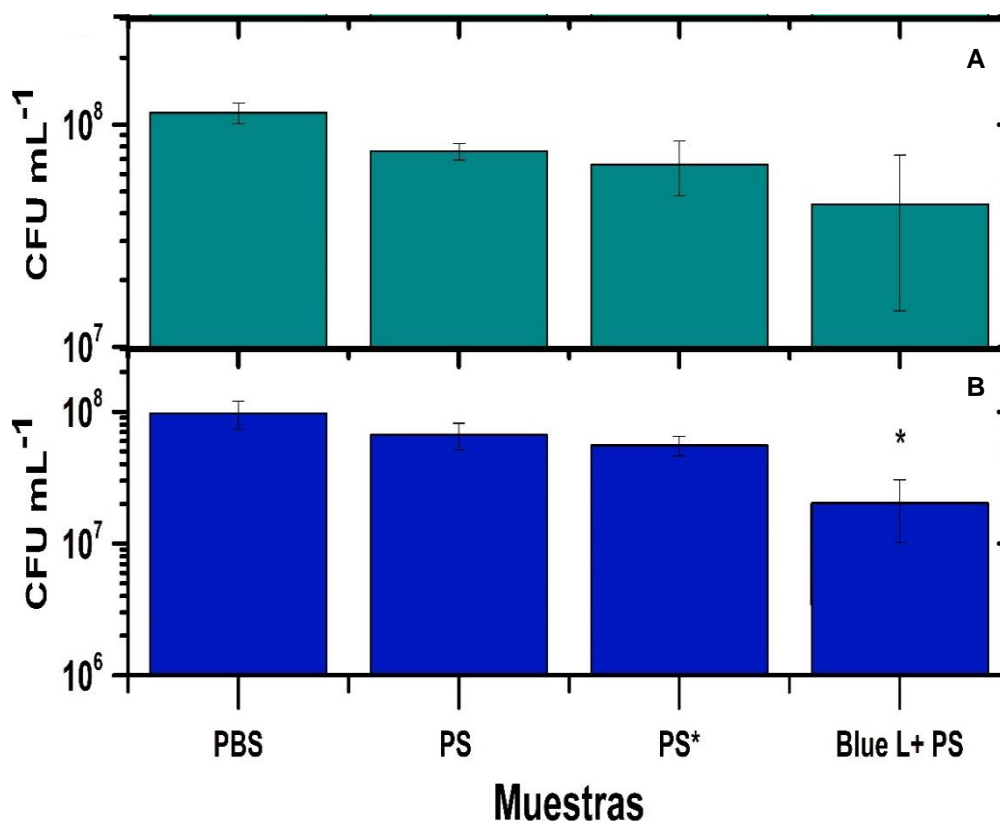


Figura 3.8. Fotoinactivación de *E. coli* con nanopartículas de feomelanina ( $166 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), excitadas con luz azul. Los cultivos fueron incubados durante 2 h (A) y 3h (B). \*P < 0.05.



Tabla 5. Unidades formadoras de colonia (CFU) por mL para muestras control y expuestas a luz azul a diferentes fluencias de energía con una concentración fija (166  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Muestra	CFU ( $\log_{10}$ ) mL <sup>-1</sup>	
	PS	
	2 horas	3 horas
PBS	8.05 $\pm$ 0.05	7.99 $\pm$ 0.10
+PS	7.88 $\pm$ 0.04	7.82 $\pm$ 0.09
+PS*	7.82 $\pm$ 0.12	7.75 $\pm$ 0.08
<b>Blue L + PS</b>	7.64 $\pm$ 0.23	7.31 $\pm$ 0.22

Una explicación a este comportamiento es el carácter hidrofóbico de las melaninas; sumado a esto, se puede observar en la figura 2.8 (potencial zeta), que el potencial zeta de las nanopartículas de feomelanina es negativo; ambas propiedades, hacen difícil que las nanopartículas se puedan acercar o pegar a la membrana externa de la bacteria (con carga negativa). Con estas características, las nanopartículas de feomelanina se pueden clasificar dentro de las moléculas fotosensibilizadoras aniónicas. Dentro de esta clasificación se encuentran el rosa de bengala y la verde indocianina, entre otros [60]. Se sabe que por su estructura y carga, la membrana externa de las bacterias Gram-negativas dificulta la captura de fotosensibilizadores aniónicos y neutros.

Un punto importante respecto a este tipo de fotosensibilizadores es que debido a su carga es poco probable que sean capturados dentro del citoplasma de la bacteria e incluso que estén cercanos a la membrana externa; de hecho, George y colaboradores, reportaron que los fotosensibilizadores aniónicos a diferencia de los catiónicos no pueden entrar al citoplasma de la bacteria mediante difusión simple [60]. Los resultados de su investigación concluyen que la captura de este tipo de fotosensibilizadores puede ser mediada mediante proteínas transportadoras.

Típicamente las proteínas transportadoras en bacterias Gram-negativas son las porinas.

Sin embargo, se ha reportado que no es estrictamente necesario que las moléculas fotosensibilizadoras atraviesen la membrana externa de bacterias Gram-negativas. El requisito es que estén tan cercanos como para que el radical oxígeno singlete pueda dañar la membrana. Esto sucede siempre y cuando la longitud de difusión sea menor a 1  $\mu\text{m}$ , que es aproximadamente la longitud media de la bacteria *E. coli* [65]. En caso de que el fotosensibilizador no genere oxígeno singlete o el porcentaje de producción del oxígeno singlete sea muy pequeño, la distancia tendría que ser de aproximadamente 1.5 nm, ya que esta es la longitud de difusión reportada del radical hidroxilo (especie más reactiva dentro de las ROS mediada por transferencia de carga) [66].

Lo anterior, explica porque aun cuando variamos la concentración y la fluencia de energía, la reducción en el número de CFU es mínima. Una alternativa para mejorar este efecto es el uso de agentes que permeabilicen la membrana externa, ya que esto incrementará la captura de moléculas tanto catiónicas como hidrofóbicas y aniónicas, como es el caso de la feomelanina. Como se mencionó anteriormente, uno de los más utilizados es el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Esta sal causa daño en la membrana externa de bacterias Gram-negativas como *E. coli*, al secuestrar cationes divalentes como los iones metálicos como el ión calcio y el magnesio presente en el lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa. Posteriormente, los grupos fosfatos vecinos con cargas iguales se repelen entre sí, y en conjunto esto hace que la membrana de la bacteria sea más permeable.

Los siguientes resultados corresponden a muestras bacterianas irradiadas con luz azul y feomelanina (166  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en presencia de EDTA a 10 mM. En el eje de las X se observan estas nuevas muestras:

- *EDTA*: muestras bacterianas suspendidas en EDTA (disueltas en PBS).
- *PS + EDTA*: muestras bacterianas con fotosensibilizador y EDTA en condiciones de oscuridad.
- *PS\* + EDTA*: muestras bacterianas con fotosensibilizador y EDTA sin irradiación, pero expuestas en la misma placa que la muestra irradiada.

- *Blue – L+ PS + EDTA*: muestras bacterianas con fotosensibilizador y EDTA irradiada con luz azul.

Se varió nuevamente la fluencia de energía en 180 y 270  $J/cm^2$  (2 y 3 h). En la figura 3.9, se observa que para ambas fluencias de energía el número de CFU es menor que los casos en donde no está presente el EDTA; además, el efecto de la inactivación es similar para ambas fluencias de energía, teniendo aproximadamente un orden de magnitud de inactivación respecto a la muestra *control PS + EDTA*. Los resultados están resumidos en la tabla 6.

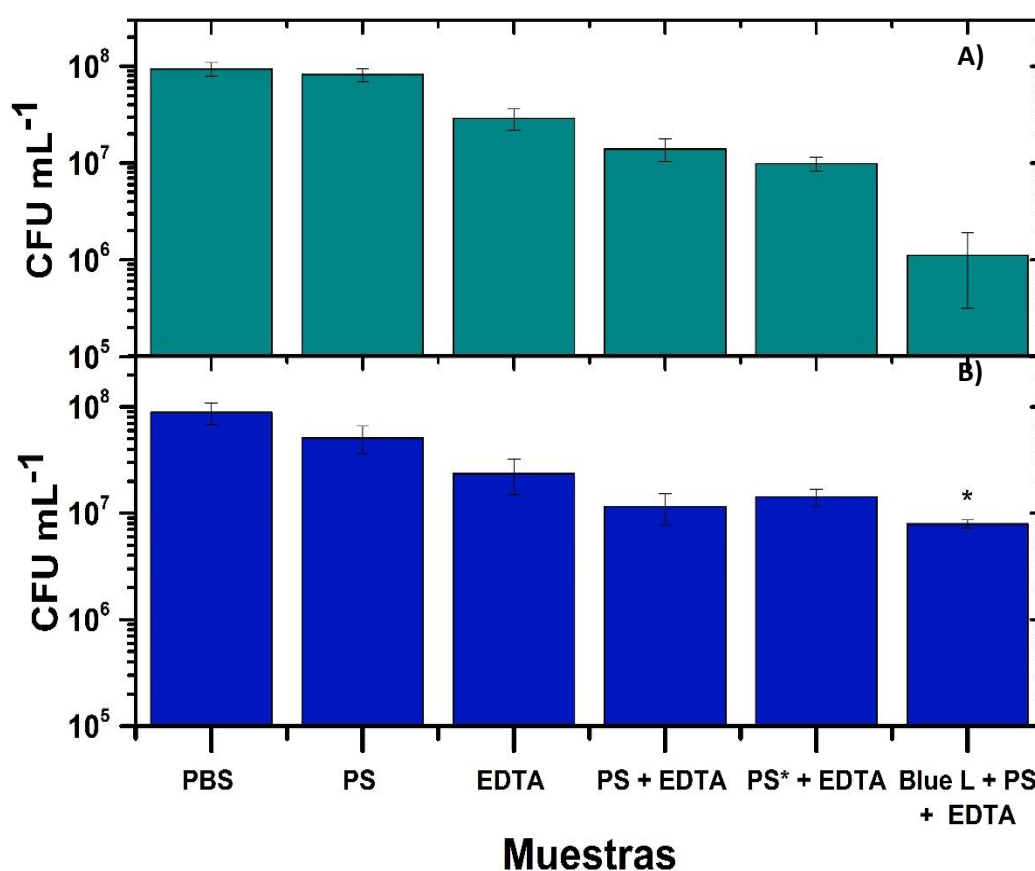


Figura 3.9. Fotoinactivación de *E. coli* con nanopartículas de feomelanina con una concentración fija de 166  $\mu g/mL$ , en presencia de EDTA (10 Mm) y excitadas con luz azul. Los cultivos fueron incubados durante A) 2 h Y B) 3h. \*P < 0.05.

Tabla 6. Unidades formadoras de colonia (CFU) por mL para muestras control y expuestas a luz azul en presencia de feomelanina con una concentración fija de 166  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y EDTA a diferentes fluencias de energía.

Muestra	CFU ( $\log_{10}$ ) $\text{mL}^{-1}$	
	+EDTA	
	2 horas	3 horas
PBS	7.97 $\pm$ 0.06	7.95 $\pm$ 0.11
+PS	7.92 $\pm$ 0.06	7.71 $\pm$ 0.13
+EDTA	7.46 $\pm$ 0.10	7.37 $\pm$ 0.20
Blue L + EDTA	-	7.06 $\pm$ 0.15
+PS + EDTA	7.15 $\pm$ 0.11	7.15 $\pm$ 0.08
+PS* + EDTA	7.00 $\pm$ 0.07	6.90 $\pm$ 0.04
Blue L + PS + EDTA	6.05 $\pm$ 0.46	6.39 $\pm$ 0.35

### 3.3.2. Fotoinactivación con feomelanina y radiación UV-A

De los resultados obtenidos con luz azul, se tomaron nuevamente las dos concentraciones intermedias de 123 y 166  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , las cuales dieron mejores resultados en cuanto a la inactivación con luz azul a 1 hora de irradiación. Esto debido a que al ser la radiación UV-A más energética es probable que con menor concentración de feomelanina, se obtuvieran los resultados más eficientes. Los experimentos siguientes fueron realizados sin adición de EDTA.

Como en la sección anterior, en el eje de las X se observan las siguientes muestras:

- *PBS control*: muestras bacterianas suspendidas en PBS.

- *PS control*: muestras bacterianas con fotosensibilizador en condiciones de oscuridad.
  - *PS\* control*: muestras bacterianas con fotosensibilizador sin irradiación pero expuestas en la misma placa que la muestra irradiada.
  - *UV-A + PS*: muestra bacteriana con fotosensibilizador e irradiada con luz azul.
- Se fijó la fluencia de energía a  $90 \text{ J/cm}^2$  (1 h). En la figura 3.10, se puede observar los resultados correspondientes para ambas concentraciones irradiadas con UV-A. La inactivación obtenida es mínima, parecida a la obtenida en el caso de *Blue - L + PS* (1h). Como se puede corroborar en la tabla 7, la mayor disminución en el número de CFU es de 0.23 logaritmos cuando se compara con *Control PS*.

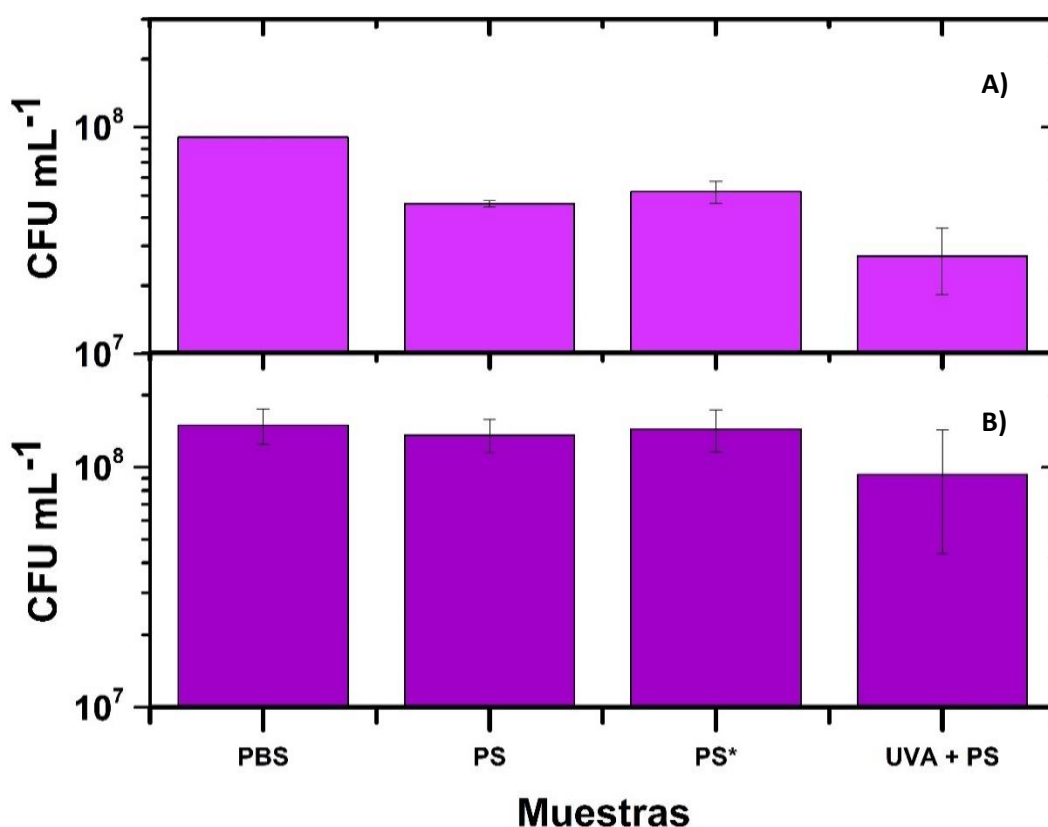


Figura 3.10. Fotoinactivación de *E. coli* con nanopartículas de feomelanina. A) 123  $\mu\text{g/mL}$  ; B) 166  $\mu\text{g/mL}$ . Las muestras fueron excitadas con radiación UV-A incubadas durante 1 h.

Tabla 7. Unidades formadoras de colonia (CFU) por mL para muestras control y expuestas a radiación UV-A a diferentes concentraciones con una fluencia de energía fija de 90 J/cm<sup>2</sup>.

Muestra	CFU (log <sub>10</sub> ) mL <sup>-1</sup>	
	PS	
	123 µg/mL	166 µg/mL
PBS	7.95 ± 0.00	8.17 ± 0.08
+PS	7.66 ± 0.01	8.13 ± 0.07
+PS*	7.71 ± 0.05	8.16 ± 0.09
UVA + PS	7.43 ± 0.14	7.97 ± 0.17

Cómo en el caso con luz azul, es de esperarse que la inactivación en los casos anteriores sea pequeña, debido a las propiedades hidrofóbicas y de carga negativa de la feomelanina ya mencionadas; por lo tanto, se tomó ambas concentraciones (123 y 166 µg/mL) y se agregó EDTA a 10 mM. Los resultados obtenidos se muestran en las gráficas de la figura 3.11. En el eje de las X se observan estas nuevas muestras:

- *EDTA*: muestras bacterianas suspendidas en EDTA (disueltas en PBS).
- *PS + EDTA*: muestras bacterianas con fotosensibilizador y EDTA en condiciones de oscuridad.
- *PS\* + EDTA*: muestras bacterianas con fotosensibilizador y EDTA sin irradiación pero expuestas en la misma placa que la muestra irradiada.
- *UV-A + PS + EDTA*: muestras bacterianas con fotosensibilizador y EDTA irradiada con radiación UV-A.

Como se observa en la figura 3.11, para las dos concentraciones elegidas, hay una reducción significativa en el número de CFU en las muestras *UV-A + PS + EDTA* respecto a la muestra *PS + EDTA*. Esta disminución en el número de CFU es mayor para la concentración de 166 µg/mL. Así mismo, en la tabla 8 se puede corroborar que para la concentración más baja utilizada, hay una diferencia entre ambas muestras de 1 orden de magnitud y de 1.5 órdenes de magnitud para la concentración

mayor. Aunque la inactivación se mejoró, respecto a los resultados obtenidos en las bacterias irradiadas con luz azul, aún no se logró obtener el efecto antibacterial deseado, incluso agregando el quelante.

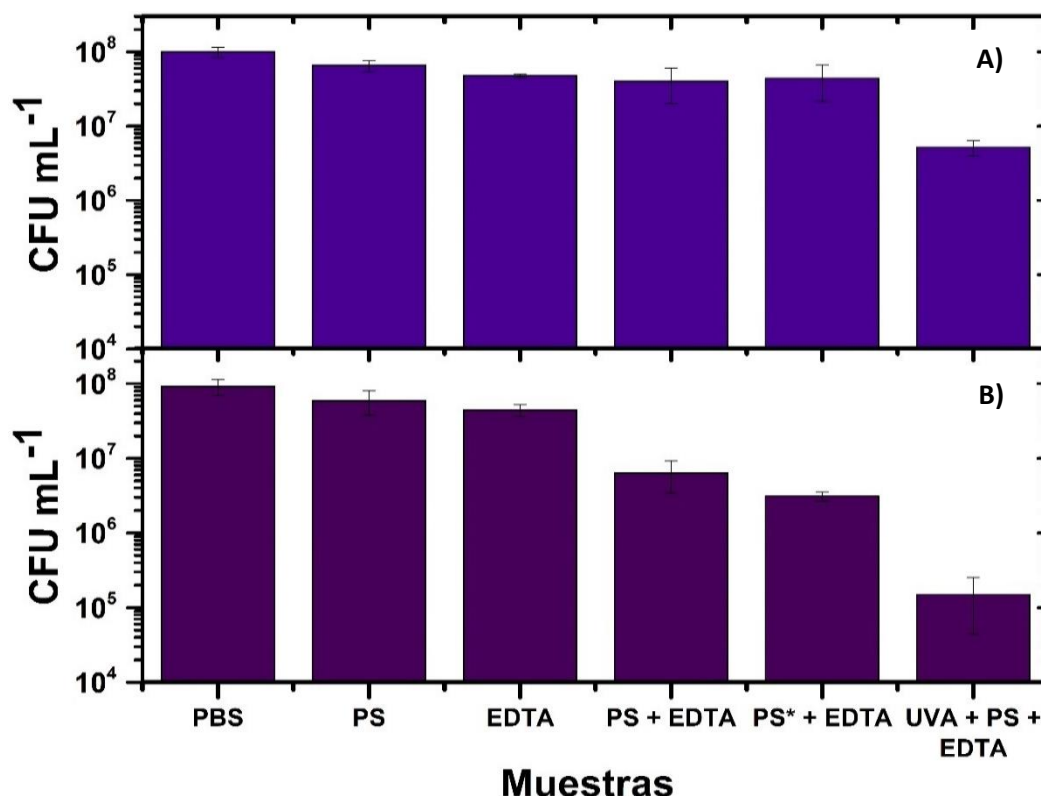


Figura 3.11. Fotoinactivación de *E. coli* con nanopartículas de feomelanina. A) 123  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; B) 166  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Ambas muestras fueron excitadas con radiación UV-A incubadas durante 1 h.

Tabla 8. Unidades formadoras de colonia (CFU) por mL para muestras control y expuestas a radiación UV-A, a diferentes concentraciones de feomelanina con EDTA (10 mM) y una fluencia de energía de 90  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

Muestras	CFU ( $\log_{10}$ ) mL <sup>-1</sup>	
	+EDTA	
	123 $\mu\text{g}/\text{mL}$	166 $\mu\text{g}/\text{mL}$
PBS	8.00 ± 0.07	7.96 ± 0.13
+PS	7.82 ± 0.07	7.77 ± 0.16
+EDTA	7.68 ± 0.02	7.65 ± 0.08
+PS + EDTA	7.61 ± 0.18	6.80 ± 0.22
+PS* + EDTA	7.64 ± 0.20	6.49 ± 0.06
UVA + PS + EDTA	6.72 ± 0.11	5.17 ± 0.36

A partir de los resultados anteriores, se fijó una sola concentración de nanopartículas de feomelanina:  $166 \mu\text{g}/\text{mL}$ , y se varió la fluencia de energía en  $180$  y  $270 \text{ J}/\text{cm}^2$ . En la figura 3.12 se observan los resultados obtenidos bajo estos parámetros. Se puede ver que a mayor fluencia de energía, hay una mayor disminución de CFU. En el caso de  $180 \text{ J}/\text{cm}^2$ , es de un orden de magnitud y de 1.5 órdenes de magnitud para la fluencia de  $270 \text{ J}/\text{cm}^2$ . Estos resultados se resumen en la tabla 9. Los valores obtenidos son importantes, ya que sin la necesidad de agregar EDTA, se está obteniendo el mismo orden de inactivación que cuando se agrega EDTA a fluencias de energía de  $90 \text{ J}/\text{cm}^2$  con radiación UV-A (figura 3.11). Una explicación a esto es que a lo largo del tiempo, se están generando muchas especies reactivas de oxígeno que poco a poco están dañando la membrana externa de la bacteria, aunado a que la radiación UV-A es más energética que la luz azul y es posible que los anillos aromáticos de la feomelanina respondan a esta longitud de onda.

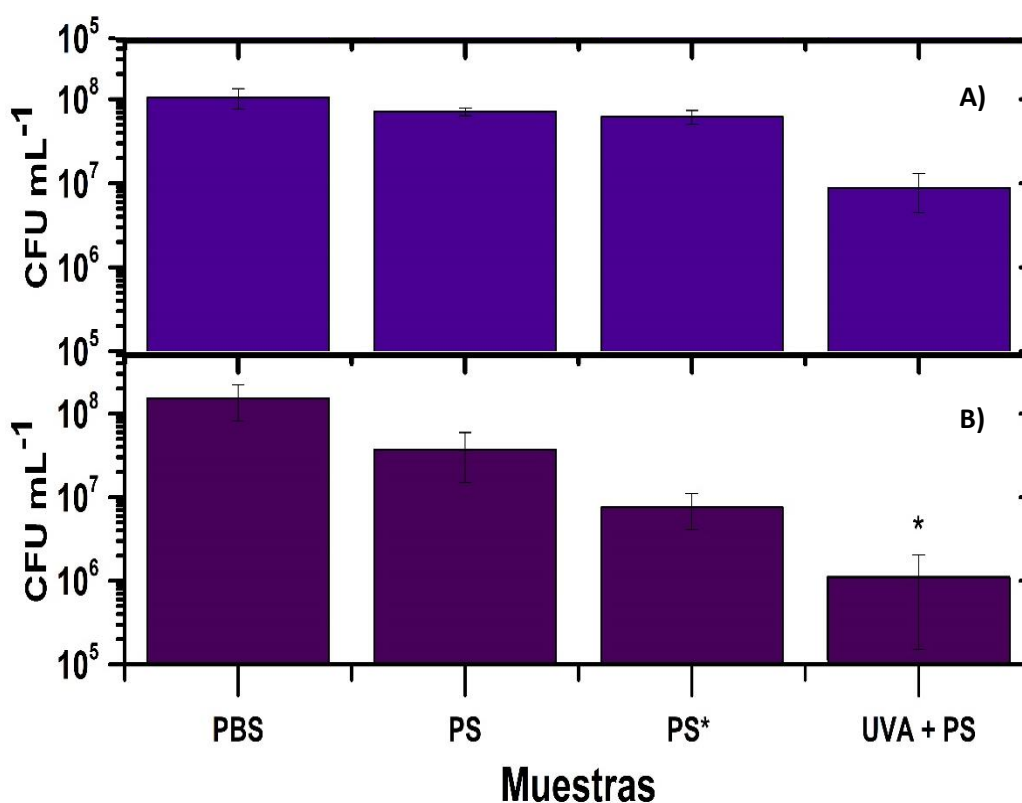


Figura 3.12. Fotoinactivación de *E. coli* con nanopartículas de feomelanina ( $166 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). A) fluencias de  $180 \text{ J}/\text{cm}^2$  y B)  $270 \text{ J}/\text{cm}^2$ . Ambos casos fueron excitados con radiación UV-A. \*P < 0.05



Tabla 9. Unidades formadoras de colonia (CFU) por mL para muestras control y expuestas a radiación UVA a diferentes fluencias de energía con una concentración fija (166  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Muestra	CFU ( $\log_{10}$ ) mL <sup>-1</sup>	
	PS	
	2 horas	3 horas
PBS	8.02 $\pm$ 0.12	8.18 $\pm$ 0.18
+PS	7.85 $\pm$ 0.05	7.57 $\pm$ 0.29
+PS*	7.79 $\pm$ 0.09	6.88 $\pm$ 0.30
UVA + PS	6.95 $\pm$ 0.23	6.04 $\pm$ 0.55

Finalmente, para mejorar la inactivación obtenida anteriormente, se fijó la concentración nuevamente en 166  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y agregando EDTA 10 mM. En la figura 3.13, se observan las fotografías de las distintas muestras control y expuestas a radiación UV-A en placas. En la gráfica de la figura 3.14 se observan los resultados obtenidos y para respaldar estos resultados los resumimos en la tabla 10. En ambos casos se mejoró el grado de inactivación. Con una fluencia de 180  $\text{J}/\text{cm}^2$ , se obtuvo aproximadamente 1.20 órdenes de magnitud de inactivación entre las muestras UV-A + PS + EDTA y PS + EDTA. Sin embargo, el resultado más importante de estos experimentos se obtuvo al utilizar la fluencia de energía de 270  $\text{J}/\text{cm}^2$ , con una disminución en el número de CFU de 3 órdenes de magnitud respecto al control en condiciones de oscuridad. Este grado de inactivación, entra en el rango para ser considerado con efecto antibacterial [64].

#### UV-A + PS + EDTA

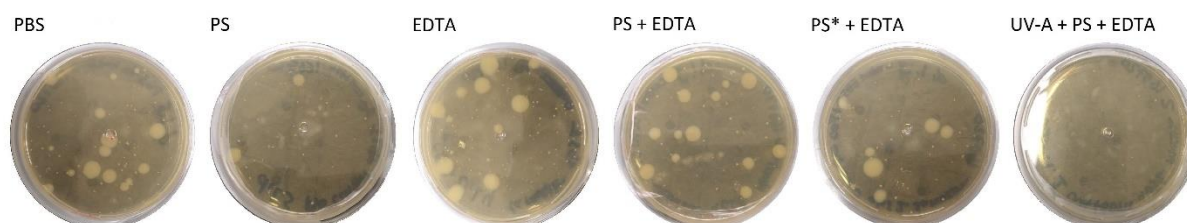


Figura 3.13. Imágenes de muestras de *E. coli* después de 3 horas de fotoinactivación con radiación UV-A en presencia de nanopartículas de feomelanina 166  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y EDTA (10 mM).

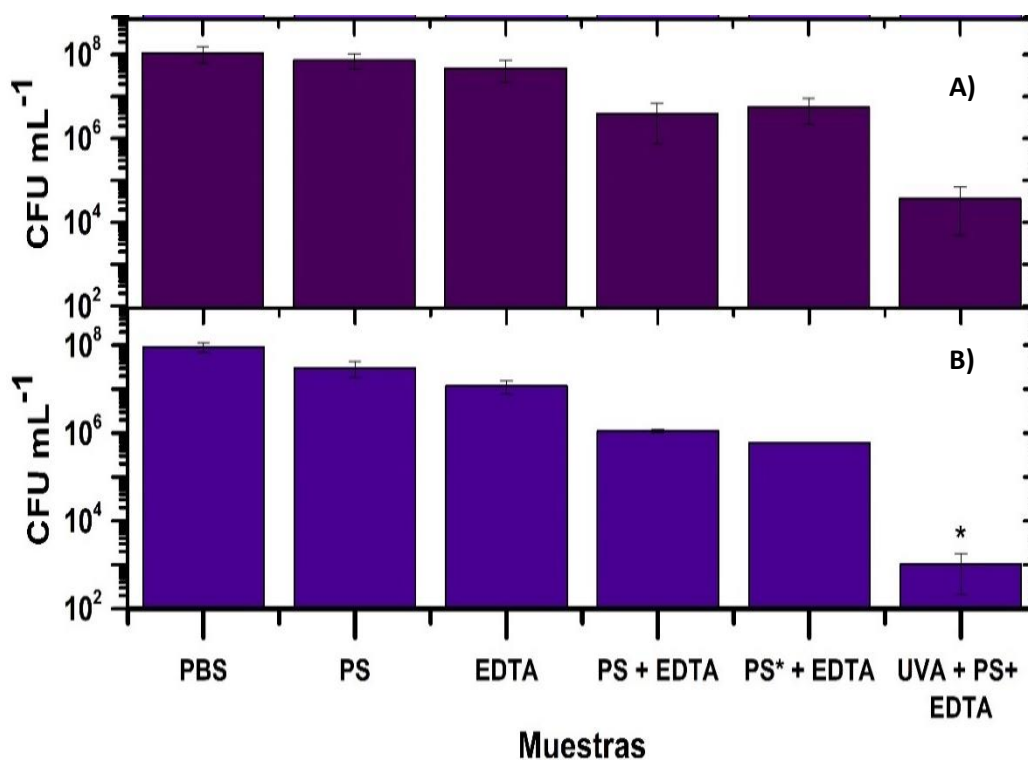


Figura 3.14. Fotoinactivación de *E. coli* con nanopartículas de feomelanina ( $166 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), EDTA (10 mM), y fluencias de A)  $180 \text{ J}/\text{cm}^2$  y B)  $270 \text{ J}/\text{cm}^2$ . Ambas excitadas con radiación UV-A. \*P < 0.05.

Tabla 10. Unidades formadoras de colonia (CFU) por mL para muestras control y expuestas a radiación UV-A a diferentes fluencias de energía con una concentración fija de  $166 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

Muestra	CFU ( $\log_{10}$ ) mL <sup>-1</sup>	
	+EDTA	
	2 horas	3 horas
PBS	$8.04 \pm 0.17$	$7.98 \pm 0.08$
+PS	$7.87 \pm 0.24$	$7.49 \pm 0.23$
+EDTA	$7.68 \pm 0.29$	$7.1 \pm 0.13$
UVA + EDTA	-	$6.17 \pm 0.22$
+PS + EDTA	$6.59 \pm 0.32$	$6.05 \pm 0.03$
+PS* + EDTA	$6.75 \pm 0.29$	$5.79 \pm 0.01$
UVA + PS + EDTA	$4.57 \pm 0.35$	$3.01 \pm 0.27$

### 3.4. Conclusión

En este trabajo de tesis se investigó la fotoinactivación de la bacteria *E. coli* usando nanopartículas de feomelanina. Como la feomelanina no está disponible comercialmente, sintetizamos las nanopartículas con una buena calidad mediante un proceso propuesto previamente por Pyo y colaboradores con algunas modificaciones pertinentes [8]. Varias técnicas de caracterización fueron realizadas para confirmar la naturaleza de las partículas sintetizadas. Se logró sintetizar y reproducir con ligeras modificaciones las nanopartículas de feomelanina reportadas por Pyo y colaboradores [8], con un tamaño esférico uniforme de  $200 \pm 17$  nm en promedio, dispersables en agua y PBS con un potencial zeta de -34.4 mV (reportado por primera vez). El efecto de la inactivación de las bacterias depende de la concentración del fotosensibilizador, la fluencia de energía, el tipo de radiación utilizado y el uso de EDTA. Se encontró que la fotoinactivación de *E. coli* con luz azul y feomelanina no es dependiente de la fluencia de energía y no se observó efecto significativo de inactivación sin la necesidad de agregar un agente quelante. En el caso de la radiación UV-A en presencia de feomelanina, se encontró que ésta si es dependiente de la fluencia de energía y se encontró que el EDTA no solo modifica la permeabilidad de la membrana celular, sino que también neutraliza la carga eléctrica de las nanopartículas, mejorando la fotoinactivación. Las inactivaciones más significativas fueron logradas con radiación UV-A a una concentración de  $166 \mu\text{g}/\text{mL}$  y una fluencia de energía de  $270 \text{ J}/\text{cm}^2$  . obteniendo una reducción de 3 log<sub>10</sub> en el número de CFU mediante la adición de EDTA, con respecto al control con EDTA y sin luz, y hasta 5 log<sub>10</sub> con respecto al control en PBS.

## 3.5 Perspectivas

1. Aumentar la potencia y/o el tiempo de exposición para explorar si existe mayor fotoinactivación.
2. Explorar el uso de otros mecanismos para potenciar la fotoinactivación de *E. coli* con feomelanina.
3. Explorar el uso de estas nanopartículas con otro tipo de bacterias (*Gram-positivas*).
4. Evaluar el rendimiento cuántico de las nanopartículas de feomelanina, el cual no está reportado.
5. Cuantificar las especies reactivas de oxígeno generadas durante la fotoinactivación.

# BIBLIOGRAFÍA

- [1] B. H. Mahmoud, C. L. Hexsel, I. H. Hamzavi, and H. W. Lim, "Effects of Visible Light on the Skin †," *Photochem. Photobiol.*, vol. 84, no. 2, pp. 450–462, 2008, doi: 10.1111.
- [2] N. Kashef, Y. Y. Huang, and M. R. Hamblin, "Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale," *Nanophotonics*, vol. 6, no. 5. Walter de Gruyter GmbH, pp. 853–879, Aug. 28, 2017. doi: 10.1515/nanoph-2016-0189.
- [3] F. Cieplik *et al.*, "Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't," *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 44, no. 5. Taylor and Francis Ltd, pp. 571–589, Sep. 03, 2018. doi: 10.1080/1040841X.2018.1467876.
- [4] S. Takeuchi *et al.*, "Melanin acts as a potent UVB photosensitizer to cause an atypical mode of cell death in murine skin," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, no. 42, pp. 15076–15081, 2004, [Online]. Available: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0403994101](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0403994101)
- [5] O. Chiarelli-Neto *et al.*, "Melanin photosensitization and the effect of visible light on epithelial cells," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 11, Nov. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0113266.
- [6] O. Chiarelli-Neto, C. Pavani, A. S. Ferreira, A. F. Uchoa, D. Severino, and M. S. Baptista, "Generation and suppression of singlet oxygen in hair by photosensitization of melanin," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 51, no. 6, pp. 1195–1202, Sep. 2011, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.013.
- [7] M. R. Chedekelt, S. K. Smith, P. W. Postf, A. Pokorat, and D. L. Vesselt, "Photodestruction of pheomelanin: Role of oxygen (superoxide/skin cancer)," *Biochemistry*, vol. 75, no. 11, pp. 5395–5399, 1978.
- [8] J. Pyo, K. Y. Ju, and J. K. Lee, "Artificial pheomelanin nanoparticles and their photo-sensitization properties," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 160, pp. 330–335, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.04.022.
- [9] S. Lembo *et al.*, "Light-independent pro-inflammatory and pro-oxidant effects of purified human hair melanins on keratinocyte cell cultures," *Experimental*

- Dermatology*, vol. 26, no. 7. Blackwell Publishing Ltd, pp. 592–594, Jul. 01, 2017. doi: 10.1111/exd.13122.
- [10] J. Moan, “Visible Light and UV Radiation,” in *Brune, D., Ed., Radiation at Home, Outdoors and in the Workplace*, Scandinavian Science Publisher, 2001.
- [11] E. J. Hall and A. J. Giaccia, *Radiobiology for the radiologist*, 7th ed. USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER business, 2012.
- [12] J. H. Espinoza and H. Mercado-Urbe, “Visible light neutralizes the effect produced by ultraviolet radiation in proteins,” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 167, pp. 15–19, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.11.023.
- [13] A. Juzeniene, P. Brekke, and A. Dahlback, “Solar ultraviolet radiation effects on biological systems Related content Solar radiation and human health,” *Physics in Medicine & Biology*, 1991.
- [14] V. Pérez Laguna, “Terapia fotodinámica antimicrobiana frente a agentes causantes de infecciones en piel y/o mucosas / Vanesa Pérez Laguna.” [Online]. Available: <http://zaguan.unizar.es>
- [15] Programa de Lugares Emblemáticos Internacionales de la Historia de la Química de la ACS, “Descubrimiento y desarrollo de la penicilina,” <http://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/historia-quimica/descubrimiento-desarrollo-penicilina.html>, Nov. 15, 2021.
- [16] N. Kashef and M. R. Hamblin, “Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation?,” *Drug Resistance Updates*, vol. 31, pp. 31–42, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.drug.2017.07.003.
- [17] F. Cieplik, L. Tabenski, W. Buchalla, and T. Maisch, “Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 5, no. AUG. Frontiers Research Foundation, 2014. doi: 10.3389/fmicb.2014.00405.
- [18] M. Tim, “Strategies to optimize photosensitizers for photodynamic inactivation of bacteria,” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 150, pp. 2–10, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.05.010.

- [19] A. Zuluaga Vélez, "Una mirada al estrés oxidativo en la célula artículo de revisión," 2012. doi: <https://doi.org/10.22517/25395203.7923>.
- [20] A. Blázquez Castro, "Modulación de la proliferación de queratinocitos humanos por especies reactivas de oxígeno generadas mediante tratamiento fotodinámico," 2010.
- [21] N. Cárdenas-Rodríguez and J. Pedraza-Chaverrí, "especies reactivas de oxígeno y antioxidantes," *Educación Química*, vol. 17, no. 2, pp. 164–173, 2006.
- [22] M. Madigan, K. Bender, Buckley Daniel, W. Sattley, and Stahl David, *Brook. Biología de los microorganismos*, 14th ed. Madrid, España: Pearson Educación, 2015.
- [23] S. D. manning, *Escherichia coli infections*, 1st ed. Chelsea House Publishers, 2005.
- [24] S. Finnegan and S. L. Percival, "EDTA: An Antimicrobial and Antibiofilm Agent for Use in Wound Care," *Advances in Wound Care*, vol. 4, no. 7, pp. 415–421, Jul. 2015, doi: [10.1089/wound.2014.0577](https://doi.org/10.1089/wound.2014.0577).
- [25] F. F. Sperandio, Y.-Y. Huang, and M. R. Hamblin, "Antimicrobial Photodynamic Therapy to Kill Gram-negative Bacteria," *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, no. 8, pp. 108–120, 2013.
- [26] T. R. Walsh and R. A. Howe, "The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*," *Annual Review of Microbiology*, vol. 56, pp. 657–675, 2002. doi: [10.1146/annurev.micro.56.012302.160806](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160806).
- [27] Y. Y. Huang, S. K. Sharma, R. Yin, T. Agrawal, L. Y. Chiang, and M. R. Hamblin, "Functionalized fullerenes in photodynamic therapy," *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 10, no. 9, American Scientific Publishers, pp. 1918–1936, 2014. doi: [10.1166/jbn.2014.1963](https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1963).
- [28] A. Almeida, M. A. Faustino, and J. P. Tomé, "Photodynamic inactivation of bacteria: Finding the effective targets," *Future Medicinal Chemistry*, vol. 7, no. 10, Future Science, pp. 1221–1224, Jul. 01, 2015. doi: [10.4155/fmc.15.59](https://doi.org/10.4155/fmc.15.59).
- [29] M. R. Hamblin and T. Hasan, "Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease?" *Photochemical and Photobiological Sciences*, vol. 3, no. 5, pp. 436–450, Apr. 2004, doi: [10.1039/b311900a](https://doi.org/10.1039/b311900a).

- [30] T. Maisch *et al.*, “The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria,” *PNAS*, vol. 104, no. 17, pp. 7223–7228, 2007, [Online]. Available: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0611328104](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0611328104)
- [31] E. Alves, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, A. Cunha, J. Tome, and A. Almeida, “An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation,” *Future Medicinal Chemistry*, vol. 6, no. 2, pp. 141–164, Feb. 2014. doi: 10.4155/fmc.13.211.
- [32] Educ.ar Sociedad del Estado, “Contra la oxidación,” <https://www.educ.ar/recursos/91079/contra-la-oxidacion>, Apr. 2015.
- [33] María Isabel Giacopini de Zambrano, “La peroxidación lipídica y enfermedades crónicas degenerativas,” [https://www.tribunadelinvestigador.com/ediciones/2016/1/art-18/La peroxidación lipídica y enfermedades crónicas degenerativas](https://www.tribunadelinvestigador.com/ediciones/2016/1/art-18/La-peroxidacion-lipidica-y-enfermedades-cronicas-degenerativas), 2016.
- [34] A. D. Ortega-Zambrano, “ANÁLISIS COMPARATIVO PARA LA FOTO-INACTIVACIÓN MICROBIANA EN TERAPIAS CONTINUAS Y PARCIALES,” 2019.
- [35] A. E. Díaz-Acosta and Membrillo-Hernández Jorge, “CONSECUENCIAS FISIOLÓGICAS DE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS POR CARBONILACIÓN EN DIVERSOS SISTEMAS BIOLÓGICOS,” *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 9, no. 1, pp. 34–44, 2006, [Online]. Available: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43290105>
- [36] M. D’Ischia *et al.*, “Melanins and melanogenesis: Methods, standards, protocols,” *Pigment Cell and Melanoma Research*, vol. 26, no. 5, pp. 616–633, Sep. 2013. doi: 10.1111/pcmr.12121.
- [37] S. Ito and K. Wakamatsu, “Review Chemistry of Mixed Melanogenesis-Pivotal Roles of Dopaquinone †”, doi: 10.1111.
- [38] S. Ito and K. Jimbow, “Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in hair and melanomas,” *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 80, no. 4, pp. 268–272, 1983, doi: 10.1111/1523-1747.ep12534616.
- [39] S. Ito and K. Wakamatsu, “Quantitative Analysis of Eumelanin and Pheomelanin in Humans, Mice, and Other Animals: A Comparative Review.”



- [40] K. Wakamatsu, S. Ito, and J. L. Rees, "The Usefulness of 4-Amino-3-hydroxyphenylalanine as a Specific Marker of Pheomelanin," *Pigment Cell Res.*, vol. 15, no. 3, pp. 225–232, 2002.
- [41] M. D'Ischia *et al.*, "Melanins and melanogenesis: Methods, standards, protocols," *Pigment Cell and Melanoma Research*, vol. 26, no. 5. pp. 616–633, Sep. 2013. doi: 10.1111/pcmr.12121.
- [42] S. Ito, "Optimization of Conditions for Preparing Synthetic Pheomelanin," *Pigment Cell Research*, vol. 2, no. 1, pp. 53–56, 1989.
- [43] F. Solano, "Melanins: Skin Pigments and Much More—Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes," *New Journal of Science*, vol. 2014, pp. 1–28, Mar. 2014, doi: 10.1155/2014/498276.
- [44] C. R. Robbins, *Chemical and Physical Behavior of Human Hair*, 5th ed. Alemania: Springer, Berlin, Heidelberg, 2012.
- [45] P. Meredith, B. J. Powell, J. Riesz, S. P. Nighswander-Rempel, M. R. Pederson, and E. G. Moore, "Towards structure-property-function relationships for eumelanin," *Soft Matter*, vol. 2, no. 1. pp. 37–44, 2006. doi: 10.1039/b511922g.
- [46] W. D. Bush *et al.*, "The surface oxidation potential of human neuromelanin reveals a spherical architecture with a pheomelanin core and a eumelanin surface," *PNAS*, vol. 103, no. 40, pp. 14785–14789, 2006, [Online]. Available: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0604010103](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0604010103)
- [47] S. S. Sajjan, O. Anjaneya, G. B. Kulkarni, A. S. Nayak, S. B. Mashetty, and T. B. Karegoudar, "Properties and functions of melanin pigment from *Klebsiella* sp. GSK," *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 41, no. 1, pp. 60–69, Mar. 2013, doi: 10.4014/kjmb.1210.10002.
- [48] Fujita Keisuke and Ito Shosuke, "Microanalysis of Eumelanin and Pheomelanin in Hair and Melanomas Chemical Degradation and Liquid Chromatography'," *Analytical Biochemistry*, vol. 144, no. 2, pp. 527–536, 1985.
- [49] C. Xin *et al.*, "Preparation of melanin from *Catharsius molossus* L. and preliminary study on its chemical structure," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 119, no. 4, pp. 446–454, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.09.009.

- [50] V. Stanic *et al.*, “The chemical fingerprint of hair melanosomes by infrared nano-spectroscopy,” *Nanoscale*, no. 10, pp. 14245–14253, 2018.
- [51] Piñón-Valderrama Claudia Ivonne, “Funcionalización Mediante Grupos Sulfónicos de Copolímeros en Bloque y Radiales de Poli (estireno-butadieno-estireno) SBS,” Nuevo León, México, 2013.
- [52] R. A. de Souza, N. M. Kamat, and V. S. Nadkarni, “Purification and characterisation of a sulphur rich melanin from edible mushroom *Termitomyces albuminosus* Heim,” *Mycology*, vol. 9, no. 4, pp. 296–306, Oct. 2018, doi: 10.1080/21501203.2018.1494060.
- [53] D. J. Kim, K. Y. Ju, and J. K. Lee, “The synthetic melanin nanoparticles having an excellent binding capacity of heavy metal ions,” *Bull Korean Chem Soc*, vol. 33, no. 11, pp. 3788–3792, Nov. 2012, doi: 10.5012/bkcs.2012.33.11.3788.
- [54] M. R. Vicensi *et al.*, “Phaeomelanin versus eumelanin as a chemical indicator of ultraviolet sensitivity in fair-skinned subjects,” *Melanoma Res.*, vol. 8, no. 1, 1998.
- [55] M. R. Chedekelt, S. K. Smith, P. W. Postf, A. Pokorat, and D. L. Vesselt, “Photodestruction of pheomelanin: Role of oxygen,” *Proc. Natl. Acad. Sci*, vol. 75, no. 11, pp. 5395–5399, 1978.
- [56] R. M. Haywood, M. Lee, and C. Andrady, “Comparable photoreactivity of hair melanosomes, eu- and pheomelanins at low concentrations: Low melanin a risk factor for UVA damage and melanoma?” *Photochemistry and Photobiology*, vol. 84, no. 3, pp. 572–581, May 2008, doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00343.x.
- [57] S. Ito, K. Wakamatsu, and T. Sarna, “Photodegradation of Eumelanin and Pheomelanin and Its Pathophysiological Implications,” *Photochemistry and Photobiology*, vol. 94, no. 3. Blackwell Publishing Inc., pp. 409–420, May 01, 2018. doi: 10.1111/php.12837.
- [58] Preuß A, Hackbarth, S. et al., Photoinactivation of *Escherichia coli* (SURE2) without intracellular uptake of the photosensitizer “(2013) vol. 94, no. 1, *Journal of Applied Microbiology.*, pp. 36-43, 2013.
- [59] Y.-C. Liu, S.-Y. Tu, and H.-Y. Lin, “Evaluation of the Practicality of Melanin as a Photodynamic-Inactivation Photosensitizer by Its Nanonization.”

- [60] S. George, M. R. Hamblin, and A. Kishen, "Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria," *Photochemical and Photobiological Sciences*, vol. 8, no. 6, pp. 788–795, 2009, doi: 10.1039/b809624d.
- [61] F. Solano, "Photoprotection versus photodamage: updating an old but still unsolved controversy about melanin," *Polymer International*, vol. 65, no. 11, pp. 1276–1287, Nov. 2016, doi: 10.1002/pi.51117.
- [62] E. Kvam and R. M. Tyrrell, "The role of melanin in the induction of oxidative DNA base damage by ultraviolet A irradiation of DNA or melanoma cells," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 113, no. 2, pp. 209–213, 1999, doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00653.x.
- [63] B. F. Godley, F. A. Shamsi, F. Q. Liang, S. G. Jarrett, S. Davies, and M. Boulton, "Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 22, pp. 21061–21066, Jun. 2005, doi: 10.1074/jbc.M502194200.
- [64] S. Winter, N. Tortik, A. Kubin, B. Krammer, and K. Plaetzer, "Back to the roots: Photodynamic inactivation of bacteria based on water-soluble curcumin bound to polyvinylpyrrolidone as a photosensitizer," *Photochemical and Photobiological Sciences*, vol. 12, no. 10, pp. 1795–1802, 2013, doi: 10.1039/c3pp50095k.
- [65] T. Maisch *et al.*, "Photodynamic inactivation of multi-resistant bacteria (PIB) - A new approach to treat superficial infections in the 21st century," *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology*, vol. 9, no. 5. Wiley-VCH Verlag, pp. 360–366, 2011. doi: 10.1111/j.1610-0387.2010.07577.x.
- [66] D. Hu, M. Crist, X. Duan, and F. S. Gimble, "Mapping of a DNA binding region of the PI-SceI homing endonuclease by affinity cleavage and alanine-scanning mutagenesis," *Biochemistry*, vol. 38, no. 39, pp. 12621–12628, Sep. 1999, doi: 10.1021/bi991192h.