



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE  
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO  
POLITÉCNICO NACIONAL  
Unidad Monterrey**

**Foto-inactivación de *Escherichia coli* potenciada con  
nanoestructuras de oxígeno**

Tesis que presenta

**Mireya Estefany Márquez López**

Para obtener el Grado de

**Maestra en Ciencias**

En la Especialidad de

**Ingeniería y Física Biomédicas**

Directora de Tesis:

**Dra. Hilda Josefina Mercado Uribe**

## Agradecimientos

En primer lugar, al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada durante el período de estudios de esta maestría.

A mi asesora de tesis, la Dra. Hilda Josefina Mercado Uribe, por darme su apoyo, confianza, asesoría y conocimiento para el desarrollo y termino de este proyecto.

A mis sinodales:

El Dr. Jesús Guadalupe Rodríguez González por sus comentarios, observaciones y consejos.

El Dr. Daniel Paúlo Sánchez Herrera por sus comentarios, correcciones y recomendaciones

Al Dr. Jesús Carlos Ruiz Suárez por sus observaciones y su apoyo durante la experimentación con el aparato de nanoestructuras, así como por permitirme trabajar en su laboratorio.

A Alberto Daniel Ortega Zambrano, por ser un gran amigo y compañero, por asesorarme y apoyarme durante la primera etapa de experimentación, así como por todo el conocimiento compartido.

A Angela por su paciencia, amabilidad y apoyo durante mi aprendizaje para elaborar nanoestructuras.

A mis amigos y compañeros de la generación, por hacer que mi estancia durante la maestría estuviera llena de risas y aprendizaje.

A Bryant por ser un gran amigo y compañero, por apoyarme, escucharme y hacerme reír en todo momento.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) Unidad Monterrey y a todos los Doctores que contribuyeron a mi formación académica.

Agradezco a mi familia, a mis papas Elena López y Juan Rodolfo Márquez, por todo su amor, apoyo, por su confianza en mí, por ser un soporte y motivación en mi vida. Por siempre animarme, respetar y apoyar mis decisiones. A mis hermanos, Christopher y Rodolfo por su amor, apoyo y aliento. A mi sobrina Cataleya, por ser mi inspiración para continuar.

# Índice

Índice de figuras	V
Índice de tablas	VII
Resumen	VIII
Abstract	IX
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes . . . . .	2
1.1.1. Fotoinactivación . . . . .	2
1.1.2. Nanoblobs . . . . .	4
1.2. Planteamiento del problema . . . . .	6
1.3. Justificación . . . . .	6
1.4. Hipótesis . . . . .	7
1.5. Objetivos . . . . .	7
1.5.1. Objetivo general . . . . .	7
1.5.2. Objetivos específicos . . . . .	7
<b>2. Fundamentos teóricos</b>	<b>8</b>
2.1. Bacteria <i>Escherichia coli</i> . . . . .	8
2.1.1. Estructura celular . . . . .	8
2.1.2. Metabolismo y crecimiento . . . . .	12
2.1.3. Ciclo celular . . . . .	13
2.1.4. Mecanismo de resistencia antibiótica . . . . .	15
2.1.5. Mecanismos de resistencia en <i>E.coli</i> . . . . .	17
2.1.6. <i>E.coli</i> K12 MG-1655 . . . . .	18
2.2. Inactivación fotodinámica . . . . .	20
2.2.1. Fotosensibilizadores . . . . .	21
2.2.2. Azul de metileno . . . . .	22
2.2.3. Fuente emisora de luz . . . . .	23
2.2.4. Láseres . . . . .	24
2.2.5. Oxígeno . . . . .	24

2.2.6. Oxígeno Singlete . . . . .	27
2.3. Clatratos . . . . .	27
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>30</b>
3.1. Preparación de medios de cultivo y buffer . . . . .	30
3.1.1. Preparación de medio LB . . . . .	30
3.1.2. Preparación de medio sólido: agar LB . . . . .	30
3.1.3. Preparación de buffer de fosfatos, PBS . . . . .	30
3.2. Preparación de muestras . . . . .	30
3.2.1. Preparación de azul de metileno . . . . .	30
3.2.2. Preparación de nanoestructuras de oxígeno . . . . .	31
3.2.3. Preparación de muestras de <i>E. coli</i> . . . . .	31
3.3. Fotoinactivación . . . . .	32
3.3.1. Preparación de grupos de estudio . . . . .	32
3.3.2. Irradiación de muestras . . . . .	34
3.3.3. Cultivo de la bacteria . . . . .	35
3.3.4. Conteo de Unidades Formadoras de Colonia . . . . .	36
3.4. Medición de oxígeno disuelto . . . . .	37
3.4.1. Preparación de grupos de estudio . . . . .	37
3.5. Medición oxígeno singlete . . . . .	37
3.5.1. Preparación de azul de metileno . . . . .	38
3.5.2. Preparación de grupos de estudio . . . . .	38
3.5.3. Irradiación de muestras . . . . .	38
3.6. Análisis Estadístico . . . . .	40
<b>4. Resultados</b>	<b>41</b>
4.1. Fotoinactivación de <i>E. coli</i> sin nanoestructuras . . . . .	41
4.2. Oxígeno singlete en muestras de azul de metileno y luz roja . . . . .	43
4.3. Oxígeno disuelto . . . . .	45
4.4. Oxígeno singlete con nanoestructuras de oxígeno . . . . .	46
4.5. Fotoinactivación de <i>E. coli</i> con nanoestructuras . . . . .	47
<b>5. Discusión</b>	<b>50</b>

<b>6. Conclusiones</b>	<b>53</b>
<b>7. Perspectivas</b>	<b>54</b>
<b>Referencias</b>	<b>55</b>

## Índice de figuras

1.	Esquema del aparato para generar nanoestructuras usando gases nobles	4
2.	Diagrama de la estructura de la bacteria <i>Escherichia coli</i> .	9
3.	Pared celular de bacterias gram negativas	10
4.	Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> en medio nutritivo de <i>E. coli</i>	12
5.	Ciclo celular de bacterias	14
6.	Mecanismos de resistencia antimicrobiana.	15
7.	Transferencia horizontal de genes	17
8.	Imagen SEM de <i>E. coli</i> MG1655.	19
9.	Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> MG1655.	19
10.	Proceso tipo I y tipo II de la inactivación fotodinámica.	20
11.	Molécula de azul de metileno.	22
12.	Espectro de absorción del azul de metileno.	23
13.	Espectro electromagnético.	24
14.	Diagrama de orbital molecular de O <sub>2</sub>	25
15.	Configuración electrónica del oxígeno molecular y el oxígeno singlete	27
16.	Estructura cristalina del hidrato de metano.	28
17.	Esquema de estructuras de blobs.	29
18.	Pasos para la regularización en los tiempos de generación de la bacteria <i>E. coli</i> .	32
19.	Ejemplo de posiciones en la placa de 96 pozos para grupos de estudio para la fotoinactivación.	33
20.	Diagrama de arreglo optoelectrónico para la fotoinactivación.	34
21.	Irradiación del grupo experimental.	35
22.	Diluciones seriadas.	36
23.	Conteo de CFU.	36
24.	Esquema del arreglo optoelectrónico para la detección de oxígeno singlet	39
25.	Arreglo optoelectrónico irradiando una muestra.	39
26.	Fotoinactivación de la bacteria <i>E. coli</i> usando diferentes concentraciones de MB.	42
27.	Fotoinactivación de la bacteria con MB a 10 $\mu$ M.	43

28.	Potencia medida cuando los fotones de 1270 nm inciden en el detector para tres concentraciones de fotosensibilizador. . . . .	44
29.	Potencia medida con MB a 25 mM por 5 min. . . . .	45
30.	Potencia medida con MB a 25 mM y nanoestructuras irradiadas por 5 min. . . . .	47
31.	Fotoinactivación de la bacteria <i>E. coli</i> con nanoestructuras de oxígeno.	48
32.	Fotoinactivación de la bacteria <i>E. coli</i> sin y con nanoestructuras de oxígeno.	49

## Índice de tablas

1.	Principales mecanismos de resistencia en <i>E. coli</i> . . . . .	18
2.	Especies reactivas de oxígeno . . . . .	26

## Resumen

En este trabajo investigamos el efecto de la adición de nanoestructuras de oxígeno, elaboradas con un aparato diseñado en el CINVESTAV Unidad Monterrey, con el propósito de potenciar la generación de oxígeno singlete y la consecuente fotoinactivación de la bacteria *E. coli*. La fotoinactivación requiere de tres elementos esenciales para que se lleve a cabo: luz adecuada, un fotosensibilizador y el oxígeno molecular del medio. El fotosensibilizador usado fue el azul de metileno, y la cepa de *E. coli* fue la K12-MG1655. Los resultados obtenidos indican que la adición de las nanoestructuras en muestras con azul de metileno, efectivamente, propician un aumento en la producción de oxígeno singlete. Este hecho causó una mayor reducción de Unidades Formadoras de Colonias con respecto a la fotoinactivación sin nanoestructuras. Nuestro trabajo contribuye en el estudio de otro de los elementos clave en la fotoinactivación, debido a que los grupos de investigación se han concentrado en mejorar el método mejorando el fotosensibilizador, o sintetizando nuevos. Sin embargo, es la primera vez que este elemento (el oxígeno molecular) es considerado para aumentar para la fotoinactivación.

## Abstract

In this work, we investigate the effect of the addition of oxygen nanostructures made with a device designed in CINVESTAV Monterrey. The aim is to enhance the generation of singlet oxygen and the consequently, the photoinactivation of *E. coli* bacterium (K12-MG1655). Photoinactivation requires three essential elements: light, a photosensitizer and molecular oxygen. We use methylene blue as photosensitizer and red light. Our findings indicate that the addition of oxygen nanostructures in *E. coli* cultures with methylene blue, results in an increase in the generation of singlet oxygen. This in turn, leads to a reduction of Colony Forming Units with respect to photoinactivation without nanostructures. Our work contributes to the study of another important element in photoinactivation. Until now, the research groups have improved the method by modifying the photosensitizer and synthesizing new ones. The first time that molecular oxygen is considered to increase the photoinactivation.

# 1. Introducción

La resistencia antimicrobiana (RAM) se define como la capacidad que posee un microorganismo para resistir los efectos de los antibióticos. Surge cuando las bacterias, los virus, los hongos y los parásitos cambian a lo largo del tiempo, generalmente por condiciones genéticas, o bien, puede ser adquirida por transferencia horizontal [1]. Esta resistencia ocasiona que los microorganismos sobrevivan al tratamiento con los medicamentos, dificultando el tratamiento de infecciones y con ello incrementando el riesgo de propagación de enfermedades, el desarrollo de enfermedades más graves o llevando a la muerte [2].

La RAM representa una gran amenaza para la salud humana a nivel global y algunas de sus causas principales son el uso excesivo e indebido de los antimicrobianos, la falta de acceso a agua limpia, medidas deficientes de prevención y control de enfermedades infecciosas, y las infecciones que ocurren en los centros de salud [3].

En el año 2019 fallecieron 5 millones de personas en todo el mundo por causas relacionadas con la resistencia bacteriana a los antimicrobianos [4]. Un estudio publicado en 2016 [3] reporta que 10 millones de personas podrían morir anualmente a causa de la RAM para el año 2050.

Por lo anterior, es urgente investigar e implementar métodos alternativos que sean capaces de inactivar patógenos y que a su vez tengan menos potencial de desarrollar nuevas resistencias. Una de estas alternativas es la inactivación fotodinámica [5, 6]. Este método consiste en la combinación de una fuente de luz de longitud de onda adecuada que estimula un agente fotosensibilizante en un ambiente que contiene oxígeno molecular. El efecto mortífero se basa en el principio de que la luz visible activa la molécula fotosensibilizadora, la cual interactúa con el oxígeno molecular, ocasionando la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), estas especies inducen daños y destrucción a los microorganismos [7]. Una de las ROS más citotóxicas generada en el proceso de la fotoinactivación es el oxígeno singlete.

Desde el siglo pasado, grupos de investigación han observado el efecto letal de la fotoinactivación en microorganismos. En 1900 Raab informó que el uso del colorante naranja de acridina en combinación con luz visible era capaz de destruir organismos vivos como el *Paramecio caudatum* [8]. Ya en la década de los 60's, Lipson descubrió que un derivado de hematoporfirina podía ser usado como fotosensibilizador para des-

truir células tumorales. Los grupos de investigación actuales han enfocado su atención en mejorar el efecto de la fotoinactivación, sintetizando nuevas moléculas fotosensibilizadoras, o añadiendo moléculas nuevas a las ya existentes [9]. Sin embargo, no se ha explorado otro de los elementos principales en la fotoinactivación, el oxígeno molecular. Un aumento en la concentración de este podría desencadenar un incremento en la generación de oxígeno singlete, ya que se ha descrito que su generación depende de dos factores, del rendimiento cuántico del fotosensibilizador y de la cantidad de oxígeno molecular presente en el ambiente. Un aumento en la producción de oxígeno singlete se vería reflejado en una mayor destrucción de microorganismos.

## **1.1. Antecedentes**

### **1.1.1. Fotoinactivación**

El descubrimiento de los agentes antimicrobianos activados por la luz ya había sido reportado por el año 1900, pero solo en investigaciones más recientes se ha desarrollado investigación con el objetivo de colaborar en el conocimiento de procedimientos fotodinámicos como medidas alternativas en el tratamiento de microorganismos resistentes a antimicrobianos. Esta técnica causa la muerte celular mediante el daño oxidativo irreversible ocasionado por las especies reactivas de oxígeno que son producidas por la interacción entre un fotosensibilizador, oxígeno en el medio y luz. Este método se ha usado para la inactivación de diferentes microorganismos, como bacterias, virus, mohos, protozoos y hasta en células humanas [10, 11, 12]. Una de las ventajas que posee, es ser un proceso que no tiene una diana celular específica, razón que la hace eficaz en la oxidación de biomoléculas con la consiguiente destrucción de varios tipos celulares. Otra ventaja es que funciona en un tiempo muy corto y en un espacio limitado, inactivando potencialmente solo los microorganismos que están presentes en el sitio de tratamiento [13]

Dado que la fotoinactivación tiene la propiedad de ser multiobjetivo, lo que conlleva a una baja probabilidad de desencadenar el desarrollo de resistencia en microorganismos, se ha probado en diversas áreas de investigación como tratamiento alternativo a los métodos actuales para controlar plagas de insectos, la calidad del agua y de los alimentos, desinfección y esterilización de materiales y superficies (en el contexto industrial hospitalario) [10, 13]. Una aplicación potencial de la inactivación fotodinámica

para destruir microorganismos tiene un enfoque característico en el área ambiental, por ejemplo, se ha usado para destruir organismos utilizando luz blanca [10]. Por otra parte, se han hecho estudios *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo* de una amplia gama de especies microbianas para la inactivación desde 2012, dentro de los que se incluyen bacterias Gram-positivas y Gram-negativas [11].

La inactivación fotodinámica (IF) consta de tres importantes elementos: el fotosensibilizador, la luz y el oxígeno presente en el medio. Existen estudios que reportan estrategias para superar las limitaciones que esta técnica puede tener y con eso mejorar el efecto de la fotoinactivación [9]. En los últimos años, ha aumentado la síntesis de nuevos compuestos para la inactivación fotodinámica, logrando en muchos de ellos buenos resultados en la inactivación. Se han probado con éxito varias clases de fotosensibilizadores [11]. Además hay estudios que indican que las modificaciones de los fotosensibilizadores utilizando nanoportadores pueden mejorar la fotoinactivación, debido a que aumentan la estabilidad de estos [9].

Recientemente, nuestro grupo de investigación realizó un estudio en el que se evaluó el efecto de la fotoinactivación de *E. coli* utilizando cinco fotosensibilizadores diferentes en igualdad del número de fotones. Se irradiaron a las bacterias con luz visible y radiación UV-A en conjunto con diferentes fotosensibilizadores, entre ellos, azul de metileno [14]. Los autores mantuvieron el mismo número de fotones, es decir, igualaron la tasa de fotones absorbidos cada segundo por cada uno de los fotosensibilizadores. Ellos compararon la eficiencia de cada uno de éstos y encontraron que el azul de metileno fue el fotosensibilizador que mostró el índice de fotoinactivación más alto. Los resultados se asociaron a las características que posee este fotosensibilizador. Algunas de éstas son su carga catiónica y su hidrofiliidad.

Por otro lado, R. Khaengraeng y R.H. Reed, en un artículo publicado en 2005 se inclinaron por estudiar la influencia del oxígeno antes, durante y después de la fotoinactivación [15]. Ellos usaron la bacteria *E. coli* NCTC8912 en fase estacionaria y estudiaron el efecto que tiene el oxígeno antes, durante y después de la fotoinactivación en condiciones hipoxigenadas, oxigenadas e hiperoxigenadas. Los autores obtuvieron como conclusión, que el oxígeno tiene una gran influencia en el conteo de bacterias tras realizar la fotoinactivación usando UVA y luz solar.

### 1.1.2. Nanoblobs

Recientemente, el grupo de investigación del Dr. Carlos Ruiz del CINVESTAV Unidad Monterrey, diseñó un aparato que es capaz de disolver gases en agua usando altas presiones [16]. Demostraron de forma experimental y por simulaciones de dinámica molecular, que los gases xenon y kriptón forman dominios de agua y gases nanoestructurados. El aparato hace uso de la ley de Henry, que se refiere al efecto de la presión de un gas disuelto en un líquido. El aparato tiene la particularidad de disolver un gas en un medio líquido por el aumento de presión. De manera matemática, la ley de Henry se puede expresar como:

$$C_{gas} = kP_{gas}, \quad (1)$$

donde  $C_{gas}$  es la concentración del gas disuelto,  $k$  es la constante de Henry para un gas específico y  $P_{gas}$  es la presión del gas.

Para lograr disolver un gas en un líquido, los autores diseñaron el aparato que se muestra en la Figura 1, en donde se pueden observar las partes más importantes.

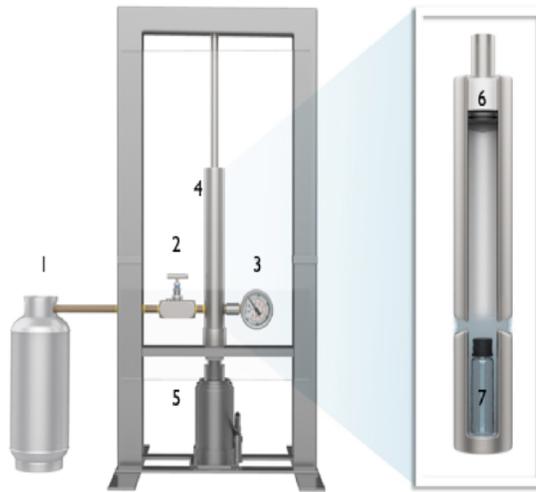


Figura 1: .

Esquema del aparato para generar nanoestructuras usando gases nobles. Partes más importantes, 1: cilindro de gas, 2: válvula de aguja, 3. manómetro, 4: tubo cilíndrico de acero inoxidable, 5: gato hidráulico, 6: tapón de goma, 7: vial de vidrio de 2.3 mL (tomado de [16]).

Ellos introdujeron un vial con 2.3 mL de agua Milli-Q al tubo cilíndrico, posteriormente usaron la válvula de aguja para ingresar el gas al tubo (xenon o kriptón) con una presión inicial de 15 bares. Se presurizó el aparato hasta 620 bares. Los autores en-

tonces encontraron la formación de estructuras conocidas como blobs, concebidas como precursores de los clatratos de hidratos (para más detalles, ver [16]).

Gracias al diseño del aparato, éste puede usarse para disolver otros gases, como el oxígeno molecular. Siguiendo el protocolo que establecieron para obtener nanoblobs de xenón y kriptón, es posible, usando oxígeno, obtener nanoblobs, nanoestructuras de oxígeno que pueden ser aprovechadas en la fotoactivación.

## 1.2. Planteamiento del problema

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en 2050 la resistencia antimicrobiana ocasionará 10 millones de muertes al año. En el 2019 fallecieron 5 millones de personas por causas relacionadas con la resistencia bacteriana a los antimicrobianos. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas (ONU) la RAM es una de las principales amenazas de salud, debido a que pone en riesgo el desarrollo humano y ocasiona profundas implicaciones en diversos sectores como el económico, la alimentación, el turismo y la migración, por mencionar algunos. En el 2014 la OMS creó un plan de acción global en el que introduce la problemática de la resistencia antimicrobiana y menciona cinco objetivos estratégicos, entre los que destaca el conocimiento sobre el uso correcto de los antimicrobianos [17]. Además, hace un llamado a las naciones para crear planes de acción que puedan colaborar en la lucha contra la resistencia antimicrobiana. En esta lucha, cada granito de arena cuenta, pero debido a las limitaciones que tiene muchos países para implementar un plan de acción contra esta problemática, es urgente encontrar nuevas alternativas que sean capaces de inactivar patógenos y que tengan una probabilidad muy baja de causar resistencia en ellos.

En este proyecto nuestra aportación será el estudio de la inactivación fotodinámica con nanoestructuras de oxígeno como un agente potenciador en la inactivación de la bacteria *Escherichia coli*.

## 1.3. Justificación

La inactivación fotodinámica ha sido estudiada para aniquilar patógenos. A lo largo de los años se ha evaluado el efecto de la inactivación explorando nuevos fotosensibilizadores o añadiendo algún agente que permita que el fotosensibilizador se interne en el patógeno ocasionándole un mayor daño. Con el objetivo de colaborar en el desarrollo de este tratamiento alternativo contra los agentes patógenos, en este trabajo se propone que el aumento de oxígeno molecular puede potenciar la fotoinactivación de patógenos.

## **1.4. Hipótesis**

El uso de nanoestructuras de oxígeno en medios de cultivo de *Escherichia coli* con azul de metileno, potencia la fotoinactivación de la bacteria debido a un aumento de oxígeno singlete.

## **1.5. Objetivos**

### **1.5.1. Objetivo general**

Estudiar el efecto de la adición de nanoestructuras de oxígeno en la fotoinactivación de *E. coli*

### **1.5.2. Objetivos específicos**

1. Realizar la fotoinactivación de *E. coli* usando azul de metileno y luz roja.
2. Detectar la generación de oxígeno singlete en muestras con azul de metileno y luz roja.
3. Evaluar la generación de oxígeno singlete agregando nanoestructuras de oxígeno para verificar una mayor generación de oxígeno singlete.
4. Estudiar el efecto de la adición de nanoestructuras de oxígeno en la fotoinactivación de *E. coli*.

## 2. Fundamentos teóricos

### 2.1. Bacteria *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (*E. coli*) fue identificada por primera vez por el pediatra alemán Theodor Escherich en 1885, por medio de estudios de la flora intestinal de bebés [18]. Es la forma de vida celular mejor estudiada y sirve como uno de los principales sistemas modelo en biología [19]. Se considera un organismo de flora normal, y se establece en el intestino delgado del ser humano a las pocas horas después de su nacimiento.

*E. coli* es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa de la familia *Enterobacteriaceae*, usualmente mide entre 2.0 - 6.0  $\mu\text{m}$  de longitud y 1.1- 1.5  $\mu\text{m}$  de ancho. No forma esporas, y generalmente su movilidad la adquieren por la acción de los flagelos [18]. Se asocia con una variedad de infecciones humanas, como la infección de las vías urinarias, y existen cepas que pueden provocar afecciones produciendo diferentes cuadros clínicos, especialmente, diarrea. Las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC), y adherencia difusa (DAEC) [20].

#### 2.1.1. Estructura celular

Al ser una bacteria Gram negativa, *E. coli* tienen una membrana plasmática que define la célula y una pared celular que la protege. Muchas células de *E. coli* están encapsuladas y estas cápsulas están compuestas de polisacáridos ácidos. *E. coli* presenta fimbrias de estructura y especificidad antigénica variables. A continuación se mencionan las principales estructuras y sus funciones (ver Figura 2).

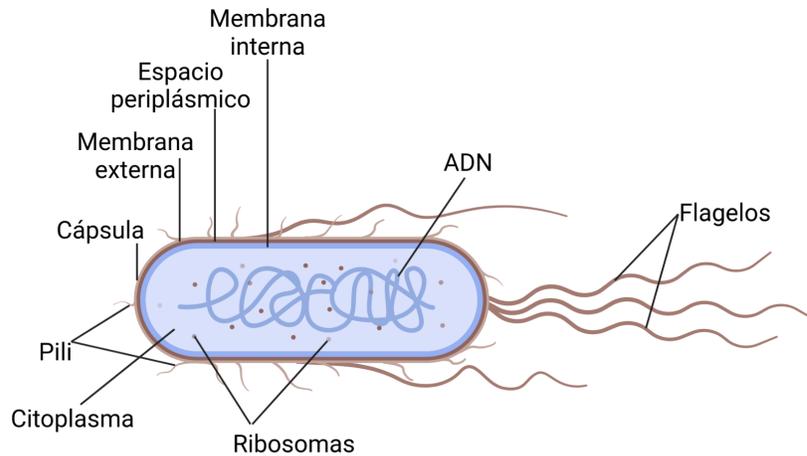


Figura 2: Diagrama de la estructura de la bacteria *Escherichia coli*.

### Membrana externa

La membrana externa de *E. coli*, es la membrana típica de las bacterias Gram negativas, consta de una bicapa lipídica compuesta en su mayor parte por fosfolípidos en la parte interna y lipopolisacáridos (LPS) en la parte externa. Hay varios tipos de proteínas de membrana. Una de ellas es la lipoproteína mureína y existen  $7 \times 10^5$  copias por célula. Las principales proteínas de membrana externa incluyen las proteínas formadoras de poros, que reciben el nombre de porinas y están presentes aproximadamente 105 copias por célula. El diámetro de los poros es de 1.16 nm [19].

### Espacio periplásmico y pared celular

El espacio periplásmico es el espacio que existe entre la membrana interna y la membrana externa y constituye el 20-40% del volumen de la célula (Figura 3). Contiene más de 60 proteínas conocidas, entre éstas se incluyen proteínas de unión a aminoácidos, azúcares, vitaminas e iones, además enzimas degradantes y enzimas antibióticas desintoxicantes. Hay evidencia que sugiere que el contenido del espacio periplásmico forma un gel [19].

La pared celular de estas bacterias está formada por dos capas: una capa delgada de peptidoglicano, y una gruesa membrana externa. La capa de peptidoglicano provee rigidez y da forma a las células. Está anclado a la membrana externa en unos  $4 \times 10^5$  sitios

mediante enlaces covalentes a la lipoproteínas principal de la membrana y enlaces no covalentes a las porinas [19]. La membrana externa lleva a cabo funciones particulares de protección. Previene la entrada de moléculas nocivas para las bacterias, por ejemplo, los antibióticos [21]. Esta membrana externa constituye la barrera funcional y física entre el interior y el exterior celular [22].

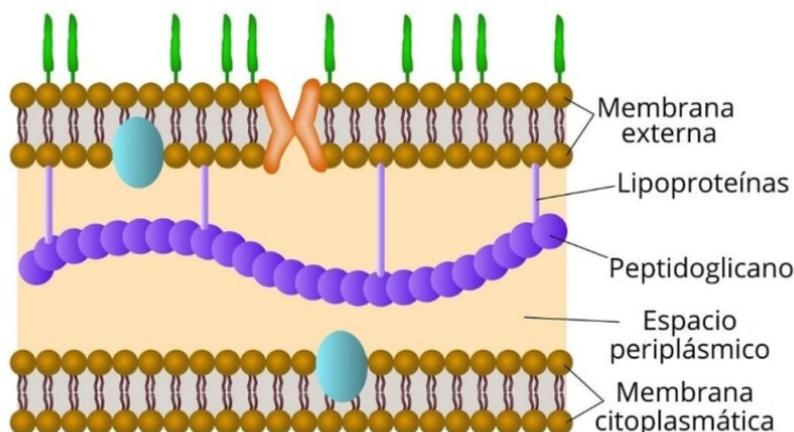


Figura 3: Pared celular de bacterias gram negativas [21].

### Membrana citoplasmática

La membrana citoplasmática de *E. coli* está compuesta por 200 proteínas distintas y cuatro tipos de fosfolípidos. Las proteínas constituyen el 70% del peso de la estructura. Esta membrana es el sitio de síntesis de adenosín trifosfato (ATP) y contiene más de 20 proteínas involucradas en diferentes procesos como la biosíntesis de peptidoglicanos, el alargamiento de la pared celular y la división celular [19].

### Citoplasma

La mayoría de las reacciones bioquímicas necesarias para el crecimiento de la bacteria ocurren en el citoplasma. Estas se encuentran divididas con respecto al combustible metabólico, biosíntesis de bloques de construcción, polimerización en macromoléculas y el ensamblaje de la estructura celular. En *E. coli* gran parte del espacio citoplasmático está ocupado por ribosomas [19].

## **Fimbrias (pili)**

Las cepas de *E. coli* tienen una o dos clases de pilis, las comunes y las conjugativas. Presentan especificidad antigénica variable y al ser hidrofóbicas, proporcionan propiedades específicas de adhesión del huésped o del órgano. La presencia de las pilis comunes permite a los microorganismos colonizar al huésped uniéndose a células epiteliales. Mientras que las pilis conjugativas permiten que las bacterias donante y receptora se pongan en contacto, para permitir la transferencia de ADN durante el proceso de la conjugación [19].

## **Flagelos**

La bacteria *E. coli*, usualmente posee entre 5-10 flagelos por célula, y le otorgan la motilidad a las células. Están situados al azar alrededor de la superficie de la célula (flagelación peritrichous) y suelen medir entre 5 y 10  $\mu\text{m}$  de largo. Están compuestos por un filamento largo, un gancho y un cuerpo basal. El componente principal de los flagelos de *E. coli* es una proteína que se conoce como flagelina, aproximadamente  $2 \times 10^4$  subunidades de esta proteína se ensamblan para formar el filamento flagelar [19]. Los flagelos son altamente antigénicos y comprenden una amplia variedad de antígenos H, dependiendo de la cepa, *E. coli* tendrá antígenos específicos y para el caso de los flagelos existen 56 tipos H reconocidos [22].

## **ADN y nucleótido**

El ADN consta de una molécula circular con un origen replicativo. Se ha determinado la secuencia de varias cepas del genoma de *E. coli*, por ejemplo la cepa K12 consta de 4639679 pares de bases y codifica cerca de 4460 proteínas en 3277 unidades transcripcionales y 175 genes de ARN [19]. A tres cuartas partes de los genes se les ha asociado una función.

### 2.1.2. Metabolismo y crecimiento

*E. coli* crece en medios con glucosa [19], y en condiciones oxigenadas a 37 °C logra un tiempo de duplicación de 50 minutos . El tiempo de duplicación pueden aumentar y durar horas si se ocupan sustratos menos enriquecidos. Crece más rápido en medios ricos en nutrientes, y puede alcanzar tiempos de duplicación de 20 minutos a una temperatura de 37°C. La bacteria puede crecer en un rango de temperaturas que va desde 8 a 48 °C, dependiendo del medio nutritivo y de la cepa. El rango de pH para el crecimiento oscila entre pH 6.0 y 8.0, sin embargo hay posibilidades de crecimiento a valores 1 unidad por debajo y por arriba de este rango. La curva normal de crecimiento bacteriano se divide en 4 fases: 1) fase de transición A, 2) fase exponencial, 3) fase de transición B y 4) fase estacionaria (ver Figura 4).

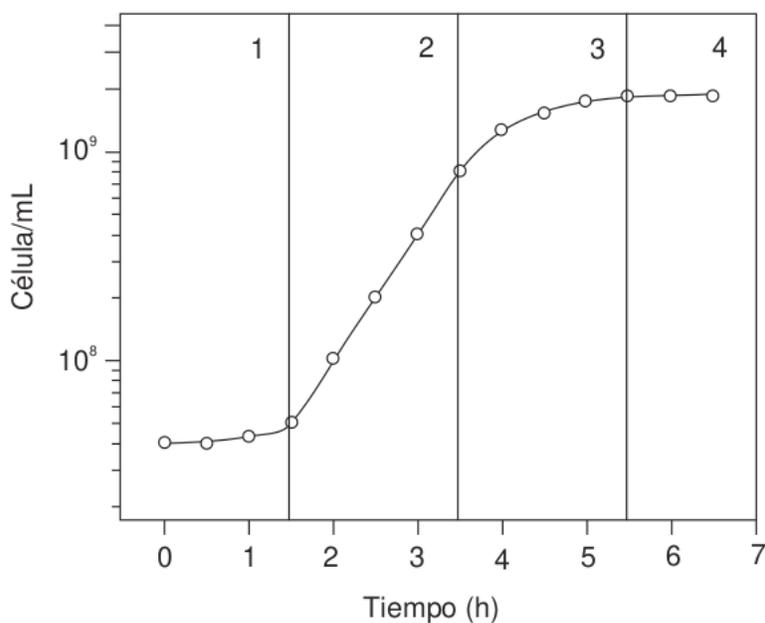


Figura 4: Curva de crecimiento de *E. coli* en medio nutritivo de *E. coli*. 1. Fase de transición A, 2. Fase exponencial, 3. Fase de transición B, 4. Fase estacionaria. Para más detalles ver texto [23].

#### 1) Fase de transición

En esta fase, la bacteria reinicia su ciclo celular, luego de una etapa de privación nutricional. En los minutos siguientes de iniciar el cultivo bacteriano, al inocular medio de cultivo, se recupera el nivel normal de tensión helicoidal del ADN y se da un incremento en la expresión de genes implicados en el crecimiento. Entre los 30 y 40 min siguientes,

se reinicia la replicación del cromosoma. la primera división de las mayoría de la células se da entre los 80 - 120 minutos de iniciado el cultivo [23].

## **2) Fase exponencial**

En esta fase, las bacterias recuperan el ciclo celular y crecen de forma exponencial, debido a que hay suficientes nutrientes. A esta fase también se le conoce como de crecimiento balanceado y representa el periodo de rápida división celular.

## **3) Fase de transición B**

Esta fase inicia cuando disminuyen los nutrientes. Cambia la pendiente de la curva de crecimiento exponencial y hay una disminución en la velocidad de síntesis de macromoléculas. También se conoce como de crecimiento no balanceado.

## **4) Fase estacionaria**

En esta fase se acaban los nutrientes, y se define como el momento en el que el número de células del cultivo no cambia. Representa el periodo de crecimiento nulo. Debido a que las bacterias no tienen esporas, exhiben importantes cambios fisiológicos y morfológicos en esta fase. Mantiene un metabolismo basal aún después de semanas de ayuno.

### **2.1.3. Ciclo celular**

El ciclo celular de las bacterias se divide típicamente en tres etapas: el período B, C y D. En el período B se da el nacimiento de la célula y comienza la replicación, en el período C se da la replicación cromosómica, mientras que el período D es el tiempo transcurrido entre el término de la replicación y la división (Figura 5).

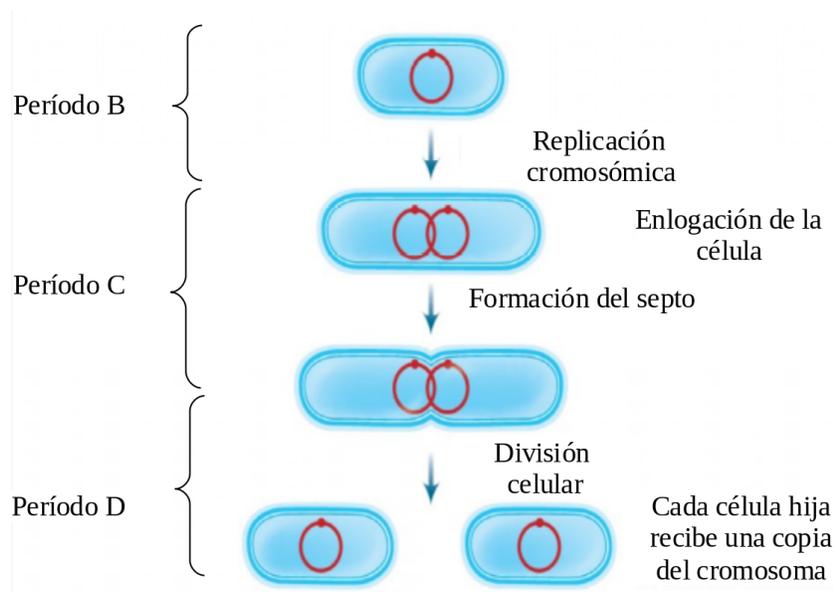


Figura 5: Ciclo celular de bacterias [24].

### Replicación cromosómica

La replicación cromosómica está acoplada con el crecimiento celular para garantizar que la replicación se inicie solo una vez por ciclo de división [24]. El inicio de la replicación cromosómica requiere un grupo de proteínas específicas y es un evento separado de la replicación del ADN [25]. Éste se indica por la unión de la proteína DnaA a sitios específicos en el origen de la replicación, *oriC*. Una vez que comienza la replicación, continúa de forma bidireccional hasta que el proceso termina. Además de su papel en el inicio de la replicación, el DnaA es un factor de transcripción que regula la expresión de varios genes. La cantidad de nutrientes disponibles afecta de forma dramática la acumulación de DnaA. La concentración de éste, crece con la tasa de crecimiento para garantizar que la activación del origen se efectúe con mayor frecuencia. Por otro lado, privar a las células de aminoácidos interrumpe su síntesis, evitando nuevas rondas de replicación [24]. Se ha aceptado como mecanismo principal, que vincula el crecimiento celular con el inicio de la replicación cromosómica, al tamaño o masa específica, denominado “masa de iniciación” [24]. El tiempo necesario para la replicación completa del cromosoma de *E. coli* es de 40 min, mientras que el tiempo que tarda la célula en dividirse es de 20 min.

## Partición

Después de la replicación cromosómica, sigue la partición, proceso por el cual los cromosomas hermanos se reubican en lados opuestos del sitio de división celular. Tiene lugar a los pocos minutos de la replicación de la región terminal del cromosoma. La formación del septo comienza casi enseguida de completarse la replicación del cromosoma, y ocurre a una longitud celular fija, que se conoce como longitud de dos unidades. Por tal motivo, la partición se lleva a cabo en una longitud de celda fija y los centros de los cromosomas hermanos estarán separados a una distancia fija, igual a una unidad [25]. La proteína FtsZ, se concentra en la parte central, marcando el sitio de la formación del anillo citocínico o divisoma.

## División celular

Una vez que se completa el septo, la célula se separa en dos, formando dos células hijas. La proteína FtsZ se dispersa en todo el citoplasma de las nuevas células.

### 2.1.4. Mecanismo de resistencia antibiótica

La resistencia antimicrobiana es un problema persistente y en crecimiento. Este problema se agrava cuando un microorganismo presenta más de un mecanismo de resistencia. Estos mecanismos son variados, y de entre ellos destacan cuatro (Figura 6).

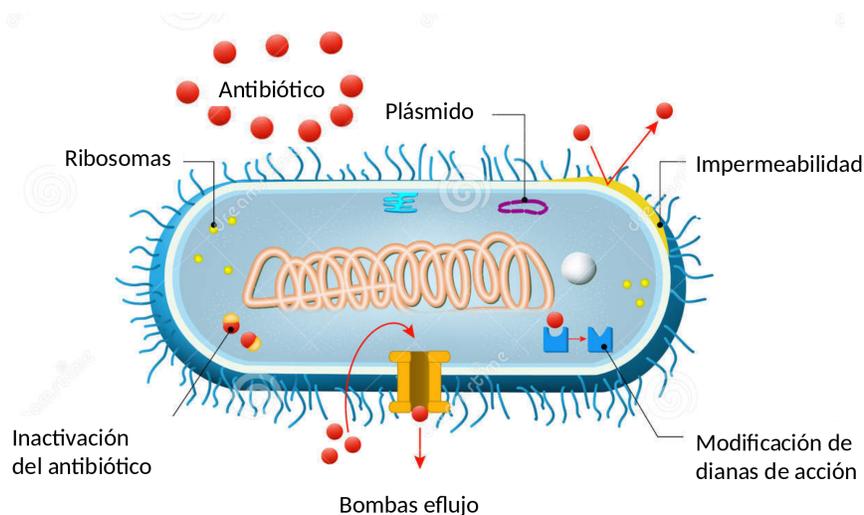


Figura 6: Mecanismos de resistencia antimicrobiana.

## **Inactivación enzimática**

Las bacterias sintetizan enzimas que hidrolizan al antibiótico, ocasionando la inactivación de éste. Por ejemplo, las beta-lactamasas son enzimas que hidrolizan el enlace amida del núcleo beta-lactámico, inactivando de esta manera el antibiótico [26].

## **Modificaciones en el dianas de acción**

La modificación de un aminoácido ocasiona un blanco diferente, lo que disminuye la afinidad de unión por el antibiótico. Por ejemplo, la modificación del sitio activo del ribosoma por metilación [27].

## **Alteraciones de la permeabilidad**

Cambios en la cantidad o el diámetro de las porinas pueden obstruir el ingreso del antibiótico a la bacteria

## **Bombas de eflujo**

Son transportadores de membrana que acarrean al antibiótico hacia el exterior de la célula. Se les ha considerado como un accesorio y de baja relevancia, sin embargo, se ha demostrado que cumplen una función importante en el nivel basal de resistencia contra el ácido nalidíxico [26].

## **Transferencia horizontal de genes**

Otra mecanismo por el cual las bacterias pueden adquirir genes de resistencia es la transferencia horizontal de genes. Esto es, el traspaso de información genética entre bacterias que ocurre por diferentes vías: conjugación, transducción y transformación (ver Figura 7).

- **Conjugación:** Proceso moderado por plásmidos. Estos pueden transferirse de una célula a otra debido al contacto cercano mediante pilis sexuales o poros. Tienen

replicación propia y poseen genes que codifican para resistencia bacteriana.

- **Transducción:** Transferencia de material genético de una bacteria a otra mediante bacteriófagos. Este puede integrarse al genoma bacteriano y transferir genes de resistencia a otra célula al trasladarse a ella.
- **Transformación:** Captura de ADN extracelular del medio. Éste puede incorporarse en el genoma y expresarse.

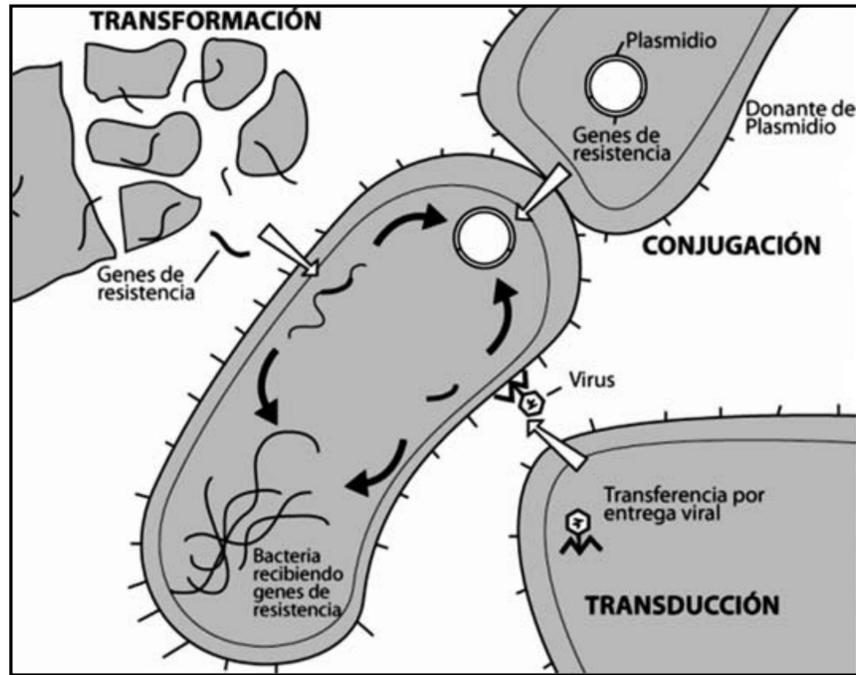


Figura 7: Transferencia horizontal de genes [27].

#### 2.1.5. Mecanismos de resistencia en *E.coli*

Las enterobacterias muestran resistencia a diversos antibióticos, como la ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol y ácido nalidíxico. En la Tabla 1 se muestran los principales mecanismos de resistencia antibiótica de la bacteria *E. coli*. Estos mecanismos se obtuvieron por mutaciones a nivel cromosómico o por transferencia horizontal.

Familia de antibióticos	Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia
Betalactámicos	Interfiere en las últimas fases de la síntesis de peptidoglicano	Betalactamasas: hidrolizan el enlace amida del núcleo betalactámico
Quinolonas	Inhibe la acción de las topoisomerasas y del ADN girasa	Cambio de aminoácidos en la enzima blanco Presencia de genes plasmídicos de resistencia antibiótica Sistemas de expulsión
Tetraciclinas	Inhiben la síntesis de proteínas al unirse al ribosoma	Bombas de eflujo
Cloranfenicol	Inhibe la biosíntesis de proteínas	Inactivación enzimática por acetilación Exportadores específicos de cloranfenicol
Trimetoprim - Sulfametoxazol	Inhibe la síntesis de enzimas necesarias en la ruta del ácido fólico.	Genes que codifican formas mutantes de la enzima blanco

Tabla 1: Principales mecanismos de resistencia en *E. coli* [24].

#### 2.1.6. *E. coli* K12 MG-1655

La cepa de *E. coli* utilizada en este trabajo fue la K-12, subcepa MG1655. Esta cepa fue secuenciada por el laboratorio Blattner y se construyó curando la cepa original de tipo salvaje K-12, usando naranja de acridina y UV. Se ha mantenido como una cepa de laboratorio con una mínima manipulación genética [28]. Crece en medio de cultivo LB y MEDIUM, a una temperatura de 37°C. Pertenece al grupo de riesgo nivel 1 [29]. La Figura 8 es una imagen de la bacteria tomada por un microscopio electrónico de barrido.

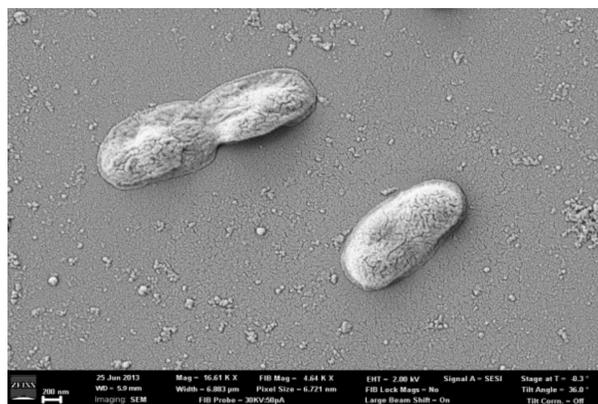


Figura 8: Imagen SEM de *E. coli* MG1655 [30].

El protocolo para la manipulación de esta cepa ha sido implementado por nuestro grupo de investigación [14]. La Figura 9 muestra la curva de crecimiento de la cepa utilizada. El medio de crecimiento que se emplea es el medio LB, a una temperatura de 37°C y con agitación de 130 r.p.m.

En la Figura 9 se puede observar que, después de 1 hr con 45 min de haber inoculado el medio LB, las bacterias recuperaron su ciclo celular y se encuentran en la fase de crecimiento exponencial.

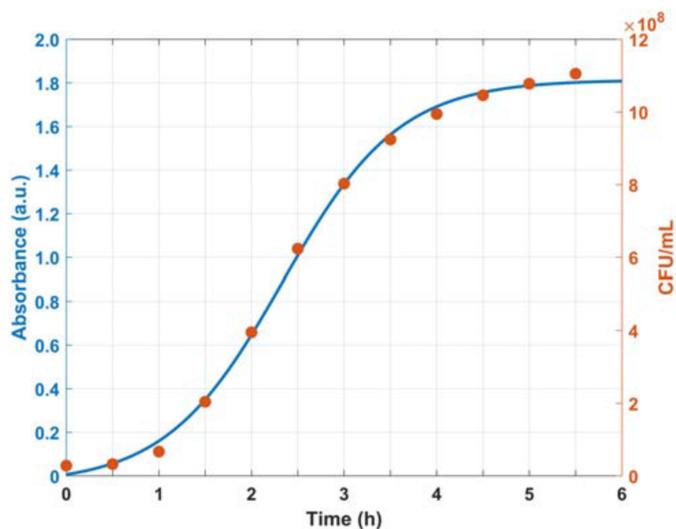


Figura 9: Curva de crecimiento de *E. coli* MG1655, medida en nuestro grupo de investigación [14].

## 2.2. Inactivación fotodinámica

La inactivación fotodinámica es un método que usa de luz visible, una molécula cromófora (fotosensibilizador) y oxígeno molecular, para la generación de especies citotóxicas capaces de causar daños multiobjetivos y destruir de microorganismos. Una de las especies más citotóxicas y de mayor interés en la fotoinactivación, es el oxígeno singlete. Su generación se puede dar de diversas maneras, generalmente se produce por transmisión de energía procedente de un cromóforo [31].

Los tres componentes arriba mencionados van a interactuar de la siguiente forma (Figura 10).

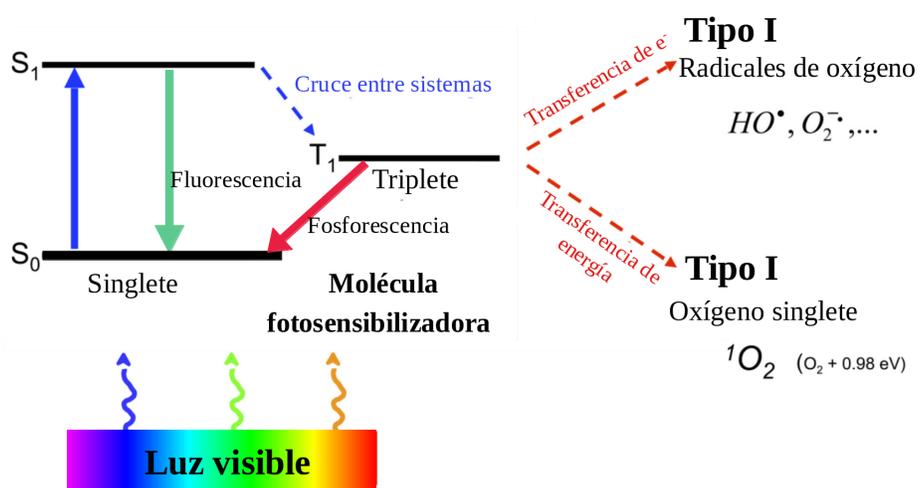


Figura 10: Proceso tipo I y tipo II de la inactivación fotodinámica [7].

Inicialmente, el fotosensibilizador se encuentra en su estado fundamental singlete, al excitarse con luz, pasa a su estado singlete excitado. Éste puede decaer a su estado fundamental por emisión de fluorescencia o mediante el proceso cruce de sistemas, en el cual el fotosensibilizador pasa a un estado que se conoce como estado triplete que, aunque es de menor energía, es más estable. En este estado, el fotosensibilizador puede decaer por emisión de fosforescencia, o bien, puede interactuar con las moléculas que se encuentran a su alrededor mediante dos mecanismos. El mecanismo tipo I se da por transferencia de electrones. La carga se transfiere al oxígeno molecular, generando diversos tipos de especies reactivas como el peróxido de hidrógeno, iones superóxido o radicales hidroxilo libres. En el mecanismo tipo II, se transfiere la energía directamente al oxígeno molecular, lo que genera al oxígeno singlete, altamente reactivo. Los dos mecanismos pueden ocurrir de manera simultánea, pero el segundo es el más predominante

[10]. Al ser altamente reactivo, el oxígeno singlete va a interactuar con las biomoléculas causando daños irreversibles a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, provocando necrosis o apoptosis a la células.

### 2.2.1. Fotosensibilizadores

Un fotosensibilizador se define como una entidad química que, al ser excitada, induce una alteración química o física en otra entidad química. Son cromóforos que generan especies reactivas de oxígeno al ser irradiados con luz [32]. Los cromóforos son parte o conjunto de una molécula responsable de su color. Tienen enlaces atómicos dobles conjugados, es decir, que los átomos están conectados alternando enlaces simples y dobles. Estos átomos también tienen electrones antienlazantes que orbitan alrededor del átomo y pueden saltar entre anillos orbitales. De esta forma es como la luz es absorbida por las moléculas. El número de enlaces dobles presentes en un cromóforo determinará la longitud de onda de la luz que puede absorber. Cuantas más moléculas de cromóforo estén presentes, más energía se podrá absorber. Los mejores enlaces de un cromóforo son los insaturados, como los enlaces dobles, los triples, carbonilos y anillos bencénicos.

Los fotosensibilizadores se clasifican en dos grupos de acuerdo con su mecanismo de acción. Si requieren o no oxígeno molecular, fotodinámicos y no fotodinámicos, respectivamente [5]. Los fotosensibilizadores fotodinámicos requieren la presencia de oxígeno y generan especies reactivas de oxígeno. Los no fotodinámicos actúan por sí mismos en ausencia de oxígeno, esto quiere decir que en su estado electrónicamente excitado pueden unirse con una biomolécula a través de un proceso conocido como fotoadición.

En general, un fotosensibilizador usado para la inactivación fotodinámica debe tener las siguientes características para tener una eficacia alta en la fotoinactivación y una baja toxicidad para las células:

- Alto rendimiento cuántico  $\Phi_{\Delta}$  de  $^1\text{O}_2$ .
- Carga positiva, para una buena adherencia a las paredes celulares bacterianas cargadas negativamente.
- Ser un compuesto puro con una composición constante.
- Tener una baja toxicidad química y mutagenicidad.

- Presentar una baja o nula actividad en oscuridad.
- Debe ser estable químicamente y frente a la irradiación.
- Su eliminación debe ser rápida, para evitar la fotosensibilidad post-tratamiento.

Además, la longitud de onda de absorción debe estar en la región visible.

### 2.2.2. Azul de metileno

El azul de metileno (MB) es una fenotiazina plana, tricíclica y aromática (ver Figura 11). Fue sintetizado en 1876. Su fórmula química es  $C_{16}H_{18}ClN_3S$  y tiene un peso molecular de 319.85 uma. El MB en soluciones acuosas tiene color azul debido a que las moléculas de fenotiazinio absorben intensamente luz visible en la región de 550-700 nm [33] y es muy soluble en agua. Se diferencia de otros tipos de tintes azules porque puede transmitir la energía de la luz absorbida a otras moléculas cercanas [34]. Al ser excitado, la molécula de MB es relativamente estable y puede sufrir reordenamiento electrónico.

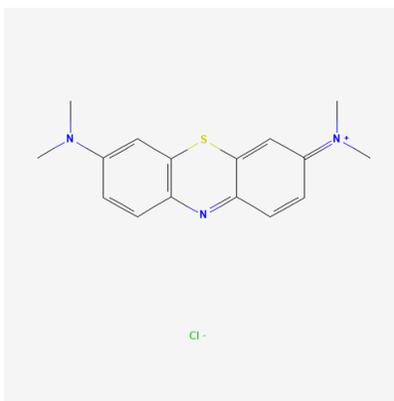


Figura 11: Molécula de azul de metileno [35].

Es uno de los fotosensibilizadores más comúnmente utilizados para la generación de oxígeno singlete. Pertenece a la segunda generación de fotosensibilizadores. Su pico de absorción máximo ésta en 660 nm (ver Figura 12). Tiene un rendimiento cuántico  $\Phi_{\Delta} = 0,5$

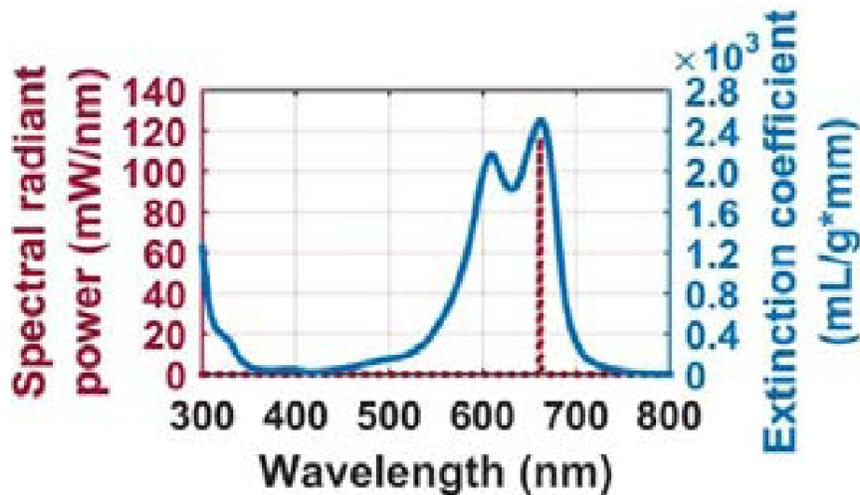


Figura 12: Espectro de absorción del azul de metileno (línea continua), potencia espectral radiante (línea punteada) como función de la longitud de onda [14].

### 2.2.3. Fuente emisora de luz

Las fuentes de luz utilizadas en la inactivación fotodinámica deben tener dos características: una longitud de onda que tenga el pico máximo de absorción del fotosensibilizador y una longitud de onda capaz de penetrar y profundizar en el tejido diana. Generalmente se usan lámparas, LED y láseres, siendo los últimos los más utilizados por su potencia. El rango de longitudes de onda que se ocupan en la fotoinactivación van desde el espectro visible hasta los 1200 nm (Figura 13). Sin embargo, las longitudes de onda mayormente usadas se encuentran entre los 600-1200 nm, por su mayor capacidad de penetración en el tejido.

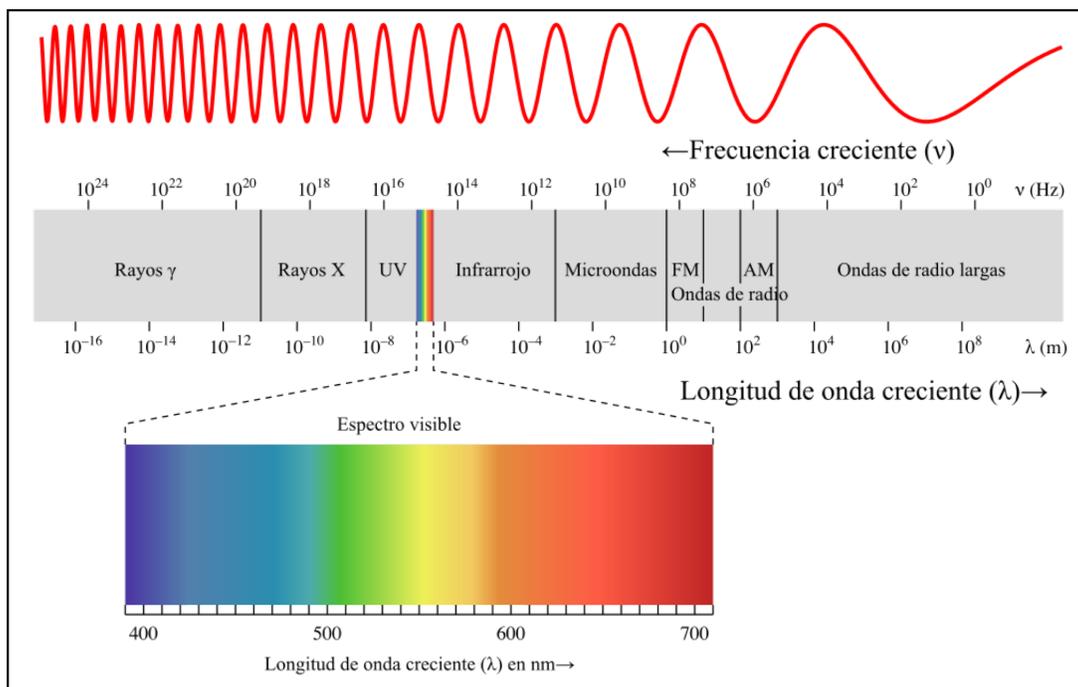


Figura 13: Espectro electromagnético.

#### 2.2.4. Láseres

La palabra laser es un acrónimo de *light amplification by the stimulated emission of radiation*, esto quiere decir, la amplificación de la luz por emisión estimulada de radiación. Posee tres propiedades fundamentales:

1. Es monocromático, es decir, que la radiación consta de una sola longitud de onda.
2. Alta coherencia, en consecuencia, coincidencia de fase.
3. Compuesto de ondas casi paralelas.

Estas propiedades permiten concentrar el haz en un área muy pequeña, o a su vez, mediante el acoplamiento a expansores de haz, cubrir una mayor área. La intensidad se conserva a lo largo del tiempo, debido a la coherencia [36]. Por estas características son muy utilizados en la fotoinactivación.

#### 2.2.5. Oxígeno

El oxígeno molecular o dióxígeno está formado por dos átomos de oxígeno unidos por un enlace covalente  $O_2$ . Posee dos electrones desapareados, cada uno ocupando dos diferentes orbitales moleculares externos. A este tipo de estructura se le conoce como

estado triplete o estado basal (Figura 14), esto indica que el oxígeno es un birradical y tiene la característica de poseer sus dos electrones en giro paralelo. Por tal motivo, solo puede tomar un electrón con giro contrario, antiparalelo, a la vez para cada orbital molecular.

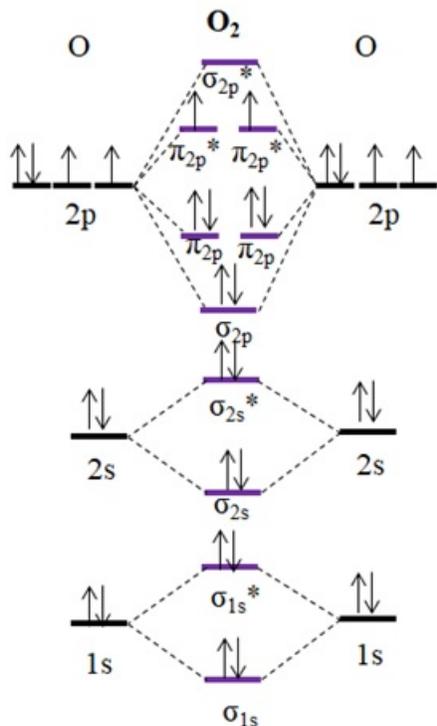


Figura 14: Diagrama de orbital molecular de  $O_2$  [37].

Es uno de los principales elementos para la supervivencia de ciertos organismos, así como el mantenimiento de la viabilidad celular y enzimática [38]. A pesar de que el oxígeno es esencial para la vida de los organismos aerobios, en determinadas condiciones, como lo es una alta concentración de oxígeno con respecto a la concentración normal, llega a ser tóxico. La toxicidad del oxígeno se puede explicar por la formación de las Especies Reactivas de Oxígeno.

### Especies Reactivas de Oxígeno

Un radical libre está definido como cualquier especie química capaz de existir de manera independiente y contener uno o más electrones desapareados, es decir, que se encuentran solos en el orbital más externo. Se forman debido a la pérdida o ganancia de un electrón por un no radical. La presencia de electrones desapareados cambia la reactividad de un

átomo o de una molécula, por tal razón, suelen ser más reactivos que su no radical correspondiente. Los radicales libres existen como derivados de muchos elementos, pero desde el punto de vista biológico, los más importantes son los derivados del oxígeno [39]. El oxígeno molecular desempeña un rol importante en la formación de radicales libres de oxígeno.

Las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) son moléculas inestables que contienen oxígeno y son altamente reactivas con distintas moléculas existentes en la célula como el ADN, los lípidos y proteínas[38]. Son de tipo radicales y no radicales (Tabla 2).

El término “Especies Reactivas de Oxígeno” engloba tanto a los radicales libres derivados del oxígeno, como a los no radicales que son derivados de la reducción molecular del oxígeno y tienen la característica de ser muy reactivos. En la tabla 2 se presenta una lista de las ROS divididas en radicales y no radicales. A continuación se mencionan las características generales de algunos tipos de ROS:

- **Anión superóxido:** Esta ROS se genera cuando el oxígeno acepta un electrón y es relativamente inestable.
- **Peróxido de hidrógeno:** Se forma por la enzima superóxido dismutasa y no es un radical libre.
- **Radical hidroxilo:** Se considera como una de las especies oxidantes más dañinas por su vida media corta y alta reactividad.
- **Oxígeno singlete:** Existen dos formas, la tipo sigma  $\Sigma$ , que es un radical y la tipo delta  $\Delta$  que es un no radical (como se detalla más adelante). Esta ROS se forma por la inversión del giro de uno de los electrones desapareados de uno de los dos orbitales moleculares externos de la molécula.

Radicales	No radicales
Superóxido ( $O_2^-$ )	Oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) forma $^1\Delta$
Hidroxilo ( $OH^\cdot$ )	Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )
Peroxilo ( $RO_2^\cdot$ )	Ozono ( $O_3$ )
Alcoxilo ( $RO^\cdot$ )	Anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ )
Hidroperoxilo ( $HO_2^\cdot$ )	Ácido hipocloroso ( $HOCl$ )
	Ácido hipobromoso ( $HOBr$ )

Tabla 2: Especies reactivas de oxígeno [39].

### 2.2.6. Oxígeno Singlete

El oxígeno singlete (SO) es oxígeno molecular en estado electrónico activado. Se forma por la activación del oxígeno por radiación, cuando uno de los electrones desapareados absorbe energía e invierte su rotación [39]. Como se mencionó anteriormente, existen dos formas, la primera forma, sigma  $^1\Sigma$ , es un radical libre, debido a que mantiene los dos electrones desapareados en los orbitales moleculares externos  $2\pi^*$ . La diferencia con el oxígeno molecular reside en que un electrón tiene giro paralelo y el otro electrón tiene giro antiparalelo (Figura 15). La segunda forma del oxígeno singlete es la delta  $^1\Delta$ , la cual posee a los dos electrones apareados en un solo orbital  $2\pi^*$ , por lo tanto no es un radical libre. El oxígeno singlete en su forma  $^1\Sigma$  posee una energía de 37.5 kcal, mientras que en la forma  $^1\Delta$  posee 22.4 kcal. El retorno de los estados activados al estado basal, produce la emisión de un fotón de 760 nm para el tipo  $^1\Sigma$  y 1270 nm para el tipo  $^1\Delta$  [31].

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 $^1\Delta$	$\uparrow\downarrow \text{ —}$

Figura 15: Configuración electrónica del oxígeno molecular y el oxígeno singlete [39].

Los tiempos de vida radiativos nos dan una idea de la estabilidad de cada forma, para  $^1\Delta$  es 45 min en fase gaseosa y  $10^{-6}$ - $10^{-3}$ s en solución, mientras que para  $^1\Sigma$  es de 7-12 s en fase gaseosa y  $10^{-11}$ - $10^{-9}$  s en solución [40]. La forma  $^1\Sigma$ , es muy inestable, por esa razón, en los sistemas biológicos y en la fotoinactivación, solo tiene relevancia la forma  $^1\Delta$ .

### 2.3. Clatratos

Un clatrato es una sustancia química compuesta por una red de un tipo de molécula determinada, molécula hospedera, que enjaula a una segunda molécula diferente, molécula huésped [41]. Un clatrato de hidrato o hidratos de gas son compuestos en los que la molécula hospedera es agua y la huésped un gas de bajo peso molecular. La

fuerza de interacción entre los dos tipos de moléculas es la fuerza de van der Waals [42]. Muchos gases pueden formar clatratos de hidratos en soluciones acuosas como el  $O_2$ ,  $N_2$ ,  $CO_2$ ,  $CH_4$ ,  $H_2S$ , argón, kriptón, xenón, etano, propano, butano etc., en ciertas condiciones de temperatura y presión [41, 43, 42]. La figura 16 ilustra una molécula de hidrato de metano.

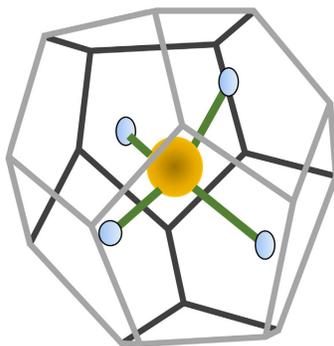


Figura 16: Estructura cristalina del hidrato de metano [42].

Fueron descubiertos por Sir Humphrey Davy en 1810, pero se cree que su existencia pudo haber sido descubierta desde antes. Representan uno de los problemas más reportados de aseguramiento de flujo en los sistemas de producción de petróleo y gas.

La estabilidad de los hidratos incrementa cuando disminuye la temperatura y aumenta la presión. La temperatura por debajo de la cual se pueden formar hidratos crece con el aumento de presión y puede alcanzar los 25 - 30 °C [42]. Las condiciones indispensables (temperatura y presión) para la formación de los hidratos, son diferentes de un gas a otro y de un gas puro a una mezcla de gases. La presión necesaria para la formación está en función de la molécula huésped y el tamaño de la jaula. Ésta disminuye a medida que la molécula se adapta mejor a la jaula.

La nucleación de los clatratos puede ser un proceso homogéneo o heterogéneo. El primero ocurre cuando no existen impurezas, mientras que el segundo necesita su presencia. Para entender la nucleación y la deposición de hidratos de gas, existen diferentes mecanismos que lo explican, uno de ellos es el mecanismo blob. En el mecanismo blob, la cristalización ocurre en dos pasos: en el primero, las moléculas huésped se concentran en "blobs". Estos son grupos amorfos que involucran múltiples moléculas huésped en configuraciones mediadas por agua. Estos blobs están en equilibrio con la solución diluida y dan como resultado la formación de jaulas de clatrato. Finalmente, éstas se

transforman en un núcleo de clatrato amorfo. En el segundo, los núcleos de clatrato amorfo se transforman en cristales de clatrato [42].

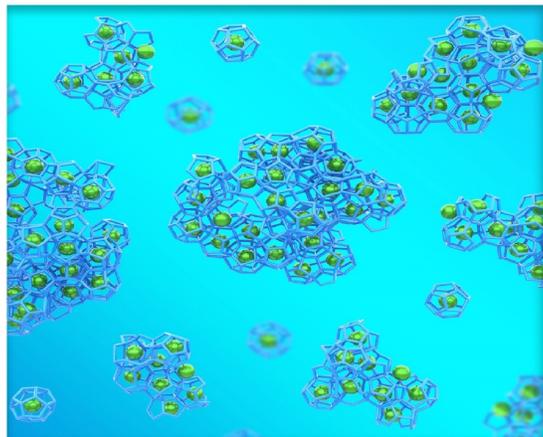


Figura 17: Esquema de estructuras de blobs [16].

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Preparación de medios de cultivo y buffer**

Los reactivos usados en esta sección se pesaron en la balanza OHAUS Adventure-Pro. Para el ajuste de pH se ocuparon ácido clorhídrico e hidróxido de sodio en concentración 1M.

##### **3.1.1. Preparación de medio LB**

El medio de cultivo usado fue el Luria Bertani (LB). Para preparar 1 L de se usaron 10 g de peptona de caseína (MCD LAB, 9081), 5 g de extracto de levadura (MCD LAB, 9032), 10 g de cloruro de sodio (CTR, 7647-14-5), y 1 L de agua Milli-Q.

##### **3.1.2. Preparación de medio sólido: agar LB**

Como medio de cultivo sólido, se usó agar LB. Para preparar se usaron 20 g de agar nutritivo por cada 1 L de medio LB líquido. Para preparar los medios, se disolvieron cada uno de los reactivos con ayuda de un agitador magnético. Posteriormente, se ajustó el pH a 7.0. Para el medio sólido, el agar se agregó después de ajustar el pH.

##### **3.1.3. Preparación de buffer de fosfatos, PBS**

Se disolvieron 5 tabletas de solución salina tamponadas con fosfato (SIGMA- Aldrich, P4417) en 1 L de agua Milli-Q usando un agitador magnético. Posteriormente, tanto los medios de cultivo como el buffer, se esterilizaron a 121° C por 20 min en autoclave.

#### **3.2. Preparación de muestras**

##### **3.2.1. Preparación de azul de metileno**

El fotosensibilizador usado en este proyecto fue el azul de metileno (SIGMA-Aldrich, 61-73-4). Se preparó una solución stock a una concentración de 100  $\mu$ M en PBS, a partir de otra que estaba a 46.9 mM. Debido a la esterilidad que necesita el experimento, se esterilizó el fotosensibilizador con un filtro de 0.1  $\mu$ m.

### **3.2.2. Preparación de nanoestructuras de oxígeno**

En este trabajo las nanoestructuras se obtuvieron por medio del aparato diseñado y construido por el grupo del Dr. Carlos Ruiz Suárez [16].

Para obtener las nanoestructuras de oxígeno, el vial se lavó y se llenó con agua Milli-Q. Se le colocó su tapa, la cual posee cuatro pequeñas perforaciones de 300  $\mu\text{m}$  aproximadamente. El vial se colocó dentro del tubo cilíndrico y se llenó con oxígeno a una presión de 60 bares. Posteriormente, con la ayuda del émbolo y el gato hidráulico, se presurizó hasta 220 bares, a una temperatura de 25°C y un tiempo de equilibrio de 60 minutos. Después, se despresurizó por no menos de 15 minutos. Para esto, se soltó la llave de bloqueo del gato para que el tubo cilíndrico regresara a su posición inicial. El resto del gas se liberó a través de la válvula de aguja. Después, se retiró el vial del tubo y se mantuvo a 4°C por 1 día.

### **3.2.3. Preparación de muestras de *E. coli***

El protocolo para el cultivo de *E. coli* ha sido estandarizado ya por nuestro grupo de laboratorio. Todos los pasos de este apartado se realizaron en una campana de flujo laminar vertical. La cepa utilizada fue la *E. coli* K12- MG1655. El procedimiento que se llevó a cabo es el siguiente:

#### **1. Activación de la cepa bacteriana**

Se realizó un pre-inóculo agregando una biomasa desconocida de *E. coli* en 20 mL de medio LB esterilizado. La solución (overnight) se incubó a 37.0°C con agitación de 130 RPM por 12-18 horas.

#### **2. Regularización en los tiempos de generación:**

Se prepararon 4 matraces estériles, uno con 20 mL y los restantes con 10 mL de medio LB estéril. A continuación se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de la solución overnight y se agregaron al matraz con 20 mL (matraz 1) y se incubó a 37.0°C con agitación de 130 RPM por 1hr 45 min. Después, se midió la absorbancia de la solución del matraz 1, que debía ser cercana a  $0.4 \pm 0.03$ , esto con el objetivo de garantizar que las bacterias se encontraran

en su fase de crecimiento exponencial. Luego, se tomaron 10 mL del matraz 1 y se agregaron a uno de los matraces con 10 mL de medio LB (matraz 2). Éste se incubó a 37.0°C con agitación de 130 RPM por 30 min, posterior a esto, se midió la absorbancia de la solución que debería ser  $0.4 \pm 0.03$ . Se siguió con la regularización haciendo los pasos anteriores con los dos matraces restantes, modificando el tiempo de incubación, de 20 min para ambos, ver Figura 18.

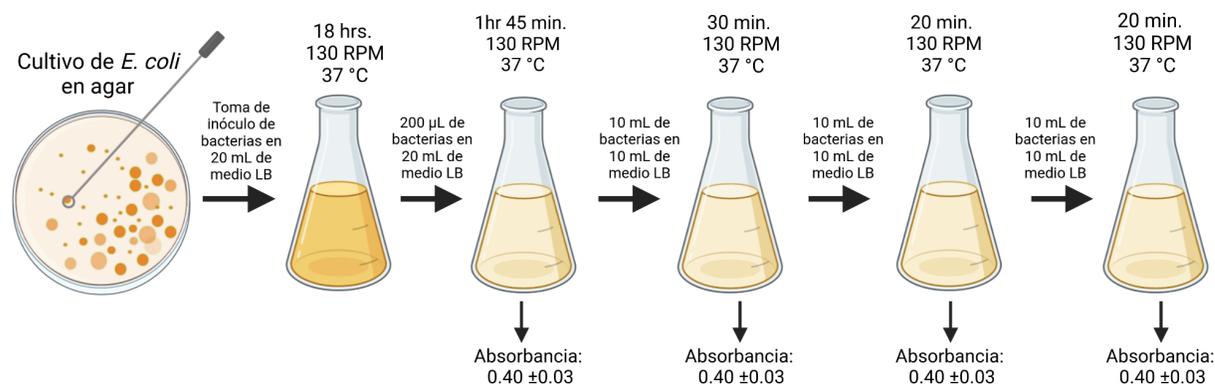


Figura 18: Pasos para la regularización en los tiempos de generación de la bacteria *E. coli*.

### 3. Lavado de bacterias

Una vez que la solución del último matraz tenía una absorbancia de  $0.4 \pm 0.03$ , se prosiguió con la preparación de la muestra haciendo lavados de la misma en PBS. En un tubo eppendorf de 15 mL se pusieron 10 mL de la solución bacteriana y se centrifugó por 10 min a 4000 RPM, el pellet se resuspendió con 10 mL de PBS y se repitió la centrifugación. Se hicieron tres lavados en total, al término de éstos se resuspendió el pellet en PBS.

#### 3.3. Fotoinactivación

##### 3.3.1. Preparación de grupos de estudio

##### Fotoinactivación sin nanoestructuras

Para la fotoinactivación de la bacteria sin nanoestructuras de oxígeno se tuvieron dos grupos controles y un experimental. Los grupos de estudio fueron preparados en alícuotas de 2 mL.

El primero de los controles (control PBS) contenía 900 µL de PBS y 100 µL de bac-

terias preparadas. El segundo (control fotosensibilizador) incluía 900  $\mu\text{L}$  de solución de azul de metileno estéril y 100  $\mu\text{L}$  de bacterias preparadas. El grupo experimental consistió de los triplicados de cada experimento independiente, por lo tanto se prepararon 3 alícuotas. En cada alícuota se agregaron 900  $\mu\text{L}$  de solución de azul de metileno estéril y 100  $\mu\text{L}$  de bacterias preparadas. Cada uno de los grupos se homogeneizó con un vortex.

### Fotoinactivación con nanoestructuras

Para la fotoinactivación de la bacteria con nanoestructuras de oxígeno se tuvieron los mismos grupos de estudio, pero los volúmenes cambiaron de la siguiente forma:

- Control PBS : 800  $\mu\text{L}$  de PBS + 100  $\mu\text{L}$  de bacterias preparadas + 100  $\mu\text{L}$  de solución de nanoestructuras de oxígeno.
- Control fotosensibilizador : 800  $\mu\text{L}$  de solución de azul de metileno estéril + 100  $\mu\text{L}$  de bacterias preparadas + 100  $\mu\text{L}$  de solución de nanoestructuras de oxígeno
- Experimental (3 alícuotas) : 800  $\mu\text{L}$  de solución de azul de metileno estéril + 100  $\mu\text{L}$  de bacterias preparadas + 100  $\mu\text{L}$  de solución de nanoestructuras de oxígeno.

Una vez preparados los grupos de estudio, se pusieron 200  $\mu\text{L}$  de cada grupo en una placa de cultivo de 96 pozos de color negra, como se muestra en la Figura 19, donde los 3 pozos formando una “L” son el triplicado de cada experimento, y los dos pozos en la fila ‘F’ representan los dos controles (azul: control de fotosensibilizador, gris: control PBS). Los 3 pozos del triplicado de cada experimento se irradiaron al mismo tiempo. Los elementos del grupo control no se irradiaron.

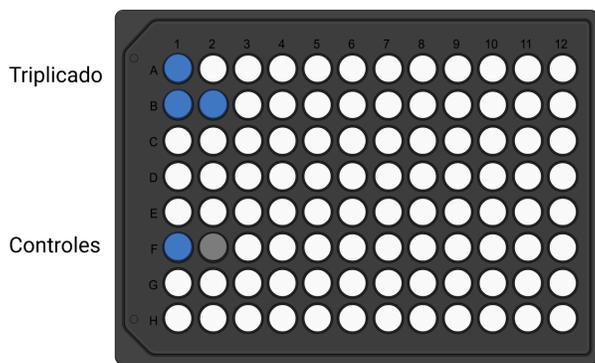


Figura 19: Ejemplo de posiciones en la placa de 96 pozos para grupos de estudio para la fotoinactivación. Ver texto para los detalles.

### 3.3.2. Irradiación de muestras

La irradiación de las muestras se llevó a cabo usando un arreglo optoelectrónico diseñado previamente en el laboratorio (Figura 20) [14]. A grandes rasgos tiene los siguientes componentes: diodo Laser con longitud de onda de 660 nm, lente biconcava con  $f= 25.0$  mm (Thorlabs), una lente biconvexa con  $f= 125.0$  mm (Thorlabs), un espejo y una máscara de PLA con 4 orificios con diámetro de 7 mm. Con este arreglo es posible irradiar al mismo tiempo los triplicados de cada experimento independiente.

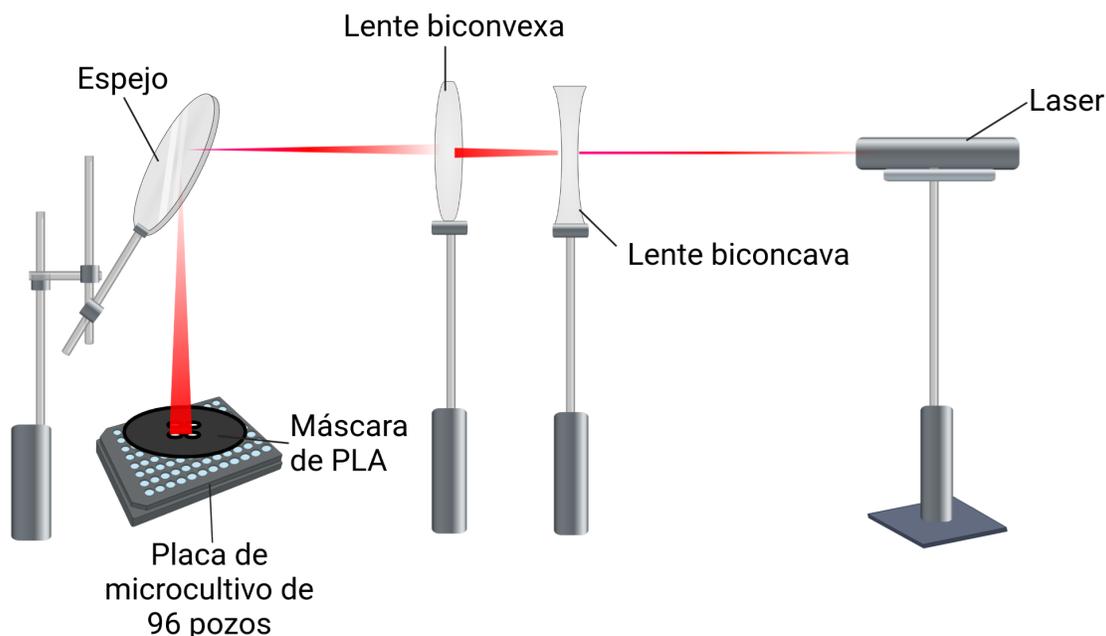


Figura 20: Diagrama de arreglo optoelectrónico para la fotoactivación.

Una vez colocados los grupos de estudio en la placa de 96 pozos, se posicionó la placa como se muestra en la Figura 20. Se irradió el grupo experimental con una potencia de 8 mW por 70 min. El grupo control no se irradia (Figura 19). La máscara de PLA fue diseñada e impresa en 3D en el laboratorio y permite que solo pasen a través de ella los spots que irradiaran a los pozos que contienen las muestras del grupo experimental, como se muestra en la Figura 21.

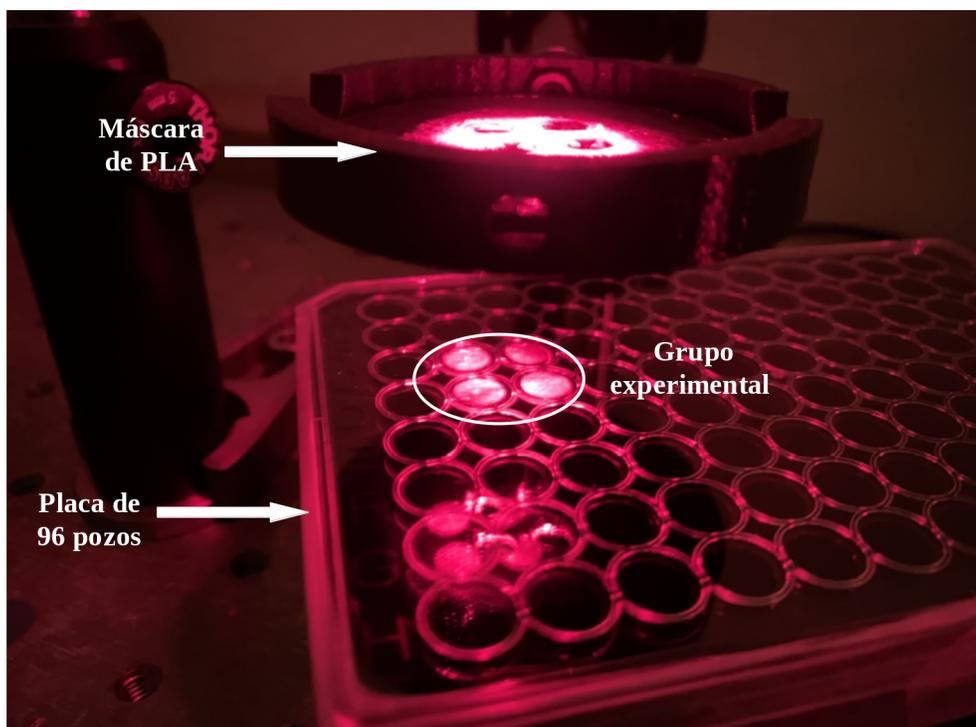


Figura 21: Irradiación del grupo experimental.

### 3.3.3. Cultivo de la bacteria

Al terminar el tiempo de irradiación, se llevó a cabo el cultivo de la bacteria. A cada pozo se le extrajeron  $100 \mu\text{L}$  de la muestra y se colocaron en  $900 \mu\text{L}$  de PBS, a continuación se realizaron diluciones seriadas. Este método implica la reducción progresiva de la concentración de una sustancia en disolución, por medio de una serie de diluciones secuenciales con un factor de dilución asociado, en este caso el factor de dilución es 10 (Figura 22). Éste se usa para reducir un cultivo denso de células a una concentración más contable (entre 30-300) y con esto poder determinar cuántas hay en la muestra original. Para el grupo control se hizo hasta la dilución 5 y para el grupo experimental hasta la dilución 2. Posteriormente, se tomaron  $100 \mu\text{L}$  de las últimas diluciones y se cultivaron por vertido en placa, en cajas de petri estériles con  $20 \text{ mL}$  de agar LB. Esto se realizó por triplicado. Se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por 24 hrs.

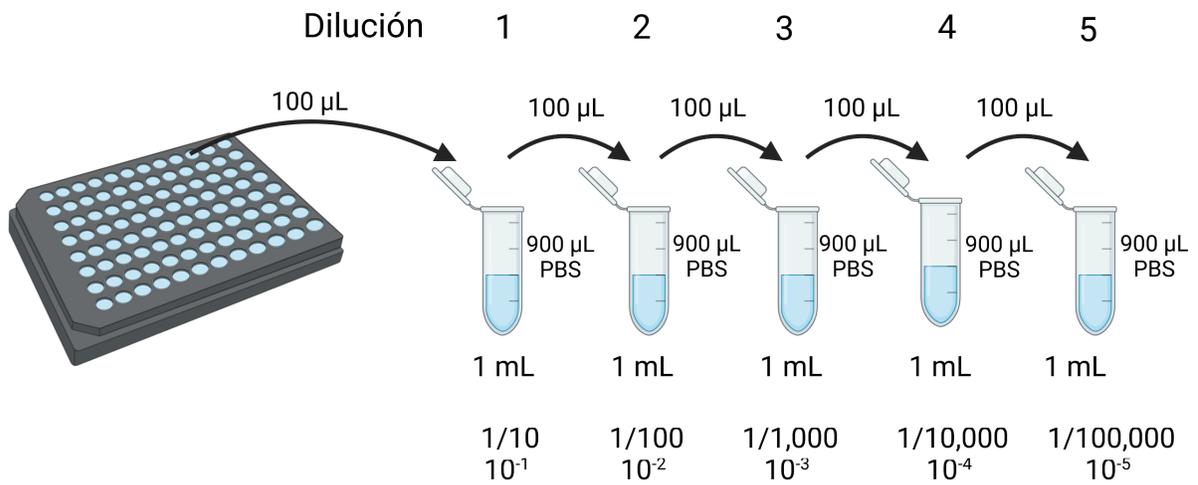


Figura 22: Diluciones seriadas.

### 3.3.4. Conteo de Unidades Formadoras de Colonia

Pasado este tiempo se contaron las Unidades Formadoras de Colonia (CFU) de cada grupo. La Figura 23 muestra un ejemplo del conteo realizado.

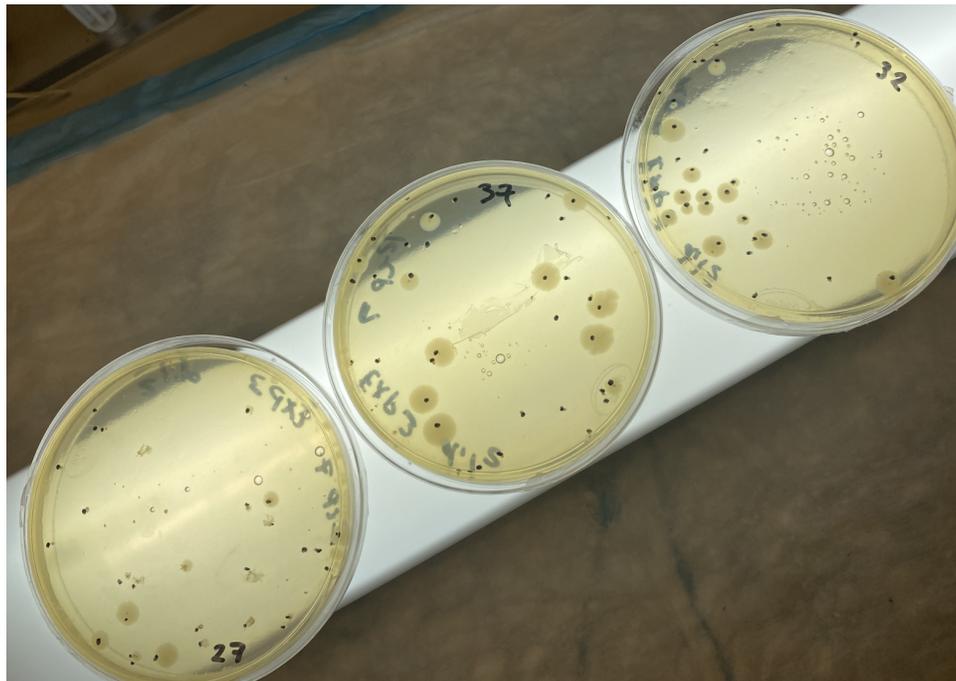


Figura 23: Conteo de CFU.

### 3.4. Medición de oxígeno disuelto

Con el afán de conocer la cantidad de oxígeno contenido en cada vial con nanoestructuras, se realizaron mediciones de oxígeno disuelto (DO). Las mediciones se hicieron con el sensor Orion Optical Dissolved Oxygen Sensor. Se usó azul de metileno a dos concentraciones, 10  $\mu\text{M}$  y 25 mM. Debido a las características técnicas del sensor, se prepararon los grupos de estudio con un volumen de 15 mL. Antes de realizar la preparación de éstos, se mantuvo el vial a 24 °C por una hora.

#### 3.4.1. Preparación de grupos de estudio

Para preparar el MB usado en los grupos de estudio se utilizó la concentración de 100  $\mu\text{M}$ .

Como controles se usaron:

- Agua milli-Q (15 mL)
- PBS (15 mL)
- MB a 10  $\mu\text{M}$  o 25 mM(15 mL)

Para el grupo experimental se usaron 14 mL de MB a 10  $\mu\text{M}$  o 25 mM y 1 mL de nanoestructuras de oxígeno. Se usó una pipeta Pasteur para extraer el mililitro del vial. Cada grupo se midió 4 veces, de forma continua, es decir, después de medir la concentración de un grupo, se limpiaba el sensor y se volvía a medir. Para la limpieza del sensor se ocupó agua milli-Q y clean wipes.

Es importante mencionar que la medición de oxígeno disuelto se realizó solo para los experimentos, que incluyen nanoestructuras. Las mediciones se hicieron antes de preparar los grupos de estudio de cualquiera de los dos experimentos (fotoinactivación, medición de oxígeno singlete). Es decir, de un vial se extrajo 1 mL de nanoestructuras para medir el oxígeno disuelto del vial. Después, de ese mismo vial se extrajo el volumen de nanoestructuras necesario para el experimento en cuestión.

### 3.5. Medición oxígeno singlete

La medición de oxígeno singlete se hizo de forma independiente a la fotoinactivación, es decir, tanto la concentración de azul de metileno, el arreglo óptico, como los viales ocupados, son distintos.

### **3.5.1. Preparación de azul de metileno**

Se usó una solución de MB con una concentración de 25 mM. Se preparó a partir de la solución con concentración de 46.9 mM.

### **3.5.2. Preparación de grupos de estudio**

La medición de oxígeno singlete se realizó en cajas de petri de 35x10 mm. Como controles se usaron agua milli-Q (3 mL) y PBS (3 mL). Para el grupo experimental se usaron 2 mL de azul de metileno a 25 mM + 1 mL de nanoestructuras de oxígeno.

### **3.5.3. Irradiación de muestras**

El arreglo optoelectrónico que se usó para la detección del oxígeno singlete es el que muestra en la Figura 24 y fue desarrollado en trabajos previos en nuestro grupo de laboratorio [14]. Es importante recordar que, al decaer el oxígeno singlete, se emite un fotón con una longitud de onda de 1270 nm. Este arreglo detecta de forma específica los fotones de esa longitud de onda. Es decir, mide de forma cualitativa la generación del oxígeno singlete mediante la detección de los fotones emitidos debido al decaimiento. Lo que se traduce en un aumento de potencia cuando aumenta la generación de oxígeno singlete. Como fuente de luz se utilizó un laser con una longitud de onda de 660 nm. Se usaron dos lentes biconvexas (Thorlabs) con  $f=5\text{cm}$ , que ayudan a que converja el haz. Un espejo dicróico (Thorlabs) que limita la transmisión de longitudes de onda menores a 900 nm. También un filtro pasa largo de 1200 nm y un filtro de paso de banda de 1300 nm (Thorlabs), para restringir las longitudes de onda que llegan al sensor. Además se usó un sensor (Newport 918D-IG-OD1R) el cual trabaja en un rango de longitud de onda de entre 800 y 1650 nm, y se utilizó un medidor de potencia (Newport modelo 1918-R).

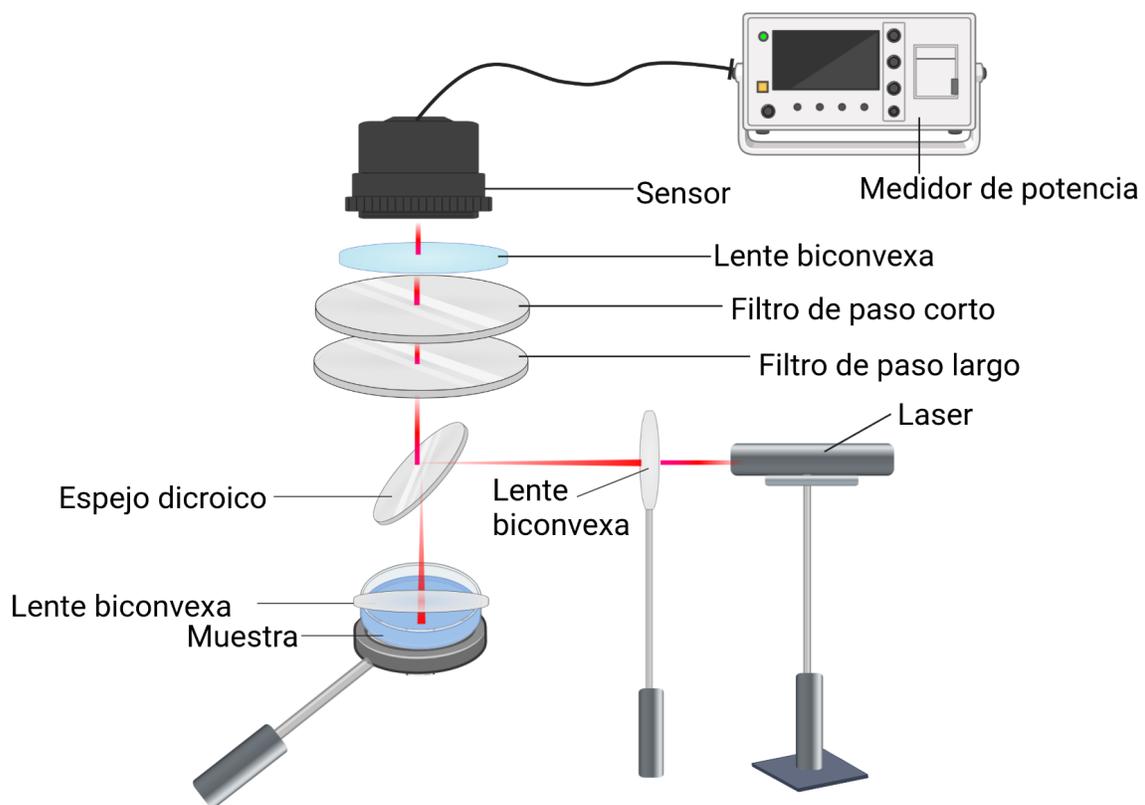


Figura 24: Esquema del arreglo optoelectrónico para la detección de oxígeno singlete [14].

La muestra se colocó en una base, para llevar acabo la detección del oxígeno singlete como se muestra en la Figura 25.

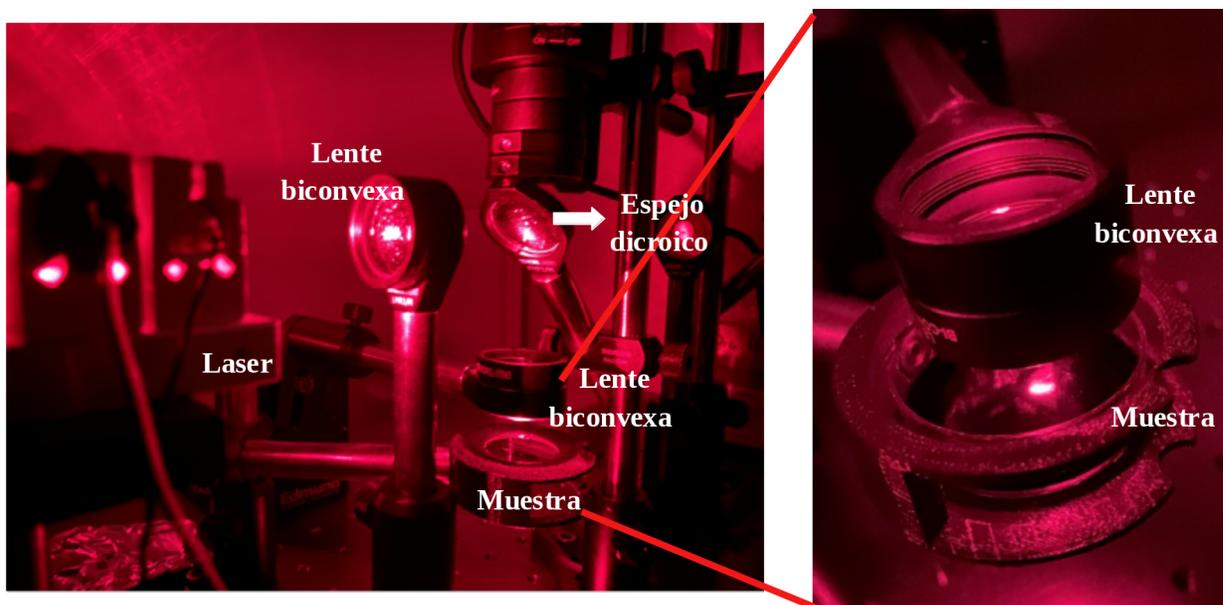


Figura 25: Arreglo optoelectrónico irradiando una muestra.

### 3.6. Análisis Estadístico

Se utilizó el método de cuartiles para analizar el conjunto de datos obtenidos en la foto-inactivación. Básicamente, este método divide la distribución de datos en cuatro partes iguales. Se utiliza para describir la dispersión y para comprender mejor la distribución de los datos. Se usa cuando son pocos datos y entre ellos existen valores atípicos.

El análisis estadístico empleado fue la prueba de rangos de Wilcoxon, con  $\alpha = 0.05$ . Pertenece a las pruebas no paramétricas de comparación de dos muestras relacionadas. Es una alternativa al t-test de muestras dependientes cuando las muestras no siguen una distribución normal.

## 4. Resultados

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en la fotoinactivación de la bacteria *E. coli* y la generación de oxígeno singlete en ausencia y presencia de nanoestructuras de oxígeno.

### 4.1. Fotoinactivación de *E. coli* sin nanoestructuras

Con el objetivo de establecer un protocolo para la fotoinactivación de la bacteria sin nanoestructuras, es decir, establecer la concentración de MB a usar, la potencia y el tiempo de irradiación, se realizó la fotoinactivación de la bacteria usando tres diferentes concentraciones de fotosensibilizador: 44.4  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 4  $\mu\text{M}$ . La potencia de irradiación fue 8 mW, mientras que el tiempo de irradiación fue de 60 min, dando un irradiancia de 24.9 mW  $\text{cm}^{-2}$ . Una vez que se prepararon los tres grupos de estudio, éstos se pusieron en la placa de microcultivo de 96 pozos, la cual se mantuvo en reposo y en oscuridad por 30 min, para la internalización del fotosensibilizador en la bacteria. Luego de este tiempo, se realizó la irradiación. Los resultados de las fotoinactivaciones se muestran en la Figura 26. Como se puede ver, las tres concentraciones de fotosensibilizador causaron una reducción de más de un orden de magnitud. La primera redujo 4.05 log<sub>10</sub>, la segunda 2.88 log<sub>10</sub>, mientras que la última causó una reducción de 1.84 log<sub>10</sub>.

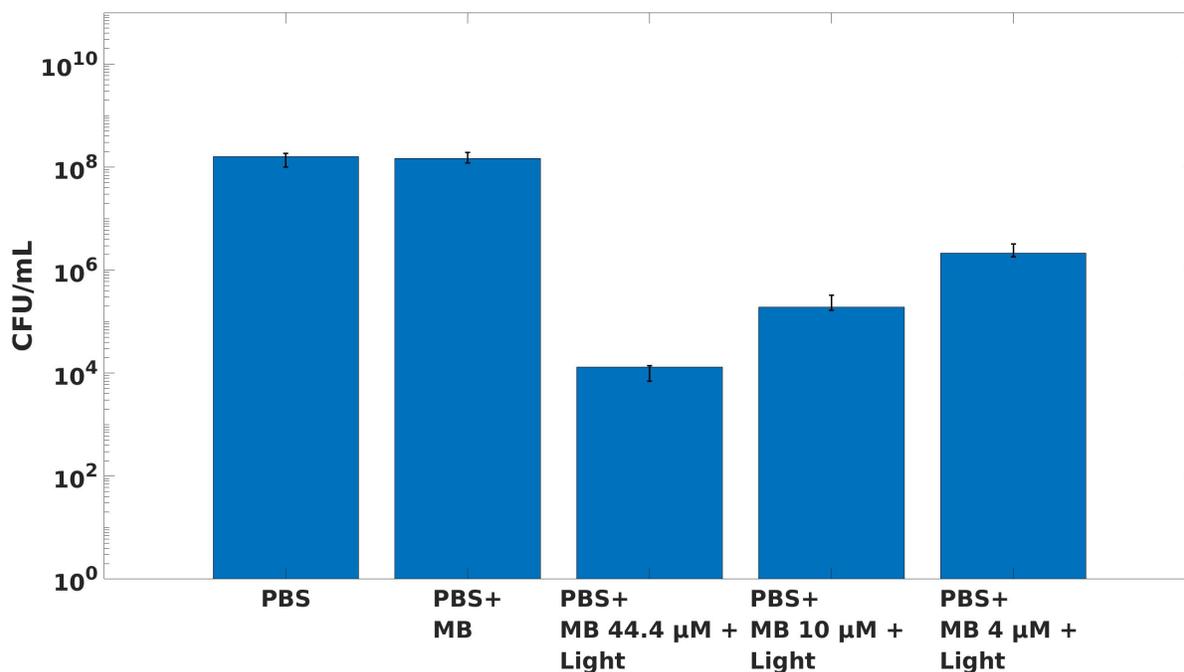


Figura 26: Fotoinactivación de la bacteria *E. coli* usando diferentes concentraciones de MB. La primera barra corresponde al control en PBS, la segunda al control con fotosensibilizador (aquí se presenta la correspondiente a 10  $\mu$ M). Las siguientes corresponden a los experimentos de fotoinactivación a 44.4  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 4  $\mu$ M, respectivamente. (Los controles no fueron irradiados), n=3.

Además, se puede apreciar que las concentraciones de fotosensibilizador son inocuas para las bacterias, ya que no hubo una disminución significativa de las UFC en el grupo control con fotosensibilizador con respecto al control con PBS.

Con el objetivo de ver una potenciación en el efecto de la fotoinactivación de la bacteria cuando se usan las nanoestructuras de oxígeno, se eligió la concentración de 10  $\mu$ M para establecer el protocolo. Por lo tanto, el protocolo para la fotoinactivación quedó de la siguiente manera: MB con una concentración de 10  $\mu$ M, potencia de irradiación, 8 mW y tiempo de irradiación de 1 hr. Los resultados se muestran en la Figura 27. En ella se puede apreciar de forma más clara la reducción de casi 3 log<sub>10</sub> obtenida con esta concentración.

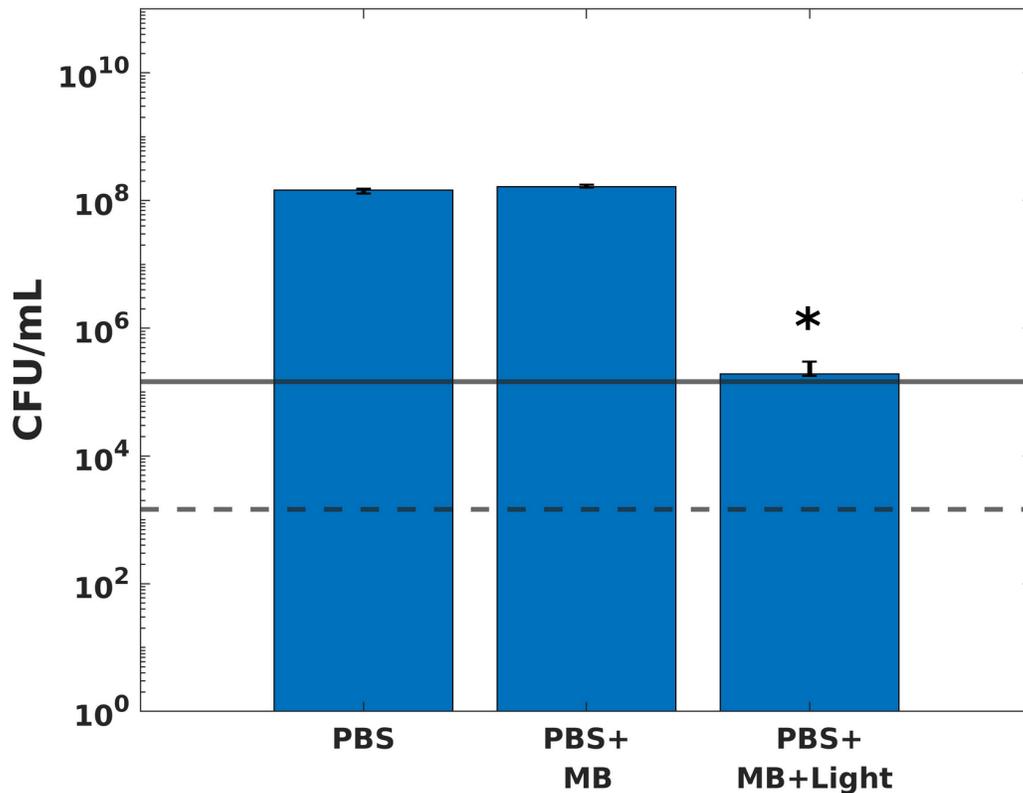


Figura 27: Fotoinactivación de la bacteria con MB a 10  $\mu$ M. Las primeras dos barras representan a los controles, PBS y fotosensibilizador, respectivamente. La tercera barra la fotoinactivación de la bacteria. La línea continua representa una reducción de 3 log10, mientras que la punteada una reducción de 5 log10, n=3. \*p <0.05.

Los experimentos de esta sección se realizaron con una n= 3, por triplicado. En las Figuras 26 y 27, el límite superior de las barras de error representa la diferencia que existe entre el cuartil 3 y 2, mientras que el límite inferior la diferencia entre el cuartil 2 y 1.

#### 4.2. Oxígeno singlete en muestras de azul de metileno y luz roja

Con el objetivo de estudiar la generación de oxígeno singlete debido a la interacción del MB en su estado excitado con oxígeno molecular, se hizo un barrido de concentraciones del fotosensibilizador, las cuales fueron 5 mM, 15 mM, 25 mM, cada una con un volumen de 3 mL, en cajas de petri de 3 mL. Se prepararon a partir de un stock de MB a 46.9 mM. La potencia de irradiación fue 80 mW, con un tiempo de irradiación de hasta 7 min. El tiempo de muestreo del sensor fue de 0.01 s. Antes de cada irradiación se estableció el cero en el medidor de potencia para quitar el ruido de fondo.

Los resultados del barrido de concentraciones se pueden observar en la Figura 28. Se irradió cada concentración por 5 min, presentando los primeros 200 s. Cada medición se realizó con una  $n=3$ , intercalando las concentraciones. De color azul se muestra la respuesta del agua a la luz visible (control), se puede ver que no presenta un aumento de potencia, como se esperaba. Al añadir MB la potencia comienza a aumentar, lo que significa un aumento en la generación de oxígeno singlete. A simple vista se nota que el aumento de éste se da a partir del segundo 60, para las tres concentraciones. Al incrementar la concentración del fotosensibilizador se puede ver que la potencia crece. Debido a las limitaciones que posee el arreglo óptico para detectar la generación con concentraciones bajas, las mediciones con 5 mM y 15 mM de MB, mostraron mucho ruido en cada medición.

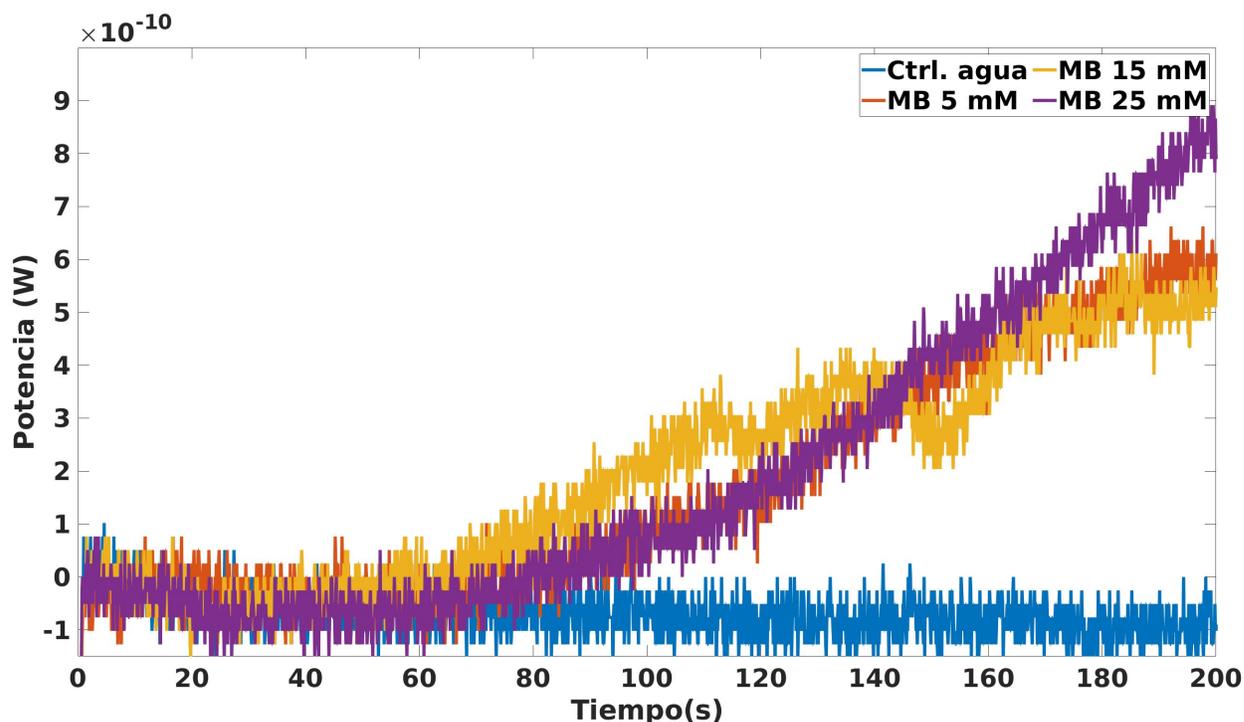


Figura 28: Potencia medida cuando los fotones de 1270 nm inciden en el detector para tres concentraciones de fotosensibilizador: 5 mM (rojo), 15 mM (amarillo) y 25 mM (morado) y un control, agua (azul). Para más detalles ver texto.

Este resultado nos permitió elegir la concentración a usar para la detección del oxígeno singlete usando nanoestructuras, que fue 25 mM.

En la Figura 29 se observa el aumento de potencia debido a los fotones de 1270 nm que son emitidos por decaimiento del oxígeno singlete. Éste inicia en el segundo 60,

incrementando gradualmente.

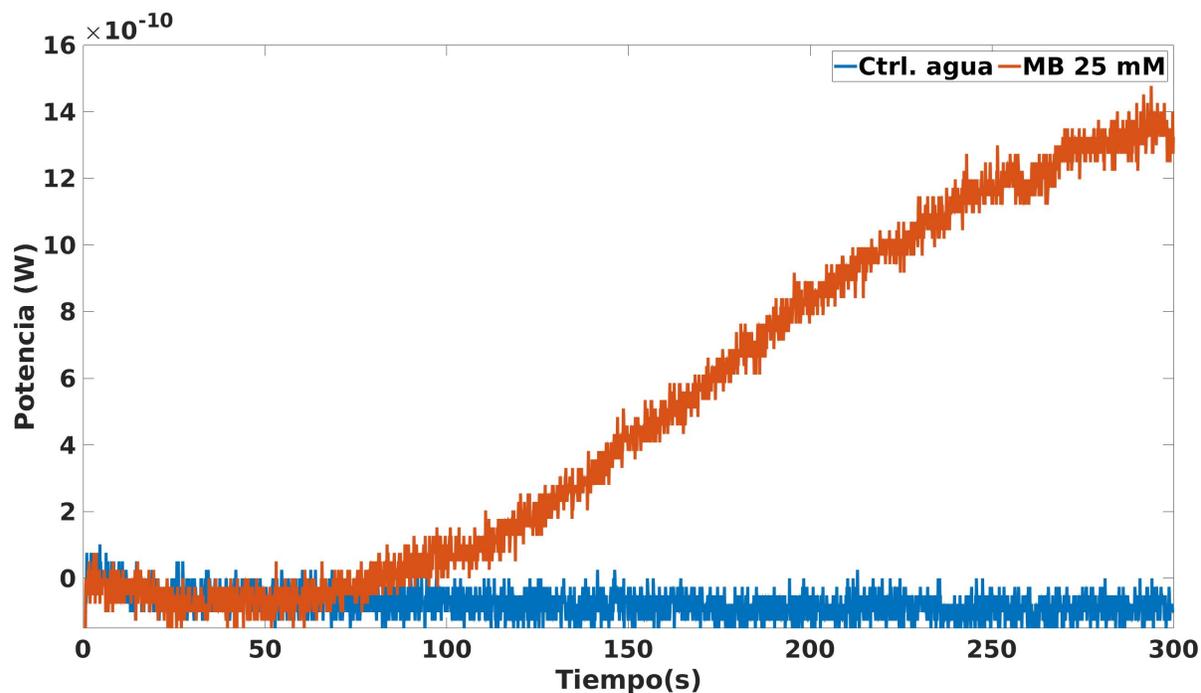


Figura 29: Potencia medida con MB a 25 mM por 5 min. Control agua (azul.), MB 25 mM (rojo).

### 4.3. Oxígeno disuelto

Como se mencionó en la sección 3.4.1, para medir la concentración de oxígeno disuelto de cada vial, se extrajo 1 mL de nanoestructuras para diluirlo en 14 mL de MB a la concentración requerida con base al experimento a realizar ( $10 \mu\text{M}$  en la fotoinactivación, 25 mM en la generación oxígeno singlete). El rango de valores que se obtuvieron al medir cada solución fue de 16 -20 mg/L.

Para determinar la cantidad de oxígeno disuelto presente en cada vial se usó la siguiente fórmula:

$$C_1 * v_1 = C_2 * v_2, \quad (2)$$

donde  $C_1$  y  $C_2$  son la concentración de oxígeno disuelto del vial y la medida con el sensor, respectivamente, y  $v_1$  y  $v_2$ , son el volumen de las nanoestructuras tomadas de cada vial y el volumen final al diluirlas, respectivamente. Sustituyendo los valores conocidos

$$C_1 = \frac{(20\text{mg/L}) * (15\text{mL})}{1\text{mL}} = 300\text{mg/L}. \quad (3)$$

por lo tanto, por cada mL tendremos:

$$C_1 = 0,3mg/mL \quad (4)$$

#### 4.4. Oxígeno singlete con nanoestructuras de oxígeno

Antes de preparar los grupos de estudio, control (agua, MB a 25mM), y experimental (25 mM + nanoestructuras) se midió la concentración de oxígeno disuelto de los viales a ocupar (ver sección 3.4) con la concentración de MB de 25 mM. Posteriormente, se prepararon los grupos. El volumen de los controles fue 3 mL. El grupo experimental se preparó con 2 mL de MB a 37.5 mM, y 1 mL de nanoestructuras. Se utilizó una mayor concentración de MB, debido al 1 mL de nanoestructuras, con esto la concentración final de la muestra fue de 25 mM. Las mediciones se hicieron con las mismas características de la sección anterior.

Los resultados se muestran en la Figura 30. Como se esperaba, el control con agua no presenta un aumento en la generación de oxígeno singlete, además la respuesta obtenida con el control MB, comienza en el segundo 60, como se vio anteriormente. Al añadir las nanoestructuras de oxígeno a la muestra, se puede observar que la generación de oxígeno singlete aumenta casi de inmediato al iniciar la irradiación.

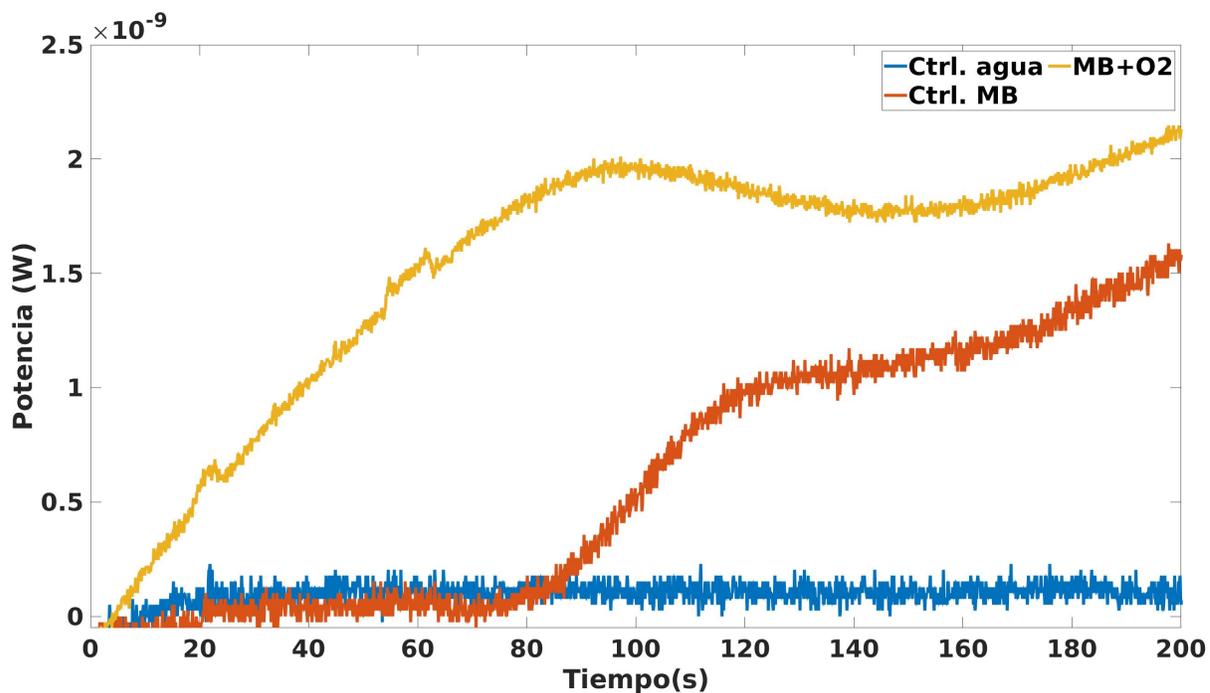


Figura 30: Potencia medida con MB a 25 mM y nanoestructuras irradiadas por 5 min. El control con agua (azul), el control con MB a 25 mM (rojo), MB + nanoestructuras expuestas a luz roja (amarillo).

#### 4.5. Fotoinactivación de *E. coli* con nanoestructuras

Como se mencionó anteriormente, una vez que la bacteria se encontraba en su fase de crecimiento exponencial, se hicieron los lavados en PBS. Luego, se preparó y se midió la concentración de oxígeno disuelto del vial a usar, si el valor se encontraba entre 16-20 mg/L se usaba, si no, se tomaba otro y se medía. Después se prepararon las alícuotas de cada grupo de estudio para la fotoinactivación, añadiendo en cada una las muestras de la siguiente manera: primero, los 800  $\mu\text{L}$  de fotosensibilizador o PBS (experimental, control, respectivamente), después los 100  $\mu\text{L}$  de las bacterias preparadas, y por último 100  $\mu\text{L}$  de las nanoestructuras, empezando por el triplicado del grupo experimental. Enseguida se homogeneizó cada alícuota, y se colocaron en la placa de microcultivo, la cual se mantuvo en reposo y en oscuridad por 30 min. La irradiancia fue la misma que se utilizó anteriormente,  $24.9 \text{ mW cm}^{-2}$ . El resultado de la fotoinactivación de la bacteria con nanoestructuras se muestra en la Figura 31.

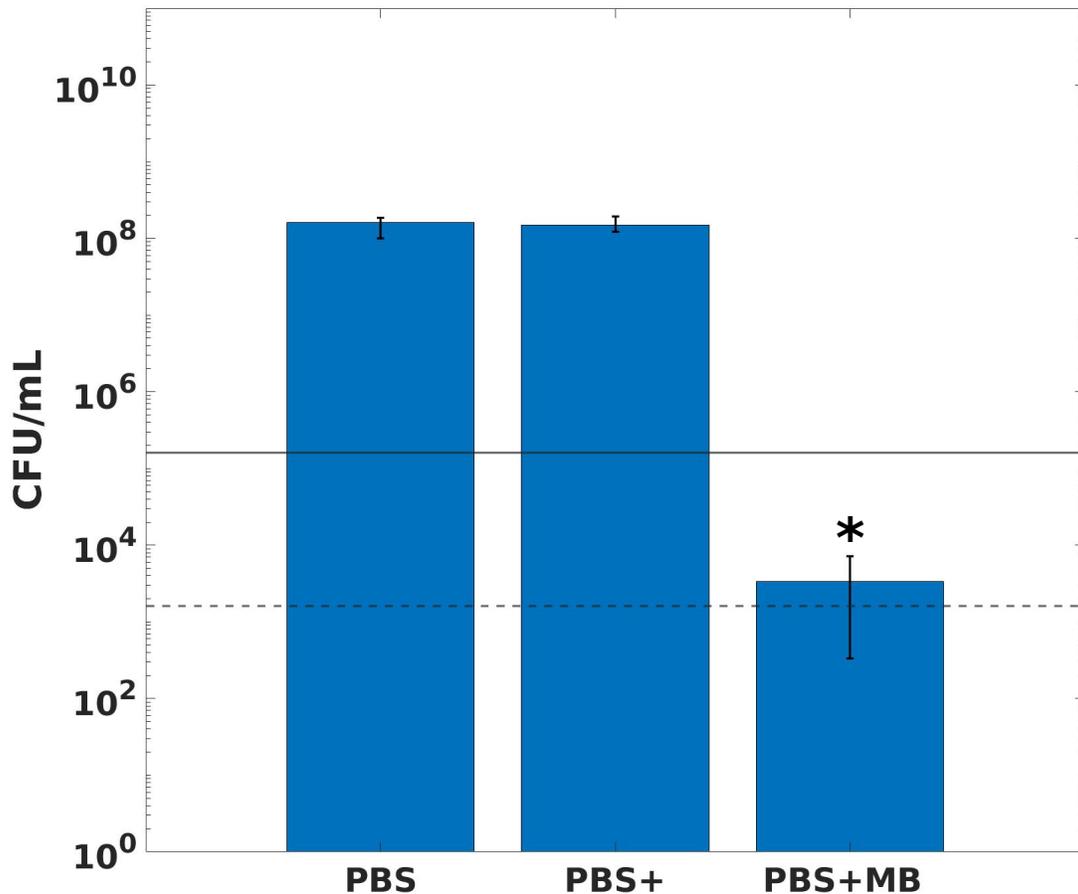


Figura 31: Fotoinactivación de la bacteria *E. coli* con nanoestructuras de oxígeno. Las primeras dos barras corresponden a los controles PBS y fotosensibilizador. La tercera representa la fotoinactivación de la bacteria con nanoestructuras, con una concentración de MB a  $10 \mu\text{M}$ ,  $n=3$ . La línea continua representa una reducción de  $3 \log_{10}$ , mientras que la punteada una reducción de  $5 \log_{10}$ . \* $p < 0.05$ .

Como se puede observar, usando las nanoestructuras en la fotoinactivación de la bacteria, se logró una reducción de más de  $3 \log_{10}$  en las CFU respecto al control. Se consiguió una reducción de  $4.64 \log_{10}$ , esto quiere decir que, de 44,000 (aproximadamente) bacterias solo una sobrevivió. Si comparamos este resultado con el obtenido sin nanoestructuras, Figura 32, se puede apreciar una potenciación del efecto de fotoinactivación, de forma puntual  $1.76 \log_{10}$ , es decir, mejoró el efecto 58 veces.

Los experimentos de esta sección se realizaron con una  $n=3$ , por triplicado. En las Figuras 31 y 32, el límite superior de las barras de error representa la diferencia que existe entre el cuartil 3 y 2, mientras que el límite inferior la diferencia entre el cuartil 2 y 1.

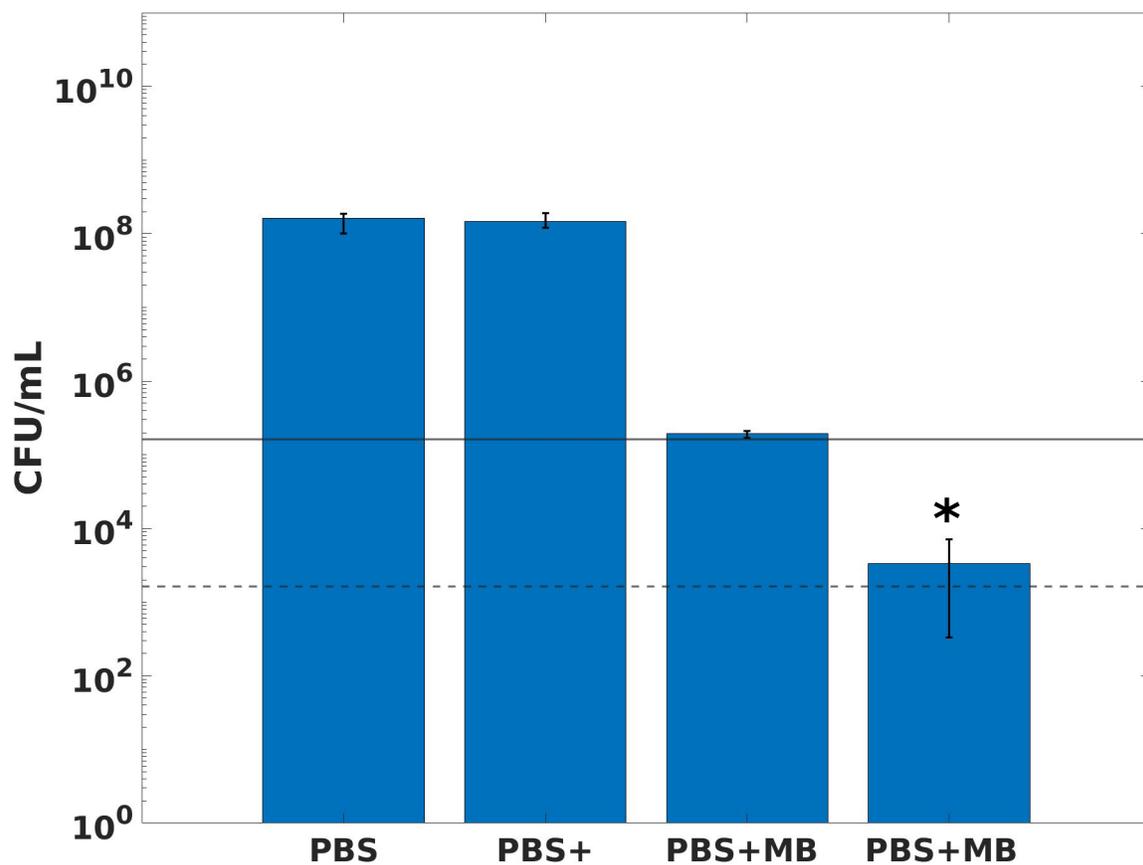


Figura 32: Fotoinactivación de la bacteria *E. coli* sin y con nanoestructuras de oxígeno. Las primeras dos barras corresponden a los controles PBS y fotosensibilizador. La tercera y la cuarta representan la fotoinactivación de la bacteria sin y con nanoestructuras, respectivamente. La línea continua representa una reducción de 3 log<sub>10</sub>, mientras que la punteada una reducción de 5 log<sub>10</sub>. \*p <0.05.

## 5. Discusión

El oxígeno molecular es un elemento crucial en la fotoactivación, ya que, el tipo de ROS generado durante este proceso, depende de la cantidad de éste en el medio. En condiciones oxigenadas, la generación de SO es más dominante que la de las otras ROS [12]. Razón por la cual, en este trabajo estudiamos el efecto de la adición de las nanoestructuras de oxígeno en la fotoactivación de la bacteria *E. coli*. La concentración inicial de UFC/mL fue de  $2 \times 10^8$ . Las concentraciones de MB usadas no producen efectos inhibitorios en la viabilidad celular, es decir, son inocuas para la bacteria.

Desde hace unos años, grupos de investigación han explorado el MB como agente fotosensibilizante. Robert A. Floyd y colaboradores [44], presentaron un review en 2002 sobre el uso de MB en la fotoactivación de virus, siendo uno de ellos el VIH-1 en productos sanguíneos. Usando una concentración de  $1 \mu\text{M}$  de fotosensibilizador, lograron fotoactivar el virus cuando se encontraba presente en el plasma sanguíneo. Por otro lado, James F. Papin y colaboradores [45], estudiaron el impacto que tiene este colorante en la eliminación de la infectividad del virus del Nilo Occidental *in vivo*. Inactivaron tres aislamientos primarios de este virus y previnieron la mortalidad en un modelo murino. Aunado a esto, el MB se ha empleado en la inactivación de diferentes microorganismos, como *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* [32, 46, 47, 48, 49]. Sin embargo, los grupos de investigación han centrado su atención en mejorar el efecto inhibitorio de este método de diversas maneras. ya sea realizando cambios en la molécula fotosensibilizadora, añadiendo partículas junto con ésta, o bien, sintetizando nuevas moléculas fotosensibilizadoras. Es decir, los cambios solo son para el agente fotosensibilizante. Shakir Khan y colaboradores [50], analizaron el efecto de la adición de nanopartículas de oro ( $\text{GNP}_{\text{DEX-ConA}}$ ), en la fotoactivación de *E. coli* y *Enterobacter cloacae*, usando MB como fotosensibilizador. Mostraron que usando estas nanopartículas mejoran la eficacia y la selectividad de la muerte celular, logrando una eliminación del 97% de las bacterias. En ese sentido, Maliszewska y colaboradores [51], mostraron que usando nanopartículas de oro sintetizadas por el micelio de *Mucor plumbeus* y MB, mejoran la eficacia del fotosensibilizador en la inactivación de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Mientras que Sajid Farooq y colaboradores [52], estudiaron el uso de nanocáscaras de oro en la inactivación de *Staphylococcus aureus*. Encontraron que el uso de estas reducía el tiempo de irradiación requerido para

la erradicación total de las células bacterianas. Por otro lado, Zelnildo Santos y colaboradores [53], evaluaron los efectos de un gel de papaína con MB, en la inactivación de biopelículas de *Streptococcus mutans*. Se dieron cuenta que este gel producía una mayor cantidad de SO y radicales hidroxilo, que podrían mejorar la aniquilación bacteriana. Como podemos apreciar, el foco de atención es el fotosensibilizador.

Ahora bien, R. Khaengraeng y R.H. Reed [15], estudiaron la influencia del oxígeno antes, durante y después de la fotoinactivación en condiciones hipoxigenadas, oxigenadas e hiperoxigenadas. Los autores obtuvieron como conclusión, que el oxígeno tiene una gran influencia en el conteo de bacterias tras realizar la fotoinactivación usando UVA y luz solar. Además, estudios realizados en 2000 y 2001 [54, 55], mostraron que la inactivación de bacterias fecales es 4 a 8 veces más rápida en condiciones oxigenadas. En este contexto, nosotros estudiamos el efecto de añadir nanoestructuras de oxígeno en la fotoinactivación de *E. coli*, usando MB. Para realizar esta investigación, primero realizamos la fotoinactivación de la bacteria sin las nanoestructuras, a diferentes concentraciones de MB (Figura 26). Obtuvimos que éstas son inocuas para la bacteria, corroborando los resultados obtenidos en otros estudios ( $40 \mu\text{M}$  [14],  $100\text{-}300 \mu\text{M}$  [56]). Elegimos una concentración de MB a usar y con ésta conseguimos una reducción de  $2.87 \log_{10}$  en las UFC (Figura 27). Posteriormente, realizamos la fotoinactivación de la bacteria con las nanoestructuras (Figura 31), y obtuvimos una reducción de  $4.64 \log_{10}$ . Por lo tanto, obtuvimos una potenciación de  $1.76 \log_{10}$ , es decir, se potenció el efecto 58 veces. Esto se puede deber a que, usando las nanoestructuras hay una mayor generación de SO, como lo vimos en los resultados de la medición de SO (Figura 30). También, nos dimos cuenta que, al aumentar la cantidad de oxígeno en la fotoinactivación de la bacteria con las nanoestructuras, se obtuvo un mejor efecto que aumentar la cantidad de MB, 4 veces más. Recordemos que la primera de las concentraciones que se usaron en las fotoinactivaciones sin nanoestructuras fue  $44.4 \mu\text{M}$ , con esta concentración se obtuvo una reducción de  $4.05 \log_{10}$ . Ahora, comparando este resultado con el obtenido con las nanoestructuras, podemos decir que, con el uso de las nanoestructuras obtuvimos una reducción en las UFC 4 veces mayor que empleando 4 veces más la concentración de fotosensibilizador ( $\text{MB } 10\mu\text{M} + \text{O}_2 = 4.64 \log_{10}$ ,  $\text{MB } 44.4 \mu\text{M} = 4.05 \log_{10}$ ). Esto nos dice que el oxígeno juega un papel muy importante en la fotoinactivación, y que modificaciones en éste pueden ser más significativas que cambios en la concentración

del fotosensibilizador. Esto se debe a que el aumento en la generación de SO depende de dos factores: el fotosensibilizador y la concentración de oxígeno molecular presente [57]. Recordemos que la reacción fotoquímica asociada a la generación de SO es la tipo II, esta reacción se ve favorecida al tener un ambiente más oxigenado, debido a que el fotosensibilizador transferirá su energía fácilmente al oxígeno molecular ocasionando una mayor producción de SO [57]. El uso de las nanoestructuras permite tener una mayor cantidad de oxígeno molecular disponible, ya que éste interactúa con las moléculas de agua a su alrededor mediante puentes de hidrógeno [41, 58]. Esto permite que el fotosensibilizador pueda interactuar con él, ya que no se encuentra formando otra molécula. Al aumentar la cantidad de oxígeno molecular en el medio con la adición de las nanoestructuras, hay más interacciones entre el MB y el oxígeno dando como resultado una mayor generación de SO originando una mayor letalidad en las bacterias.

## 6. Conclusiones

La adición de nanoestructuras de oxígeno en soluciones de agua con MB expuestas a luz roja, causan una mayor generación de oxígeno singlete, debido al aumento de oxígeno molecular en el medio.

La fotoinactivación de la bacteria *E. coli* con las nanoestructuras produjo una reducción de 4.64 log10 en las unidades formadoras de colonias. Este resultado supera el valor recomendado por la OMS en la reducción de UFC para considerar un fotosensibilizador como un antimicrobiano.

El uso de las nanoestructuras de oxígeno logró una potenciación de la fotoinactivación de la bacteria *E. coli* de 1.76 log10, es decir, el efecto mejoró 58 veces.

## 7. Perspectivas

Con base en lo obtenido en este trabajo, las perspectivas son las siguientes:

- Estudiar el efecto de incrementar la concentración de nanoestructuras de oxígeno para la fotoinactivación de la bacteria *E. coli*.
- Utilizar EDTA junto con las nanoestructuras, para potenciar aún más la fotoinactivación de la bacteria *E. coli*.
- Cuantificar, mediante espectrofluorometría la generación de SO debido a las nanoestructuras.
- Determinar la citotoxicidad de este protocolo de fotoinactivación, realizando pruebas de viabilidad *in vitro* en células humanas.

## Referencias

- [1] Silvia Giono-Cerezo y col. «Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla». En: *Gaceta Médica de México* 399 (2019), págs. 629-655.
- [2] Organización Mundial de la Salud. *Resistencia a los antimicrobianos*. Ed. por Windows Phone Central. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.
- [3] Antimicrobial Resistance Collaborators. «Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis». En: *LANCET* 399 (2022), págs. 629-655.
- [4] Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura. *Resistencia a los antimicrobianos*. Ed. por Windows Phone Central. <https://www.fao.org/antimicrobial-resistance/es/>.
- [5] Laura R. Comini y Susana Núñez. «Fotosensibilizadores naturales activos en terapia fotodinámica». En: *Bitácora digital, FCQ, UNC* (2010), págs. 1-3.
- [6] Mariam M. Awad y col. «Important cellular targets for antimicrobial photodynamic therapy». En: *APPLIED MICROBIAL AND CELL PHYSIOLOGY* 100 (2016), págs. 7679-7688.
- [7] Fabian Cieplik y col. «Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens». En: *Frontiers in MICROBIOLOGY* 5 (2014), págs. 1-17.
- [8] Oscar Raab. «Ueber die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien». En: *Zeitschrift für Biologie* 39 (1900), págs. 524-546.
- [9] Tingting Hu y Zhengdi Wang. «Recent advances in innovative strategies for enhanced cancer photodynamic therapy». En: *Theranostics* 7 (2021), págs. 3278-3300.
- [10] Eliana Alves y col. «Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope». En: *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 22 (2014), págs. 34-57.
- [11] Yucheng Wang y col. «Antimicrobial blue light inactivation of pathogenic microbes: State of the art». En: *Drug Resistance Updates* 33-35 (2017), págs. 1-22.
- [12] Giulio Jori y col. «Photodynamic Therapy in the Treatment of Microbial Infections: Basic Principles and Perspective Applications». En: *Lasers in Surgery and Medicine* 38 (2006), págs. 468-481.
- [13] Agata Wozniak y Mariusz Grinholc. «Combined Antimicrobial Activity of Photodynamic Inactivation and Antimicrobials-State of the Art». En: *frontiers in Microbiology* 9 (2018), págs. 1-19.
- [14] Daniel Ortega Zambrano, D. Fuentes Lopez y H. Mercado Uribe. «Photoinactivation of *E. coli* using five photosensitizers and the same number of photons». En: *Journal of Innovative Optical Health Sciences* (2022).
- [15] R. Khaengraeng y R.H. Reed. «Oxygen and photoinactivation of *Escherichia coli* in UVA and sunlight». En: *Journal of Applied Microbiology* 99 (2005), págs. 39-50.

- [16] Angela M. Jaramillo Granada, A. Reyes Figueroa y J. Ruiz Suárez. «Xenon and Krypton Dissolved in Water Form Nanoblobs: No Evidence for Nanobubbles». En: *Physical Review Letters* (2022), págs. 094501-1 -094501-6.
- [17] World Health Organization. «GLOBAL ACTION PLAN ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE». En: (2015).
- [18] Steven L. Percival y David W. Williams. «Microbiology of Waterborne Diseases». En: Elsevier, 2014, págs. 89-117.
- [19] M Schaechter. «ESCHERICHIA COLI». En: *Bacteria* (2009), págs. 125-132.
- [20] Guadalupe R. Angeles. «Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli». En: *Salud pública de México* 24 (2002), págs. 464-475.
- [21] Raquel Parada Puig. *Bacterias Gram negativas*. Ed. por Lifeder. <https://www.lifeder.com/bacterias-gram-negativas/>.
- [22] Ben Lugtenberg y Loek Van Alphen. «Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia Coli* and other gram-negative bacteria». En: *Biochimica et Biophysica Acta* 737 (1983), págs. 51-115.
- [23] Jesús Ramírez Santos, Gabriel Contreras Ferrat y M. Carmen Gómez Eichelmann. «La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*». En: *Revista Latinoamericana de Microbiología* 47 (2005), págs. 92-101.
- [24] Jue D. Wang. «Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle». En: *Nat Rev Microbiol.* 11 (2009), págs. 822-827.
- [25] William D. Donachie. «THE CELL CYCLE OF ESCHERICHIA COLI». En: *Annu. Rev. Microbiol.* 47 (1993), págs. 199-230.
- [26] Susan Mosquito y col. «MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN Escherichia coli ASOCIADAS A DIARREA». En: *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 4 (2011), págs. 648-56.
- [27] Claudia Moreno, Rubén González y Constanza Beltrán. «Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios». En: *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello* 69 (2009), págs. 185-192.
- [28] E. coli Genome Project. *E. coli K-12 MG1655*. Ed. por University of Wisconsin - Madison. <https://www.genome.wisc.edu/resources/strains.htm>.
- [29] Bac DIve. *E. coli K12 MG1655 is a mesophilic bacterium of the family Enterobacteriaceae*. Ed. por University of Wisconsin - Madison. <https://bacdive.dsmz.de/strain/4902>.
- [30] M. Tajkarimi y col. «The Effect of Silver Nanoparticle Size and Coating on Escherichia coli». En: *JSM Nanotechnology Nanomedicine* 2 (2014), pág. 1025.

- [31] Nadia Gamboa y Walter Leidinger. «El oxígeno singulete». En: *Revista de Química, Pontificia Universidad Católica del Perú* 1 (1897), págs. 43-47.
- [32] Maria E Bulina y col. «A genetically encoded photosensitizer». En: *Nature biotechnology* 24 (2006), págs. 95-99.
- [33] M. Wagner y col. «Methylene blue photodynamic therapy in malignant melanoma decreases expression of proliferating cell nuclear antigen and heparanases». En: *Clinical and Experimental Dermatology* 37 (2012), págs. 527-533.
- [34] Mark Wainwright. «Methylene blue derivatives - suitable photoantimicrobials for blood product disinfection?» En: *International Journal of Antimicrobial Agents* 16 (2000), págs. 381-394.
- [35] PubChem. *Methylene blue (compound)*. Ed. por National Library of Medicine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methylene-blue#section=2D-Structure>.
- [36] Trotec Laser GmgH. *¿Cómo funciona un láser*. Ed. por tro/GROUP. <https://www.troteclaser.com/es/ayuda-y-asistencia/faqs/como-funciona-un-laser>.
- [37] Gabriel Bolivar. *Teoría del orbital molecular*. <https://www.lifeder.com/teoria-del-orbital-molecular/>. 2020.
- [38] Efraín M. Revilla. «Especies Reactivas de Oxígeno, Importancia e Implicación Patológica». En: *Rev Cient Cienc Med* 24.2 (2020), págs. 125-132.
- [39] Noemí Cárdenas y José Pedraza. «Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos». En: *Profesores al día (Biomedicina)* (2005), págs. 164-173.
- [40] Maria C. DeRosa y Robert J. Crutchley. «Photosensitized singlet oxygen and its applications». En: *Coordination Chemistry Reviews* 233-234 (2002), págs. 351-371.
- [41] Nestor Teves. «Los clatratos de metano en los fondos oceánicos». En: *Boletín Instituto del mar de Perú* 31 (2016), págs. 139-141.
- [42] Abdullah Hussein. «Essentials of Flow Assurance Solids in Oil and Gas Operations». En: Gulf Professional Publishing, 2022. Cap. 6.
- [43] Edvard A. Hemmingsen. «Clathrate hydrate of oxygen: does it occur in deep-sea fish?» En: *Deep-Sea Research* 22 (1974), págs. 144-149.
- [44] Robert A. Floyd, J. Edward Schneider y Dirk P. Dittmer. «Methylene blue photoinactivation of RNA viruses». En: *Antiviral Research* 61 (2004), págs. 141-151.
- [45] James F. Papin, Robert A. Floyd y Dirk P. Dittmer. «Methylene blue photoinactivation abolishes West Nile virus infectivity in vivo». En: *Transfus. Med. Rev.* 16 (2002), págs. 61-66.
- [46] Sonia Sabbahi y col. «Inactivation of faecal bacteria in wastewater by methylene blue and visible light». En: *Desalination and Water Treatment* 20 (2010), págs. 209-219.

- [47] Marina N. Usacheva, Matthew C. Teichert y Merrill A. Biel. «The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria». En: *Journal of Photochemistry and Photobiology* 71 (2003), págs. 87-98.
- [48] Bruna Paloma de Oliveira y col. «In Vitro antimicrobial photoinactivation with methylene blue in different microorganisms». En: *Braz J Oral Sci.* 13 (2014), págs. 53-57.
- [49] Pavlo Virych, Petro Virych Oksana Nadtoka y Nataliya Kutsevol. «Antimicrobial photoinactivation with methylene blue of Staphylococcus aureus». En: *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 716 (2021), págs. 123-128.
- [50] Shakir Khan y col. «Photoinactivation of multidrug resistant bacteria by monomeric methylene blue conjugated gold nanoparticles». En: *Journal of Photochemistry Photobiology, B: Biology* 174 (2017), págs. 150-161.
- [51] Irena Maliszewska y col. «Biogenic Gold Nanoparticles Decrease Methylene Blue Photobleaching and Enhance Antimicrobial Photodynamic Therapy». En: *Molecules* 26 (2021).
- [52] Sajid Farooq y col. «Methylene Blue-Mediated Photoinactivation of Staphylococcus aureus Assisted by Gold Nanoshells». En: *Brazilian Congress on Biomedical Engineering* 70/2 (2018), págs. 841-845.
- [53] Zenildo Santos Silva Jr. y col. «Papain gel containing methylene blue for simultaneous caries removal and antimicrobial photoinactivation against Streptococcus mutans biofilms». En: *Scientific Reports* 6 (2016), págs. 1-12.
- [54] R.H. Reed, Maniand S.K. y V. Meyer. «Solar photo-oxidative disinfection of drinking water: preliminary field observations». En: *Lett Appl Microbiol* 30 (2000), págs. 432-436.
- [55] V. Meyer y R.H Reed. «SOLAIR disinfection of coliform bacteria in hand-drawn drinking water». En: *Water* 27 (2001), págs. 49-52.
- [56] Guilherme Hasegawa y col. «Photodynamic inactivation of Escherichia coli by methylene blue and malachite green under red LED light». En: *Rev. Ambient. Água* 10 (2015), págs. 318-326.
- [57] Ian J. Macdonald y Thomas J. Dougherty. «Basic principles of photodynamic therapy». En: *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 5 (2000), págs. 105-129.
- [58] Amir H. Mohammadi y Dominique Richon. «Ice-Clathrate Hydrate-Gas Phase Equilibria for Air, Oxygen, Nitrogen, Carbon Monoxide, Methane, or Ethane + Water System». En: *Ind. Eng. Chem. Res* 49 (2010), págs. 3976-3979.
- [59] Silvia Giono-Cerezo y col. «Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla». En: *GACETA MÉDICA DE MÉXICO* (2019), págs. 172-180.
- [60] Israel Korc, Margarita Bidegain y Miguel Martell. «Radicales libres». En: *Rev Med Uruguay* 11 (1995), págs. 121-135.

- [61] Peter R. Ogilby. «Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun». En: *Chemical Society Reviews* 39 (2010), págs. 3181-3209.
- [62] Gianluca Boso y col. «Time-resolved singlet-oxygen luminescence detection with an efficient and practical semiconductor single-photon detector». En: *Biomedical Optics EXPRESS* 7 (2015), págs. 211-224.
- [63] S.J. Wagner. «Virus inactivation in blood components by photoactive phenothiazine dyes». En: *Antiviral Research* 68 (2005), págs. 84-87.
- [64] P. Desmarchelier y N. Fegan. «ESCHERICHIA COLI». En: *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2002), págs. 948-954.
- [65] Thermo Fisher Scientific. *Singlet Oxygen Sensor Green*. Ed. por Invitrogen. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S36002>.