



UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**“RECUBRIMIENTOS BIOPOLIMÉRICOS ANTIMICROBIANOS Y SU  
USO POTENCIAL EN SUPERFICIES”**

**TESIS**

Para obtener el grado de  
**MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

I.B.I. Jessica Abigail Salazar Posos  
Matrícula: 2223801921  
[jessicasalazar530@gmail.com](mailto:jessicasalazar530@gmail.com)

**Directora de tesis:**

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

**Asesores de tesis:**

Dra. Lilia Arely Prado Barragán

Dr. Roberto Olayo González

**JURADO**

Presidente: Dr. Roberto Olayo González

Secretario: Dr. Manuel Eduardo Martínez López

Vocal: Dra. Rosa Isela Ventura Aguilar

Vocal: Dr. José Carmen Ramírez Ramírez

Iztapalapa, Ciudad de México, 25 de octubre del 2024

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana forma parte del Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto de Procesamiento de Desperdicios Orgánicos del Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. I.B.I. Jessica Salazar Posos agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca de estudios otorgada.

México, CDMX a 25 de octubre del 2024

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la  
tesis

**Recubrimientos biopoliméricos antimicrobianos y su uso potencial en superficies**

que presentó

IBI Jessica Abigail Salazar Posos

**Comité de Tutorial:**

**Directora:**

Dra Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto de Procesamiento de Desperdicios Orgánicos, Departamento de Biotecnología, División Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

**Asesores:**

Dra. Lilia Arely Prado Barragán

Planta Piloto de Fermentación en Medio Sólido, Departamento de Biotecnología, División Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Dr. Roberto Olayo González

Área de Biopolímeros Departamento de Física, División Ciencias Básicas e Ingeniería. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

**H. Jurado:**

**Presidente:**

Dr. Roberto Olayo González

Área de Biopolímeros Departamento de Física. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

**Secretario:**

Dr. Manuel Eduardo Martínez López

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana

**Vocal:**

Dra. Rosa Isela Ventura Aguilar

CONAHCYT-Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional

**Vocal:**

Dr. José Carmen Ramírez Ramírez

Universidad Autónoma de Nayarit

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra Keiko por siempre brindarme su apoyo y guía en cada paso, por compartir conmigo su conocimiento y orientarme cuando me sentía perdida. Gracias por brindarme toda su confianza desde el primer día que llegué, nunca olvidaré sus consejos y enseñanzas.

A mis amigos de la PP10, Andrea, Jenny, Cris y Carlos con ustedes encontré un gran apoyo y hacían que esas horas en el laboratorio parecieran segundos, les agradezco todas las risas, pláticas y comidas, sin duda alguna serán siempre una parte importante de mí, los quiero.

A mi esposo y compañero de vida, Roberto por escucharme cuando más lo necesitaba y alentarme a continuar a pesar de lo difícil que pudo ser, por siempre darme luz cuando todo se me nublabo y ayudarme a cumplir mis sueños, te amo.

A mi madre quien siempre ha sido mi cómplice y mi pilar, siempre estaré agradecida por todo el amor que me has dado y todas las enseñanzas de vida, por creer en mí y alentarme en cada paso.

A mi padre quien siempre me enseñó el valor del trabajo y el esfuerzo, por enseñarme desde pequeña a ser curiosa y saber cómo funcionaban las cosas a mi alrededor, porque siempre estás cuando más te necesito y me amas incondicionalmente.

A mi hermano porque me has demostrado que la perseverancia y la bondad nos llevan lejos, gracias porque desde niños has creído en mí y en todo lo que podría lograr. Gracias por darme a mis dos adorados sobrinos que, aunque sean un remolino, llenan mi corazón de amor. Los amo.

## **DEDICATORIA**

A mis pilares de vida: mis padres, mi hermano y mi esposo, los amo infinitamente. Por último, una dedicatoria especial a mi hija que hoy está en mi vientre escribiendo esta tesis conmigo, llegaste justo en el momento indicado para iluminar mi vida y te amo desde el primer instante que supe de tu existencia.

Para mi amada Athenea.

## ÍNDICE

Índice de figuras .....	7
Abreviaturas .....	8
Resumen.....	9
Abstract.....	10
1. Introducción.....	11
2. Marco teórico .....	12
2.1 Recubrimientos poliméricos .....	12
2.2 Biopolímeros.....	12
2.3 Quitina .....	12
2.4 Quitosano.....	14
2.4.1 Propiedades generales.....	15
2.4.2 Propiedades fisicoquímicas .....	15
2.4.3 Propiedades antimicrobianas .....	15
2.5 Inactivación fotodinámica .....	16
2.5.1 Mecanismo de acción .....	17
2.5.2 Fotosensibilizador.....	18
2.5.3 Fuente de luz.....	19
2.5.4 Especies reactivas del oxígeno.....	20
2.6 Sinergismo y antagonismo .....	22
3. Generalidades y aplicaciones del quitosano y el AM.....	22
4. Justificación.....	23
5. Hipótesis.....	23
6. Objetivo general .....	24
6.1 Objetivos particulares.....	24
7. Materiales y métodos .....	24
7.1 Obtención del quitosano .....	24
7.2 Caracterización del quitosano.....	24
7.2.1 Porcentaje de humedad, cenizas y proteína residual .....	24
7.2.2 Peso molecular .....	25
7.2.3 Grado de acetilación .....	25
7.3 Preparación de unidades experimentales.....	25
7.3.1 Recubrimientos de quitosano .....	25

7.3.2 Soluciones de azul de metileno.....	26
7.3.3 Recubrimientos de quitosano y azul de metileno.....	27
7.4 Pruebas microbiológicas.....	27
7.4.1 Activación y mantenimiento de cepas.....	27
7.4.2 Medición de la actividad antibacteriana.....	27
7.4.3 Expresión de resultados.....	29
7.4.4 Recubrimientos.....	29
7.4.5 Inactivación fotodinámica.....	30
7.5 Determinación del efecto sinérgico.....	31
7.6 Medición de la generación de $^1\text{O}_2$ en solución.....	31
7.7 Medición de la generación de $^1\text{O}_2$ en película.....	31
7.8 Determinación del potencial Z.....	32
8. Resultados y discusión.....	32
8.1 Caracterización del quitosano.....	32
8.2 Pruebas microbiológicas.....	33
8.2.1 Activación y mantenimiento de cepas.....	33
8.2.2 Recubrimientos Q+AM.....	34
8.3 Inactivación fotodinámica y sinergismo.....	38
8.4 Generación de $^1\text{O}_2$ en solución.....	41
8.5 Generación de $^1\text{O}_2$ en película de Q y AM.....	42
8.6 Generación de $^1\text{O}_2$ en los diferentes componentes.....	45
8.7 Potencial Z.....	46
8.8 Mecanismo de acción del recubrimiento.....	47
9. Conclusiones.....	48
10. Perspectivas.....	49
11. Bibliografía.....	50
12. Anexos.....	59

## Índice de figuras

Figura 1. Estructura de la quitina.....	13
Figura 2. Estructura del quitosano.....	14
Figura 3. Reacciones fotodinámicas (Tipo I y tipo II) y vías de muerte celular en el proceso de inactivación fotodinámica.....	17
Figura 4. Estructura química del AM.....	18
Figura 5. Formas oxidadas y reducidas del AM.....	19
Figura 6. Especies reactivas de oxígeno formadas durante la cadena de transporte de electrones.....	21
Figura 7. Reacción del DPBF con el oxígeno singulete.....	22
Figura 8. Recubrimiento en soporte de vidrio después del secado.....	26
Figura 9. Preparación de soluciones de AM.....	26
Figura 10. Soluciones de AM.....	27
Figura 11. Tinción Gram de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 (40x).....	33
Figura 12. Tinción Gram de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 4352 (40x).....	33
Figura 13. UFC/ml recuperadas para cada escala de MF.....	34
Figura 14. Interacción del quitosano con la pared de bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	35
Figura 15. Comparación de las UFC/ml recuperadas en el grupo control sin AA (Control) y con la adición de AA al medio de cultivo.....	35
Figura 16. Comparación del porcentaje de inhibición en recubrimientos con diferentes concentraciones de Q.....	36
Figura 17. Comparación del porcentaje de inhibición de las diferentes concentraciones de AM.....	37
Figura 18. UFC/ml recuperadas del blanco (B) y el blanco expuesto a la luz roja (B+IF)..	38
Figura 19. Porcentaje de inhibición de los diferentes tratamientos sobre <i>K. pneumoniae</i> ..	39
Figura 20. Porcentaje de inhibición de los diferentes tratamientos sobre <i>S. aureus</i> .....	39
Figura 21. Absorbancia del DPBF a diferentes tiempos en la solución.....	41
Figura 22. Generación de $^1O_2$ a diferentes tiempos de irradiación.....	42
Figura 23. Absorbancia del DPBF a diferentes tiempos de irradiación en la película.....	42
Figura 24. Generación de $^1O_2$ en las películas a diferentes tiempos de irradiación.....	43
Figura 25. Absorbancia del DPBF a diferentes tiempos de irradiación en la película.....	43
Figura 26. Tiempo de irradiación contra la absorbancia del DPBF.....	44
Figura 27. Tiempo de irradiación contra la absorbancia del DPBF.....	44
Figura 28. Absorbancia del DPBF para cada elemento de la película.....	45
Figura 29. $^1O_2$ producido por cada elemento de la película.....	46
Figura 30. Potencial Z del quitosano (Q), el azul de metileno (AM) y K (Q+AM).....	46
Figura 31. Mecanismo de unión del recubrimiento y la pared celular de las bacterias.....	47
Figura 32. Generación de $^1O_2$ por el recubrimiento, después de ser expuesto a la luz.....	48

## Abreviaturas

---

Quitosano	Q
Inactivación Fotodinámica	IF
Especies Reactivas de Oxígeno	ROS
Fotosensibilizador	PS
Oxígeno singulete	$^1\text{O}_2$
Azul de metileno	AM
1,3-difenilisobenzofurano	DPBF
Peso molecular	PM
Grado de acetilación	GA
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
McFarland	MF
Ácido acético	AA
Porcentaje de inhibición	I (%)

## Resumen

El aumento de enfermedades por virus y bacterias presentes en diversas superficies han aumentado en los últimos años. Un ejemplo de ello fue durante la pandemia del COVID-19. Por esta razón existe una necesidad apremiante de crear recubrimientos antimicrobianos. El objetivo de esta tesis fue estudiar la técnica de inactivación fotodinámica en la producción de recubrimientos biopoliméricos antimicrobianos.

En este trabajo se combinaron las propiedades del quitosano (Q) con azul de metileno (AM), éste último es un fotosensibilizador (PS) que al ser expuesto a una luz de una longitud de onda de 660 nm (luz roja) es capaz de activarse y junto con el oxígeno molecular formar especies reactivas de oxígeno (ROS).

En conformidad con la JIS Z 2801:2000 y la ISO 22196:2007 se midió la actividad antibacteriana sobre *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Para ello se conformaron 8 diferentes tratamientos que fueron inoculados con cada cepa: i) blanco (B) que se trataba de papel filtro estéril, ii) blanco irradiado con luz roja (B+IF) para descartar algún efecto de la luz sobre la cepa, iii) un recubrimiento de quitosano al 0.05% (Q), iv) el mismo recubrimiento de quitosano pero irradiado (Q+IF), v) un tratamiento con AM al 0.025  $\mu\text{M}$  (AM) que se encontraba sobre papel filtro, vi) el mismo AM pero irradiado (AM+IF), vii) un recubrimiento que estaba compuesto por Q al 0.05% y AM 0.025  $\mu\text{M}$  (Q+AM) y viii) por último este mismo recubrimiento pero irradiado con luz roja (Q+AM+IF).

Con el uso de 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) se determinó la cantidad de oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ) generado en el recubrimiento a los 15 minutos de fotoactivación y su tasa de generación. Por último, se midió el potencial Z de cada componente del recubrimiento en un equipo zeta sizer con la finalidad de establecer las interacciones iónicas.

Se observó un efecto sinérgico entre el Q, AM y la exposición a la luz roja, lo cual fue mostrado con el aumento en el porcentaje de inhibición sobre *S. aureus* (68.6%) y *K. pneumoniae* (97.4%). El recubrimiento generó 0.0246 mmol de  $^1\text{O}_2/\text{l}$  con una tasa de generación de 0.0608 mmol $^1\text{O}_2/\text{min}$ . En cuanto al potencial Z, los tres componentes (Q, AM y Q+AM) presentaron potenciales positivos elevados lo que demuestra una estabilidad en los componentes y además explica cómo interactúan con la pared de las bacterias.

## Abstract

In recent years, the number of diseases caused by viruses and bacteria present on various surfaces has increased. An example of this was during the COVID-19 pandemic. For this reason, there is a pressing need to create antimicrobial coatings. This thesis aimed to study the photodynamic inactivation technique in the production of antimicrobial biopolymeric coatings.

In this work, the properties of chitosan (Q) were combined with methylene blue (AM). The latter is a photosensitizer (PS) that, when exposed to light with a wavelength of 660 nm (red light), can be activated and, together with molecular oxygen, forms reactive oxygen species (ROS).

In accordance with JIS Z 2801:2000 and ISO 22196:2007, the antibacterial activity of *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) was measured. For this, 8 different treatments were inoculated with each strain: a blank (B) that was sterile filter paper, a blank irradiated with red light (B+IF) to rule out any effect of light on the strain, a 0.05% chitosan coating (Q), the same chitosan coating but irradiated (Q+IF), a treatment with 0.025  $\mu\text{M}$  AM (AM) that was on filter paper, the same AM but irradiated (AM+IF), a coating that was composed of 0.05% Q and 0.025  $\mu\text{M}$  AM (Q+AM) and finally this same coating but irradiated with red light (Q+AM+IF).

Using 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF), the amount of singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) generated in the coating at 15 minutes and its generation rate were determined. Finally, each coating component's Z potential was measured in a zeta sizer instrument.

A synergistic effect was observed between Q, AM, and red-light exposure, which was demonstrated by the increase in the percentage of inhibition on *S. aureus* (68.6%) and *K. pneumoniae* (97.4%). The coating generated 0.0246 mmol of  $^1\text{O}_2$  /l with a generation rate of 0.0608 mmol $^1\text{O}_2$ /min. Regarding the Z potential, the three components (Q, AM, and Q+AM) presented high positive potentials, which demonstrated stability in the components and explained how they interact with the wall of the bacteria.

## 1. Introducción

Durante la pandemia de COVID-19 quedó en evidencia que los virus y las bacterias son capaces de sobrevivir en diversas superficies durante días, semanas o incluso meses (Narváez y Ortega, 2014). Además, se ha observado que los microorganismos son capaces de adaptarse rápidamente y crean una resistencia a diversos fármacos como los antibióticos, lo cual constituye un problema mundial de salud pública (Oromí, 2000).

Por esta razón, en los últimos años distintos estudios se han centrado en la búsqueda de nuevas técnicas y materiales que sean capaces de inhibir el crecimiento bacteriano. Una técnica es la inactivación fotodinámica (IF) y un material es el quitosano (Q).

El quitosano es el derivado *N*-desacetilado de la quitina obtenido mediante un proceso de desacetilación homogénea, heterogénea o enzimática (Dumitriu, 2005). Se considera quitosano cuando la reacción de desacetilación de la quitina elimina al menos un 50% de sus grupos acetilo (Lárez, 2006). Algunas de las propiedades del quitosano son: biocompatibilidad, biodegradabilidad, no tóxico, alta capacidad de unión a metales y un amplio espectro en actividad antimicrobiana (Rodríguez et al., 2009).

Por su parte, la IF es una técnica que se basa en la activación de un cromóforo denominado fotosensibilizador (PS), que al ser expuesto a una luz a cierta longitud de onda puede ser activado. Esta exposición provoca la producción de radicales dañinos, como las especies reactivas de oxígeno (ROS), en particular el oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), los cuales son capaces de activar procesos de daño celular y producir la muerte de la misma (Cieplik et al., 2018).

Este trabajo tuvo como objetivo estudiar la técnica de IF en la producción de recubrimientos biopoliméricos antimicrobianos. Como PS se utilizó azul de metileno (AM) un colorante heterocíclico aromático (Sahu et al., 2020) que posee características antimicrobianas y antifúngicas naturales, cuyo potencial tóxico se incrementa con la exposición a luz, debido a que el pico de absorbancia para este tinte es de 600 a 660 nm (Baltazar et al., 2002).

## **2. Marco teórico**

### **2.1 Recubrimientos poliméricos**

El término recubrimiento polimérico involucra la formación de una estructura del polímero directamente en la superficie del objeto que se pretende proteger o mejorar. De esta manera, los recubrimientos llegan a ser parte del producto y permanecen en el mismo durante su uso y consumo (Krochta y De Mulder-Johnson, 1997; Trejo, 2010).

Los recubrimientos tienen un amplio campo de aplicación, como en la industria textil para dar acabados antiarrugas o regular la temperatura de la ropa, en el área médica para proporcionar superficies antimicrobianas a dispositivos biomédicos, en la industria mecánica para proveer acabados que prolongan la durabilidad de superficies metálicas de naves aeroespaciales y vehículos de transporte terrestre, así como en muebles de madera o plástico, paredes y pisos de concreto, entre otros (Navarro-Tovar et al., 2020).

### **2.2 Biopolímeros**

Un polímero es una macromolécula constituida por la unión repetida de muchas unidades moleculares pequeñas, denominadas unidades de repetición o monómeros, que se encuentran unidas entre sí por enlaces covalentes. En los polímeros sintéticos, las unidades son polimerizadas mediante procesos químicos como la adición o la condensación (Sperling, 2006), un ejemplo de ellos es el poliestireno, el cloruro de vinilo y el politereftalato de etileno (PET). Los biopolímeros existen en la naturaleza y algunos son procedentes de rutas metabólicas, por ejemplo, la celulosa, el almidón y la quitina.

Una alternativa a los polímeros que se obtienen a partir del petróleo son los polímeros biodegradables de origen biológico, tales como los derivados del almidón, polímeros celulósicos, ácido poliláctico y polihidroxialcanoatos. Estos atienden a la problemática ambiental que generan los plásticos ya que además de ser biodegradables tienen la ventaja de que son producidos a partir de fuentes renovables (Demirbas, 2007; Nath et al., 2008). Dentro de los biopolímeros que han adquirido un mayor interés en los últimos años se encuentra la quitina y el quitosano.

### **2.3 Quitina**

La quitina (del griego *chiton*, túnica) es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza, después de la celulosa, encontrándose principalmente en el exoesqueleto de

artrópodos (insectos, crustáceos, arácnidos y miriápodos), así como en anélidos y moluscos. Además, se ha reportado la presencia de este polisacárido en bajas concentraciones en la pared celular de algunos hongos fitopatógenos como es el caso de *Fusarium solani* (Paz-Lago et al., 1999), *Rhizopus oryzae* (Yu y Hang, 1989; Wei et al., 2008) y hongos del orden de los Mucorales. Asimismo, es un importante componente en hongos filamentosos de la clase de los Zygomycetos (Bartnicki-García et al., 1970; Zamani et al., 2007).

La quitina es un polisacárido lineal constituido por residuos de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) o 2-acetamido-2 desoxi-beta-D-glucosa (Figura 1), enlazados entre sí por enlaces glicosídicos  $\beta$ -1-4. Es un polisacárido cristalino de tonalidad blanca-amarillenta, rígido y no elástico (Shahidi et al., 1999). En la naturaleza se presenta en tres formas cristalinas,  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ - con diferentes orientaciones de fibrillas, dentro de las cuales, la forma  $\alpha$ -cristalina es la más abundante (Sajomsang y Gonil, 2010; Zhang et al., 2000).

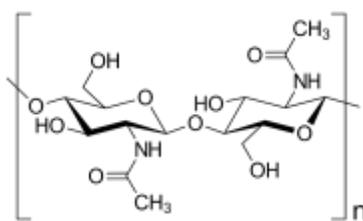


Figura 1. Estructura de la quitina.

Se han establecido varios métodos para la producción de quitina a partir de sus fuentes naturales. Estos procesos involucran fundamentalmente el tratamiento con ácidos para lograr la desmineralización de los materiales y el tratamiento con álcali para separar las proteínas (Hong y Samuel, 1995).

Estas técnicas utilizan grandes cantidades de agua, energía, ácidos y álcalis en altas concentraciones lo que dificulta la recuperación de productos de alto valor agregado como proteínas y pigmentos. Para la extracción de quitina, el uso de métodos biotecnológicos como la fermentación ácido láctica (FAL) permite recuperar productos de alto valor agregado (Gimeno et al., 2007). Después de realizar la FAL, la concentración y la cantidad de ácidos y álcalis empleados para la purificación de la quitina disminuyen significativamente (Shirai et al., 2001; Cira et al., 2002).

## 2.4 Quitosano

El quitosano (Q) es mucho menos abundante en la naturaleza que la quitina, pudiéndose encontrar sólo en la pared celular de ciertos hongos y algunas plantas (Shirai et al., 1996). Es el derivado *N*-desacetilado de la quitina, compuesto principalmente de glucosamina (2-amido-2-desoxi-beta-D-glucosa) (Shahidi et al., 1999), unidos mediante enlaces glucosídicos  $\beta$ - 1-4 (Figura 2).

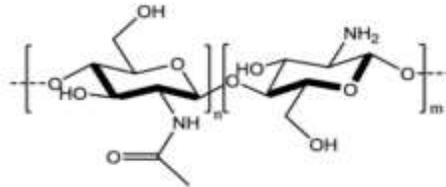


Figura 2. Estructura del quitosano.

Tiene tres grupos funcionales reactivos, un grupo amino y dos grupos hidroxilo en C-3 y C-6; la modificación química de éstos incrementa la biofuncionalidad de los productos de la molécula, ya sea la conformación original o nuevas estructuras (Hirano, 1999).

La producción comercial de quitosano se lleva a cabo empleando como materia prima quitina debido a la relación química que guardan entre sus estructuras, mediante un proceso de desacetilación homogénea, heterogénea o enzimática (Dumitriu, 2005).

En la reacción homogénea se suspende la quitina en un medio álcali a una temperatura inferior a los 4°C para poder solubilizar la quitina, posteriormente se deja a temperatura ambiente por un largo periodo de tiempo, generando homogeneidad en la reacción, sin embargo, la distribución de los grupos acetil a lo largo de la cadena es arbitraria (Nemtsev et al., 2002).

La reacción heterogénea se utiliza en la industria y en esta se dispersa la quitina en un medio álcali caliente por periodos de tiempo cortos para evitar la despolimerización. El quitosano que se obtiene generalmente presenta polidispersión en el grado de desacetilación (Giraldo, 2015).

Por su parte, en el método enzimático se utiliza la enzima quitina-desacetilasa que cataliza la reacción de conversión de los monómeros 2-acetilamina-2-desoxi- $\beta$ -D-(+)-Glucopiranososa a 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-Glucopiranososa (Valenzuela, 2006). Se considera quitosano cuando

la reacción de desacetilación de la quitina elimina al menos un 50% de sus grupos acetilo (Lárez, 2006).

#### 2.4.1 Propiedades generales

- **Biocompatible.** Material capaz de interactuar con los tejidos de un sistema vivo sin causar daños, efectos tóxicos o reacciones biológicas por parte del huésped que lo aloja (Dash et al., 2011; Goycoolea et al., 2000).
- **Biodegradable.** Material que no genera productos dañinos como resultado de su degradación. Los enlaces  $\beta(1\rightarrow4)$  de la quitina y el quitosano son degradados *in vivo* por la enzima lisozima presente en el organismo humano (Sashiwa et al., 1990, Shigemasa et al., 1994) y los subproductos de degradación se incorporan fácilmente a distintas rutas metabólicas o son excretados (Dinesh y Alok, 2000).
- **No tóxico o de baja toxicidad.** Presenta una baja toxicidad lo que lo hace un biomaterial ideal para una gran cantidad de usos y aplicaciones en medicina, industria, etc. (Cheng et al., 2014; Mahoney et al., 2016; Mahdavi et al., 2016).
- **Acción antibacteriana de amplio espectro.** La actividad antimicrobiana del quitosano depende del microorganismo, pero lo más ampliamente extendido es que tiene un efecto inhibitorio (Bautista-Baños, 2016; Oliveira et al., 2012; Peña et al., 2013).

#### 2.4.2 Propiedades fisicoquímicas

El quitosano es soluble en soluciones acuosas de ácidos orgánicos e inorgánicos al igual que en soluciones alcohólicas ácidas, cuando el pH se encuentra por debajo de 6. Es insoluble en agua, soluciones alcalinas y disolventes orgánicos puros. Es muy estable y poco sensible a la humedad, se descompone a temperaturas mayores de 185 °C (Ravi et al., 2004). Su pureza, grado de desacetilación, peso molecular, viscosidad y estructura polimórfica varían de acuerdo con su proceso de producción (Goosen, 1997).

#### 2.4.3 Propiedades antimicrobianas

La acción antimicrobiana del quitosano está influenciada por diversos factores como: método de obtención peso molecular, pH del medio de cultivo, condiciones ambientales, el hospedero, la composición química y nutritiva del sustrato, grado de despolimerización y la

presencia o ausencia de sustancias que interfieran como lípidos y proteínas (Rabea et al, 2003). Se ha observado que existe una relación entre la capacidad antimicrobiana del quitosano y el grado de desacetilación que presenta, siendo a mayor grado, mayor actividad antibacteriana, tanto contra Gram positivas como negativas (Hernández-Téllez et al., 2016).

El mecanismo de acción antibacteriana que ejerce el quitosano ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, el mecanismo comúnmente aceptado es que la naturaleza policatiónica del quitosano se debe a la presencia de los grupos amino ( $\text{NH}_3^+$ ) de la glucosamina y podría ser una característica clave de su capacidad para interactuar con los componentes de la superficie cargados negativamente de muchos microorganismos, causando amplias alteraciones en la superficie celular cargada negativamente, lo que lleva a fuga de constituyentes intracelulares que resulta en la muerte celular (Ganan, 2009).

Por su parte Raafat et al. (2008) demostraron que la interacción del quitosano con los polímeros de la superficie celular, como los ácidos lipoteicoicos anclados a la membrana, interfiere con los procesos dinámicos que ocurren en la membrana citoplasmática alterando su funcionamiento óptimo; lo cual resulta en la fuga de pequeños componentes celulares sin formación de poros.

## **2.5 Inactivación fotodinámica**

La inactivación fotodinámica (IF) antimicrobiana, es una técnica que se basa en la activación de un cromóforo denominado fotosensibilizador (PS), que al ser expuesto a una luz a cierta longitud de onda puede ser activado. Esta exposición provoca la producción de radicales dañinos, tal como las especies reactivas de oxígeno (ROS) y en particular el oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ), los cuales son capaces de activar procesos de daño celular, como la muerte (Cieplik et al., 2018).

Para que ocurra una reacción fotodinámica, se requieren tres elementos básicos (Issa y Manela-Azulay, 2010):

1. Un PS es una molécula fotosensible capaz de localizarse en una célula o en un tejido diana;
2. Una fuente de luz con longitudes de onda específicas requeridas para activar el agente fotosensibilizante;

3. Oxígeno molecular, esencial para la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

### 2.5.1 Mecanismo de acción

Cuando se dirige la luz hacia el PS, éste absorbe un fotón, pasa a un estado triplete y posteriormente por la presencia de oxígeno molecular se produce oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) y otras especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales pueden dañar todo tipo de moléculas, como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y, por lo tanto, inducir muerte celular (Broekgaarden et al., 2015). Se conocen dos mecanismos de producción de ROS cuando el PS se encuentra en estado triplete (Kashef et al., 2017), estos son:

Reacción tipo I: implican reacciones de transferencia de electrones que forman iones radicales y radicales libres, tales como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidróxilo.

Reacción tipo II: se deriva de la transferencia de energía del PS al oxígeno molecular en estado triplete ( $^3O_2$ ), lo que lleva a la producción de  $^1O_2$  que es altamente tóxico (Figura 3).

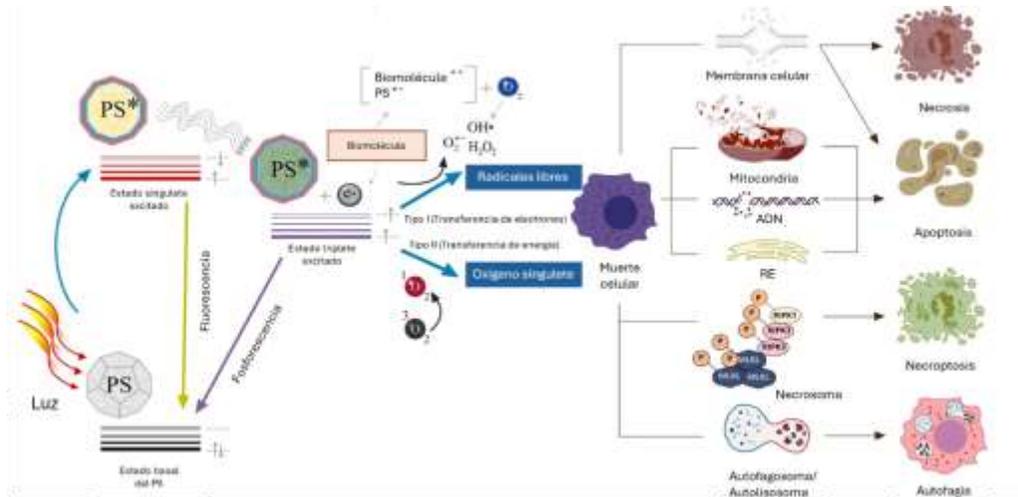


Figura 3. Reacciones fotodinámicas (Tipo I y tipo II) y vías de muerte celular en el proceso de inactivación fotodinámica (Sai et al., 2021).

Tanto el mecanismo tipo I como el II se pueden desencadenar simultáneamente y la relación entre los procesos dependerán de las características del PS, así como las concentraciones de sustrato y oxígeno (Tao et al., 2013).

### 2.5.2 Fotosensibilizador

Un fotosensibilizador (PS) se caracteriza por tener una alta solubilidad en agua, mínima toxicidad, un potencial mutagénico bajo o nulo, y una alta estabilidad química. Además, debe ser capaz de acumularse en el objetivo específico (tejido o célula) y eliminarse fácilmente después de ser administrado para evitar la fotosensibilización prolongada (Cieplik et al., 2018).

Existe un gran número de PS aprobados por Organismos Internacionales de Salud y otros más en diferentes fases de investigación clínica. Principalmente se trata de estructuras orgánicas cíclicas de gran tamaño con enlaces conjugados.

Según su estructura química, los agentes fotosensibilizadores se clasifican en 3 familias: porfirinas, clorinas y ftalocianinas. Por otra parte, se pueden clasificar por sus propiedades de distribución, selectividad y excreción, siendo así de primera, segunda y tercera generación (Taylor et al., 2011).

#### Azul de metileno

El azul de metileno (AM) es un colorante heterocíclico aromático (Sahu et al., 2020) que tiene un peso molecular de 319.85 g/mol y una fórmula molecular -  $C_{16}H_{18}N_3ClS$ . Su nombre químico, según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), es [cloruro de 3,7-bis(dimetilamino) fenotiazina cloruro de tetrametilitionina]. La estructura de la molécula se muestra en la Figura 4. El colorante AM tiene un pKa de 3.8 (Bayomie et al., 2020; Sousa et al., 2019), es soluble en metanol, 2-propanol, agua, etanol, acetona y acetato de etilo (Salimi y Roosta, 2019). Su solubilidad en agua es de 43,6 g/L a 25 °C (Pham et al., 2020). El punto de fusión de AM está en el rango de 100 a 110 °C (Nasrullah et al., 2015).

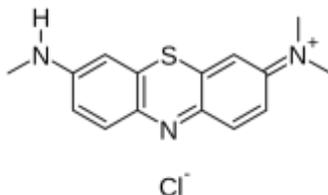


Figura 4. Estructura química del AM.

El AM tiene un color azul intenso característico en estado oxidado y es incoloro en su forma reducida (Figura 5).

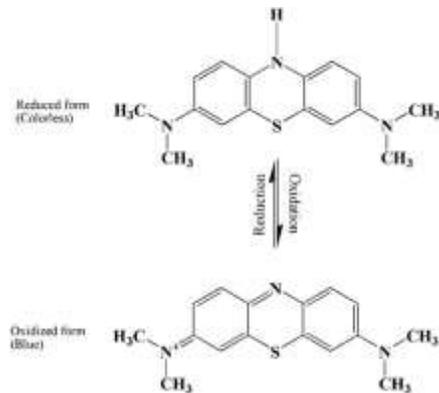


Figura 5. Formas oxidadas y reducidas del AM.

Posee características antimicrobianas y antifúngicas naturales, cuyo potencial tóxico se incrementa con la exposición a luz; su pico de absorbancia es de 600 a 660 nm (Baltazar et al., 2002) por lo que es utilizado eficazmente como fotosensibilizador de la terapia fotodinámica en estudios sobre *Candida albicans* y otros microorganismos patógenos de la cavidad bucal (Peloi et al., 2002; Wainwright, 2010; Gordillo y Montero, 2002).

### **Mecanismo de acción antiséptica del AM**

Las mitocondrias son los orgánulos que sirven como fuente de producción de especies reactivas de oxígeno, cualquier alteración en el funcionamiento de éstas, se asocia con una alteración de la homeostasis redox de la célula (Thomas et al., 2013). Por tal motivo, en el año 2016 Ansari et al. realizaron experimentos sobre *Candida albicans* para probar la disfunción mitocondrial en presencia de AM mostrando que la actividad antifúngica de éste se encuentra relacionada con la alteración en el estado redox de la membrana. Por otra parte, se verificó el contenido de ergosterol, un componente importante de la estructura de la membrana, observando una reducción del 66% en las células tratadas con AM.

Finalmente se evaluó el efecto del AM sobre la transición de levadura a pseudomicelio, un atributo de virulencia importante para establecer la infección, demostrando que el AM podría inhibir eficientemente dicha formación en comparación con las células del control que fueron capaces de expresar los filamentos en condiciones similares.

### **2.5.3 Fuente de luz**

La IF requiere una fuente de luz que active el fotosensibilizador mediante la exposición a luz visible de baja potencia en una longitud de onda específica. La mayoría de los fotosensibilizadores se activan con luz roja entre 630 y 700 nm (Salva, 2020). Se han probado tres tipos de fuentes de luz: luz coherente, como los láseres, no coherente como

los diodos emisores de luz y las lámparas de descarga de gas (Calin y Parasca, 2009; Nyman y Hynninen, 2004). Los láseres suministran la luz en un solo tono y pueden ajustarse con fibra óptica, sin embargo, tienen la desventaja de tener un costo alto. En contraste, los LEDs son menos costosos y tienen un espectro de emisión más amplio (Wilson y Patterson, 2008).

#### **2.5.4 Especies reactivas del oxígeno**

Cuando se habla de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés “*reactive oxygen species*”) se refiere tanto a radicales libres que contienen oxígeno como a derivados que sin ser radicales libres son muy reactivos como ellos. Tal es el caso de: anión peróxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el anión hidróxilo ( $OH^-$ ) (Lozano y Fernández, 2020).

La producción de pequeñas cantidades de ROS forma parte del metabolismo celular actuando como regulador intracelular cuando se generan de forma controlada en puntos concretos de la célula. Un ejemplo de ello es en la cadena de transporte de electrones, la cual es la principal fuente de adenosín trifosfato (ATP) en las células de los mamíferos. Durante la transducción de energía ocurre una pequeña fuga de electrones en el complejo I y el complejo III, lo cual conduce a la reducción parcial del oxígeno para formar superóxido ( $O_2^-$ ) (Figura 6). Se ha estimado que del 0.2% a 2.0% de  $O_2$  consumido por las mitocondrias genera  $O_2^-$  (Madamanchi y Runge, 2007).

Hay tres eventos de fuga: el complejo I fuga  $O_2^-$  hacia la matriz mitocondrial, mientras que el complejo III fuga  $O_2^-$  tanto hacia el espacio intermembrana como hacia la matriz mitocondrial (Han et al., 2003; Madamanchi y Runge, 2007). Posteriormente, el  $O_2^-$  se dismuta rápidamente a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por dos enzimas dismutasas, incluida la superóxido dismutasa 2 (SOD2) en la matriz mitocondrial y la superóxido dismutasa 1 (SOD1) en el espacio intermembrana mitocondrial. Posteriormente, el  $H_2O_2$  se reduce completamente a agua mediante la enzima glutatión peroxidasa (GPX) evitando así el daño por ROS (Li et al., 2013).

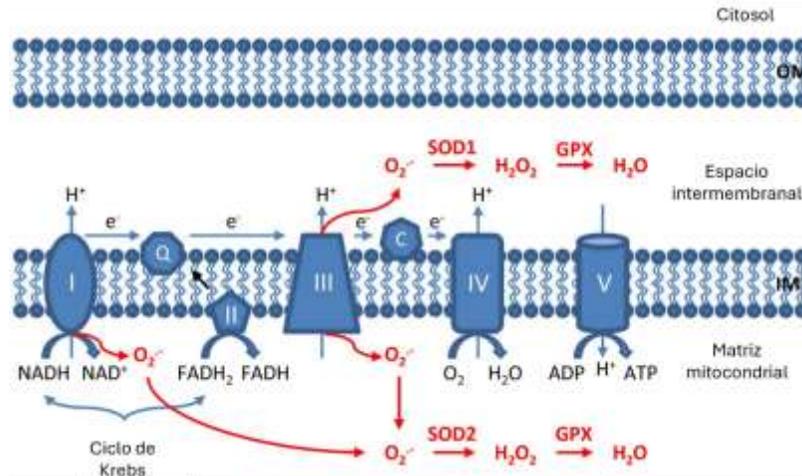


Figura 6. Especies reactivas de oxígeno formadas durante la cadena de transporte de electrones (Li et al., 2013).

Sin embargo, la producción incontrolada de ROS altera o destruye componentes celulares y modifica la expresión de genes (Dröge, 2002; Lushchak, 2014; Schieber y Chandel, 2014). Los efectos producidos por las ROS dependen de la intensidad, la duración y el microentorno. Un pequeño aumento en un punto concreto de la célula sirve como regulador intracelular para activar alguna función biológica. Por el contrario, una elevación transitoria o crónica desencadena una respuesta oxidativa que es propia de estados patológicos (Winterbourn y Hampton, 2008; Lushchak, 2014). Por esta razón, las células cuentan con mecanismos antioxidantes tanto enzimáticos, que actúan directamente sobre las ROS tóxicas, como no enzimáticos que actúan para dar origen a moléculas más estables que se metabolizan o excretan para proteger a la célula de la potencial toxicidad de las ROS.

### Oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ )

El oxígeno molecular singlete se descubrió en el año 1924, no obstante, el interés en esta especie comenzó en 1963 cuando Khan y Kasha concluyeron que la quimioluminiscencia roja observada de la reacción del hipoclorito-oxígeno correspondía a la generación de oxígeno molecular singlete.

El  $^1\text{O}_2$  es oxígeno en estado electrónico activado. Éste se puede producir cuando el oxígeno molecular se activa por radiación (luz). El mecanismo de activación del oxígeno se genera por la transmisión de energía que proviene de una molécula colorante. Ésta absorbe la luz ultravioleta o visible y transfiere su energía al oxígeno funcionando como sensibilizador y desactivándose al mismo tiempo.

### Detección del $^1\text{O}_2$ con DPBF

El 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) es una molécula fluorescente que posee una reactividad muy específica frente al oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ), formando un endoperóxido que se descompone para dar 1,2-dibenzoilbenceno (Figura 7). Este cambio provoca la incapacidad del producto para absorber o emitir luz visible. Por lo tanto, la reducción de la absorbancia o la intensidad de la fluorescencia del DPBF reflejan la cantidad de  $^1\text{O}_2$  generado (Xian-Fu y Xiaoli, 2011).

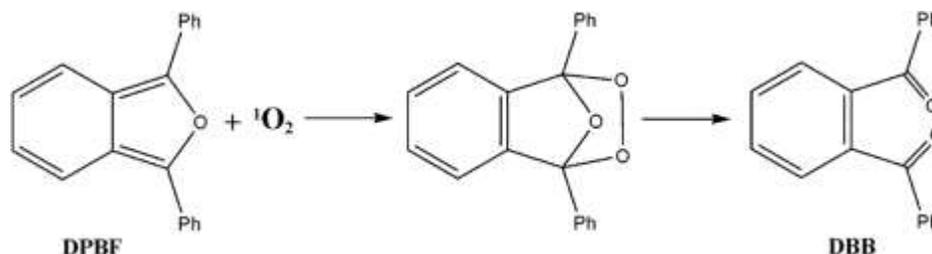


Figura 7. Reacción del DPBF con el oxígeno singulete (Xian-Fu y Xiaoli, 2011).

El DPBF absorbe fuertemente la luz alrededor de 410 nm y emite una fluorescencia azulada brillante, lo que permite su medición mediante espectroscopía UV-Vis. La medición de la absorbancia UV-Vis es simple, rápida y el método más utilizado. La espectroscopia UV-Vis es algo menos sensible que la espectroscopia de fluorescencia. Sin embargo, la espectroscopia UV-Vis es menos propensa a los artefactos, ya que el espectro de absorción de un compuesto con un alto coeficiente de absorción no puede estar dominado por pequeñas cantidades de contaminantes (Takajo y Anzai, 2020).

### 2.6 Sinergismo y antagonismo

El sinergismo es un indicativo de que la actividad conjunta de dos antimicrobianos es superior a la suma de la actividad individual de cada antimicrobiano. El antagonismo, es contrario al sinergismo, la actividad de dos antimicrobianos juntos es significativamente menor a la suma de la actividad individual de estos antimicrobianos (De la Fuente-Salcido et al., 2015). El propósito del estudio del sinergismo en las combinaciones antimicrobianas es potenciar su aplicación para disminuir el desarrollo de la resistencia en los microorganismos (Ängeby et al., 2012).

### 3. Generalidades y aplicaciones del quitosano y el AM

El Q ha sido ampliamente estudiado en su uso como recubrimiento sobre diversas superficies. Renbutsu et al. (2008) utilizaron al Q para adsorber paladio y recubrir equipos metálicos para reducir la interferencia electromagnética. Heuser y Cárdenas (2014)

formularon una pintura con Q, cobre y hierro que sirvió como reemplazo de pinturas antiincrustantes tradicionales, las cuales contaminan las aguas marinas.

Tamayo (2014) consiguió depositar una película de Q cargada de ciprofloxacino sobre un catéter venoso central, aportando una doble protección contra *Staphylococcus aureus*. Por su parte Shirai et al. (2022) combinaron el Q con un complejo aniónico proteína/polisacárido ( $\beta$ -lactoglobulina/pectina) para la conservación postcosecha de frutas y hortalizas.

En cuanto al uso de Q y AM en conjunto, Salehi y Farani (2017) demostraron que el AM puede interactuar con los grupos funcionales del quitosano mediante interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno.

Hablando sobre el AM en su uso como fotosensibilizador López-Chicón et al. (2016) demostraron una total de mortandad celular de *Trichophyton mentagrophytes* con 100  $\mu$ M e irradiando durante 90 min. Ríos et al. (2022) evaluaron la efectividad antimicrobiana sobre *Candida albicans* de la IF con AM, mostrando una reducción de UFC superiores a la aplicación de sustancias antifúngicas.

Por último, con la pandemia de COVID-19 surgieron nuevas investigaciones demostrando que el tratamiento fotoquímico de superficies con AM es eficaz para matar patógenos como el SARS-CoV-2 (Lendvay et al., 2022).

#### **4. Justificación**

Las diversas propiedades que se han descubierto en el quitosano y la inactivación fotodinámica lo convierten en un tema de gran potencial y relevancia.

Aunado a lo anterior y con el aumento en las enfermedades ocasionadas por virus y bacterias, existe la necesidad apremiante de crear materiales capaces de eliminar patógenos. Por estas razones se ha planteado la elaboración y estudio de recubrimientos antimicrobianos aplicado a diversas superficies.

#### **5. Hipótesis**

El efecto sinérgico entre las ROS producidas durante la activación fotodinámica y el quitosano inhibirán el desarrollo de bacterias.

## **6. Objetivo general**

Estudiar la técnica de activación fotodinámica en la producción de recubrimientos biopoliméricos antimicrobianos

### **6.1 Objetivos particulares**

- Diseñar y caracterizar recubrimientos biopoliméricos que presenten actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas
- Determinar la formación de ROS por el proceso fotodinámico
- Postular un posible mecanismo de acción antimicrobiana con base en la carga neta superficial de los recubrimientos y la producción de ROS

## **7. Materiales y métodos**

### **7.1 Obtención del quitosano**

Se utilizó como materia prima una quitina pura proveniente de una fermentación ácido-láctica de camarón (*Litopenaeus vannamei*) con *Lactobacillus plantarum*. El quitosano se obtuvo mediante el método termoquímico heterogéneo en donde se desacetiló la quitina con una solución de NaOH al 50% (p/v) en una relación de 1g quitina por cada 15 ml de NaOH en un reactor agitado enchaquetado a 100°C durante 2 horas (Pacheco, 2010). Transcurrido el tiempo, el quitosano fue lavado con agua corriente hasta su neutralidad y posteriormente secado a 40 °C durante 24 horas (Rocha-Pino et al., 2008).

### **7.2 Caracterización del quitosano**

#### **7.2.1 Porcentaje de humedad, cenizas y proteína residual**

El contenido de humedad se determinó de acuerdo con el método de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (A.O.A.C., 1990 por sus siglas en inglés) para lo cual se pesaron 2g de muestra en un crisol de porcelana, previamente sometido a peso constante. Posteriormente la muestra se colocó dentro de una estufa convencional (Lab-line, U.S.A) a 100 °C por 12 h. Después las muestras fueron calcinadas y colocadas en una mufla (ISBLinderberg, México) a 550 °C durante 12 h para la cuantificación de cenizas. El porcentaje de humedad y cenizas fue calculado por diferencia de peso de la muestra al inicio y al final de cada proceso.

La proteína residual se calculó determinando el nitrógeno total. Las muestras fueron digeridas en tubos de digestión tipo Kjeldahl de 300 ml, empleando una unidad de digestión Büchi B-426 que fue conectada a un lavador de gases Büchi B-412 para atrapar los vapores de trióxido de azufre (SO<sub>3</sub>). La destilación de las muestras digeridas se realizó en una unidad Büchi B-323 (Espíndola, 2017).

### 7.2.2 Peso molecular

El peso molecular (PM) promedio se determinó indirectamente por medio de su viscosidad intrínseca ( $\eta$ ). El quitosano fue disuelto a diferentes concentraciones en ácido acético 2% y acetato de sodio 0.2M. La  $\eta$  fue determinada mediante un viscosímetro tipo Oswald sumergido en agua a temperatura ambiente (25°C), el PM se calculó mediante la ecuación de Mark–Houwink-Sakurada (ecuación 1) donde  $K = 1.38 \times 10^{-5}$  L/g y  $a = 0.85$  (Kjoniksen et al., 1997; Pacheco, 2010).

$$\eta = KMv^a \dots\dots(1)$$

### 7.2.3 Grado de acetilación

El grado de acetilación (GA), se determinó mediante Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMNH) en un espectrómetro (Bruker Advance III 500, Alemania) a 500 MHz para H<sup>1</sup>. Con los espectros de RMN, se obtuvieron las áreas correspondientes al grupo metilo y los masivos A y B, integrando las curvas con el programa “Spinworks” (V2.5.5) (Pacheco, 2010). Consecutivamente, los valores de las áreas obtenidos se sustituyeron en la ecuación 2:

$$\%GA = \left[ \frac{\frac{1}{3}A_{CH_3}}{\frac{1}{6}\sum_{i=2}^6 AH_i} \right] * 100 \dots\dots\dots(2)$$

## 7.3 Preparación de unidades experimentales

### 7.3.1 Recubrimientos de quitosano

Se preparó una solución madre de quitosano al 1.5% (p/v) en solución de ácido acético 0.1 M en agitación magnética constante durante 5 días. Transcurrido el tiempo, se filtró en un tamiz No. 100 para eliminar el quitosano insoluble (Corona-Suárez, 2011). Utilizando la ecuación 3, en matraces aforados de 100 ml se agregó la cantidad respectiva de la solución madre de quitosano para obtener 3 diferentes concentraciones (0.05, 0.25 y 1.15 %) utilizando ácido acético 0.1 M como diluyente.

$$C_1V_1 = C_2V_2 \dots\dots\dots (3)$$

Las soluciones fueron esterilizadas en un autoclave a 121 °C durante 10 min. Los recubrimientos fueron obtenidos mediante “casting” en placas de cultivo celular, las cuales contenían 12 portaobjetos que sirvieron como soporte para obtener películas planas. A cada placa se le adicionaron 100 ml de cada concentración y fueron secadas durante 24 horas a 45 °C.

Para cada concentración de quitosano (0.05%, 0.25% y 1.15%) se obtuvieron 12 portaobjetos recubiertos con una medida de 7.5 cm x 2.5 cm (Figura 8).



Figura 8. Recubrimiento en soporte de vidrio después del secado.

### 7.3.2 Soluciones de azul de metileno

Se preparó una solución madre de azul de metileno en una concentración de 1.5 mM y utilizando la ecuación 3, se determinó el volumen necesario para cada nivel de AM (0.025, 0.05, 0.1, 1, 50, 75 y 100 $\mu$ M). Las soluciones fueron esterilizadas en autoclave a 121°C durante 10 min y almacenadas en obscuridad hasta su uso. Se obtuvieron 25 ml de cada concentración de AM (0.025, 0.05, 0.1, 1, 50, 75 y 100  $\mu$ M) en matraces aforados (Figura 9).



Figura 9. Preparación de soluciones de AM.

Las soluciones de 50, 75 y 100  $\mu\text{M}$  presentaban una coloración azul intensa, mientras que para el resto de las soluciones el color parecía imperceptible, tal como se muestra en la Figura 10.



Figura 10. Soluciones de AM, de izquierda a derecha se encuentran las soluciones de 50, 75 100, 1 y 0.1  $\mu\text{M}$ .

### **7.3.3 Recubrimientos de quitosano y azul de metileno**

Mediante el uso de la ecuación 3, se calculó la cantidad necesaria de Q y AM para preparar un recubrimiento al 0.05% de Q y 0.025  $\mu\text{M}$  de AM, posteriormente fueron transferidas a un matraz aforado de 100 ml el cual fue aforado con ácido acético 0.1M. Las soluciones fueron esterilizadas a 121°C durante 10 min. Los recubrimientos fueron obtenidos mediante “casting” en placas de cultivo celular, como fue descrito anteriormente. Por cada placa se obtuvieron 12 portaobjetos recubiertos.

## **7.4 Pruebas microbiológicas**

### **7.4.1 Activación y mantenimiento de cepas**

Las cepas utilizadas fueron *S. aureus* ATCC 6538 y *K. pneumoniae* ATCC 4352. Para corroborar el tipo de bacterias se realizaron tinciones Gram a ambas cepas.

Los microorganismos fueron preservados en glicerol al 30% en una proporción 1:1 de caldo nutritivo a -85°C hasta su uso. Cuando fue necesaria su activación, éstas fueron sembradas en Agar Lethen modificado.

### **7.4.2 Medición de la actividad antibacteriana**

Cada recubrimiento fue sometido a pruebas microbiológicas conforme a la JIS Z 2801:2000 “Productos antimicrobianos: prueba de actividad y eficacia antimicrobiana” y la ISO 22196:2007 “Medición de la actividad antibacteriana en superficies plásticas”, con algunas modificaciones. A continuación, se describe brevemente el procedimiento.

## **Procedimiento**

### **1.1 *Precultivo de bacterias***

Con un asa de inoculación estéril, se transfirieron las bacterias a un medio de cultivo inclinado y se incubaron a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 16 a 24 horas.

### **1.2 *Preparación de las muestras de ensayo***

La inoculación se realizó en seis especímenes de cada material de prueba tratado; 3 fueron utilizados para la recuperación inmediata de bacterias y las otras 3 fueron incubadas.

### **1.3 *Preparación del inóculo de prueba***

Se transfirieron con un asa de inoculación estéril unas asadas del precultivo a un matraz con 100 ml de caldo nutritivo 1:500, hasta obtener la escala de McFarland (MF) deseada.

### **1.4 *Inoculación de muestras de ensayo***

Se colocó cada muestra del paso 1.2 en una caja Petri estéril y se inocularon con 0.3 ml del inóculo de prueba. Posteriormente se cubrió el inóculo con un trozo de Parafilm para esparcirlo sobre la superficie de la muestra.

### **1.5 *Recuperación inmediata de bacterias***

En un frasco copro estéril con 50 ml de caldo digerido de caseína de soya con lecitina y monooleato de sorbitán polioxietilenado (caldo SCDLP), se depositó cada muestra y se lavó completamente hasta desprender el Parafilm.

### **1.6 *Determinación de bacterias viables de la recuperación inmediata***

Se realizaron 8 diluciones seriadas y se sembró 0.5 ml de cada dilución en cajas Petri con agar de soya tripticaseína por triplicado. Posteriormente se incubaron a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  de 40-48 horas. Por último, se contó el número de colonias que se encontraban dentro el intervalo de 30-300 colonias

### **1.7 *Incubación de las muestras de ensayo inoculadas***

Las cajas Petri inoculadas se incubaron a una temperatura de  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  y una humedad relativa superior al 90% durante  $24 \pm 1$  horas.

### **1.8 *Recuperación de bacterias***

En un frasco copro estéril con 50 ml de caldo SCDLP, se depositó cada muestra y se lavó completamente hasta desprender el Parafilm.

### **1.9 *Determinación de bacterias viables después de la incubación***

Se realizaron 8 diluciones seriadas y se sembró 0.5 ml de cada dilución en cajas Petri con agar de soya tripticaseína por triplicado. Posteriormente se incubaron a

35±1 °C de 40-48 horas. Finalmente, se contó el número de colonias que se encontraban dentro el intervalo de 30-300 colonias

### 7.4.3 Expresión de resultados

#### 1.1 Determinación del número de bacterias viables

Para cada muestra, se determinó el número de bacterias viables recuperadas, de acuerdo con la ecuación 4:

$$N = (100 * C * D * V) / A \dots\dots(4)$$

En donde *N* es el número de bacterias viables recuperadas por cm<sup>2</sup> por muestra, *C* es el recuento promedio de placas para las placas duplicadas, *D* es el factor de dilución de las placas contadas, *V* es el volumen, en ml, de SCDLP añadido a la muestra y *A* es el área superficial, en mm<sup>2</sup>, de la película de cubierta.

#### 1.2 Porcentaje de inhibición

El porcentaje de inhibición (*I*(%)) se determinó de acuerdo con la ecuación 5:

$$I(\%) = ((\frac{UFC}{mL} control - \frac{UFC}{mL} tratamiento) / UFC / mL control) * 100 \dots\dots\dots(5)$$

### 7.4.4 Recubrimientos

#### **Evaluación del tamaño de inóculo sobre el crecimiento bacteriano en recubrimientos de Q**

Debido a los múltiples reportes que señalan al Q y al AM como antibacterianos, primero se buscó el tamaño de inóculo en donde se obtuviera un conteo de bacterias en la recuperación inmediata, conforme a lo señalado por JIS y la ISO. Para ello, se probaron 3 diferentes escalas de MF, las cuales son presentadas en la Tabla 1 junto con las UFC/ml a las que corresponden.

Tabla 1. Escalas de MF y su equivalente en UFC/ml.

Escala de MF	UFC/ml
0.5	1.5x10 <sup>8</sup>
1	3x10 <sup>8</sup>
3	9x10 <sup>8</sup>

### **Efecto antimicrobiano del ácido acético**

Se tienen reportes que el ácido acético en concentraciones de 2.5% y 0.1% es capaz de restringir el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli* respectivamente (Yagnik et al., 2018). Por esta razón, para descartar que el efecto antimicrobiano sea debido a la adición de ácido acético (AA) a los diferentes recubrimientos se realizó un experimento en donde se inocularon 12 cajas Petri, cada una con 0.5 ml del inóculo de prueba: 6 cajas sólo contenían el agar de soya y tripticaseína y las otras 6 se le adicionó AA al medio. Se incubaron a 35°C durante 48 horas y transcurrido el tiempo se contó el número de colonias en cada caja.

### **Cuenta de viables en recubrimientos de Q y Q+AM**

Las pruebas antimicrobianas fueron realizadas conforme a lo señalado por la JIS y la ISO, de igual manera que fue descrito en las pruebas microbiológicas la única diferencia fue la cantidad de inóculo vertido sobre la muestra, ya que fue ajustado al área del portaobjetos (18.75 cm<sup>2</sup>), tal como lo marcan las normas.

### **Cuenta de viables en soluciones de AM**

Para poder realizar una comparación con un recubrimiento, sobre un portaobjetos se colocó papel filtro adaptado a 7.5 cm x 2.5 cm y se vertió 400 µL de la solución de AM, cuidando de esparcir de manera uniforme el líquido. Este se trató bajo las mismas condiciones que los recubrimientos de Q y Q+AM.

#### **7.4.5 Inactivación fotodinámica**

Se realizó un experimento completo sobre *K. pneumoniae* y *S. aureus* con la adición de luz roja, utilizando una lámpara con luz infrarroja marca YUYTE, ésta fue fijada con ayuda de un soporte universal a una distancia de 30 cm de la base y se adaptó una caja de cartón para dirigir la luz hacia las muestras. La irradiación se realizó después de la inoculación de las muestras exponiendo las muestras a la luz durante 10 minutos, después de esto fue incubada conforme a lo marcado por la JIS y la ISO.

Para este experimento se probaron bajo las mismas condiciones 8 diferentes muestras, cada una con su triplicado, inoculadas con cada cepa; un blanco (B) que se trataba de papel filtro estéril, un blanco irradiado con luz roja (B+IF) para descartar algún efecto de la luz sobre la cepa, un recubrimiento de Q al 0.05% (Q), el mismo recubrimiento de Q pero irradiado (Q+IF), un tratamiento con AM al 0.025 µM (AM) que se encontraba sobre papel filtro como se explicó con anterioridad, el mismo AM pero irradiado (AM+IF), un

recubrimiento que estaba compuesto por Q (0.05%) y AM (0.025  $\mu$ M) (Q+AM) y por último este mismo recubrimiento pero irradiado (Q+AM+IF).

### **7.5 Determinación del efecto sinérgico**

El modelo de aditividad de respuesta o también conocido como efecto de interacción lineal (Slinker, 1998) supone que se produce sinergismo cuando la combinación de dos antimicrobianos provoca un efecto mayor que la suma de los efectos de los antimicrobianos individuales. De manera contraria, se produce antagonismo cuando el efecto de la combinación es menor que la suma de los individuales.

Para determinar si existe sinergismo o antagonismo, se realizó un ANOVA factorial tomando 2 factores para la luz (sin exposición y 10 min de exposición a la luz roja) y 3 factores para los tratamientos (Q, AM y QAM).

### **7.6 Medición de la generación de $^1\text{O}_2$ en solución**

Se preparó una solución de 1 mg/ml de DPBF en etanol, agitándola hasta disolver el reactivo. La solución resultante presentaba una coloración verde fosforescente. Por otra parte, se preparó una solución de K la cual es la mezcla de Q al 0.05% y AM 0.025  $\mu$ M.

En vasos de precipitados de 5 ml se agregó en cada uno 990  $\mu$ L de K y 10  $\mu$ L de la solución de DPBF, éstos fueron expuestos a la luz roja durante 2, 4, 6, 8 y 10 min. Transcurrido el tiempo, utilizando una cubeta de cuarzo se realizó un barrido de 200 a 600 nm en un espectrofotómetro marca JASCO modelo V-730.

### **7.7 Medición de la generación de $^1\text{O}_2$ en película**

Como primer paso, de igual manera, se preparó una solución de DPBF de 1mg/ml. Con mucha precaución se extendió sobre la película 10  $\mu$ L de etanol y sobre éste 10  $\mu$ L de la solución de DPBF. Si el experimento se realizaba sin irradiación se realizaba un lavado con 980  $\mu$ L de etanol y al lavado resultante se le realizaba un barrido de 200 a 600 nm en el espectrofotómetro.

Para los experimentos con luz, de igual forma se agregó a las películas 10  $\mu$ L de etanol y 10  $\mu$ L de DPBF y posteriormente fueron expuestas a la luz roja; bajo estas condiciones el etanol se evaporaba, pero el reactivo continuaba sobre la película, una vez transcurrido el tiempo de exposición se realizaba un lavado a la película con 1 ml de etanol y a éste se le realizó el barrido de 200 a 600 nm en el espectrofotómetro.

## 7.8 Determinación del potencial Z

Se prepararon 5 diferentes soluciones de Q, AM y la combinación de ellos (K), a diferentes concentraciones de pH, de 3, 4, 5, 6 y 7. Cada solución se colocó en una celda capilar plegada y fue analizada en un equipo Zetasizer (Malvern modelo ZS90, Worcestershire, Reino Unido).

## 8. Resultados y discusión

### 8.1 Caracterización del quitosano

El Q obtenido fue caracterizado cuantitativamente mediante humedad, proteína, cenizas, grado de acetilación, solubilidad y peso molecular, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Caracterización del quitosano

Cenizas (%)	Humedad (%)	Proteína (%)	GA (%)	PM (kDa)
0.25 ± 0.03	4.84 ± 0.5	0.3 ± 0.04	18.56 ± 0.39	121.42 ± 26.74

En los últimos años el quitosano ha sido investigado en diferentes aplicaciones como portador de fármacos, bioadsorbente de metales, como sistema para liberación de proteínas y como agente antimicrobiano (Rodríguez et al., 2010; Liu et al., 2009; Grenha et al., 2005; Wei et al., 2009). Las propiedades que le dan la capacidad de acción al quitosano dependen principalmente de su grado de acetilación y su peso molecular por lo que resulta de fundamental importancia el conocimiento de estos parámetros para cualquier estudio.

El contenido de cenizas que se obtuvo en este trabajo fue de 0.25± 0.03% el cual fue similar con los quitosanos comerciales: Sigma Aldrich 0.2 %, Dupont 0.2 % (Cho et al., 2008). El grado de acetilación (GA) se refiere a el porcentaje de los grupos acetilo que se encuentran en la cadena del polímero, es uno de los factores más importantes que influyen en las propiedades de este biopolímero debido al rol que juega en la solubilidad (Pacheco, 2010). Se ha observado que los quitosanos disponibles comercialmente poseen un GA del 10-20% (Gacén y Gacén, 1996); el quitosano de este trabajo se encuentra dentro de los parámetros comerciales.

En cuanto al peso molecular del quitosano en este trabajo fue de 121.42 kDa, similar a lo reportado por Cabanillas (2016) en cuyo trabajo fue de 107.5 kDa; así como lo reportado por Zhang et al. (2014) de 125.63±3.74 kDa. La actividad antimicrobiana del Q aumenta al

incrementar el peso molecular, ya que disminuye la permeabilidad de la membrana celular, según lo reportado por Zheng et al. (2003).

## 8.2 Pruebas microbiológicas

### 8.2.1 Activación y mantenimiento de cepas

Al realizar la tinción Gram de ambas cepas se pudo observar que *S. aureus* es una bacteria Gram positiva que presenta una formación de coco y se agrupa en racimos (Figura 11). Este microorganismo se encuentra normalmente en la piel, en la zona nasofaríngea, en los pliegues inguinales y axilas. Sin embargo, este patógeno se caracteriza por provocar infecciones en la piel y tejidos blandos, así como la invasión a dispositivos médicos y ha sido importante en las enfermedades que son transmitidas por alimentos (Pasachova et al., 2019).

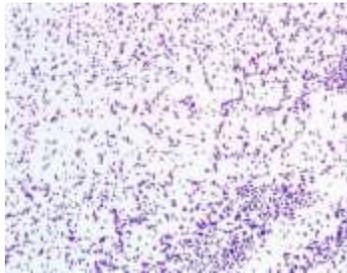


Figura 11. Tinción Gram de *S. aureus* ATCC 6538 (40x).

Por su parte *K. pneumoniae* se trata de un bacilo Gram negativo aerobio (Figura 12). Se considera un patógeno oportunista que puede causar neumonías, infecciones del tracto urinario y bacteriemias, así como una alta morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística, debido a las infecciones crónicas que eventualmente conducen a un daño a nivel pulmonar e insuficiencia respiratoria (Echeverri et al., 2010).



Figura 12. Tinción Gram de *K. pneumoniae* ATCC 4352 (40x).

## 8.2.2 Recubrimientos Q+AM

### Evaluación del tamaño de inóculo sobre el crecimiento bacteriano en recubrimientos con quitosano al 1.15%

Al inocular las películas de quitosano con 0.5 de MF no se obtuvo recuperación de ninguna cepa. Por el contrario, al inocular con tamaño de inóculo de 1 y 3 de MF para *S. aureus* se pudieron recuperar  $9.6 \times 10^4$  UFC/ml en MF 1 y  $1.55 \times 10^5$  UFC/ml para MF 3. En cuanto a *K. pneumoniae* se recuperaron  $1.56 \times 10^6$  UFC/ml para MF1 y  $1.67 \times 10^6$  UFC/ml en MF 3. Como se puede observar en la Figura 13, sólo existió diferencia significativa en el tamaño de inóculo para *S. aureus*.

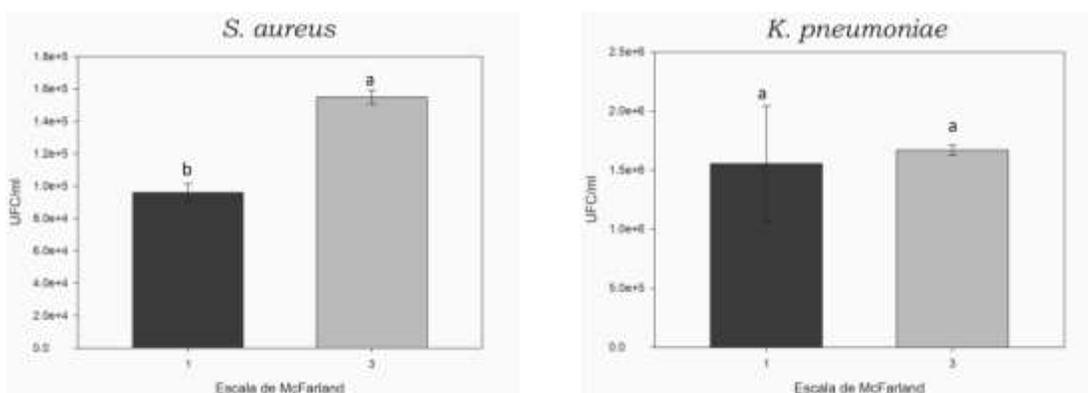


Figura 13. UFC/ml recuperadas para cada escala de MF. Letras distintas indican diferencia significativa entre los tratamientos mediante comparación múltiple de medias Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).

Aunque el cambio del tamaño de inóculo fue significativo para una cepa, se optó continuar las pruebas microbiológicas con escalas de MF de 1, esto debido a que, bajo estas condiciones, se pudo recuperar bacterias y éstas se encontraban dentro de los parámetros marcados por la JIS y la NOM, además de que ambas cepas, al ser patógenas, se prefiere trabajarlas en una escala menor por ser más segura su manipulación y mínima exposición.

La acción antibacteriana del quitosano contra bacterias Gram negativas se debe a la atracción electrostática con los lipopolisacáridos de la membrana externa lo cual desestabiliza y altera su permeabilidad permitiendo la entrada y salida de componentes esenciales. (Liu et al., 2004; Ganan et al., 2009) En bacterias Gram positivas el polímero interacciona con los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular lo que induce la salida de componentes esenciales y el desequilibrio osmótico de la célula (Raafat et al., 2008; Kong et al., 2010; Verlee et al., 2017) (Figura 14).

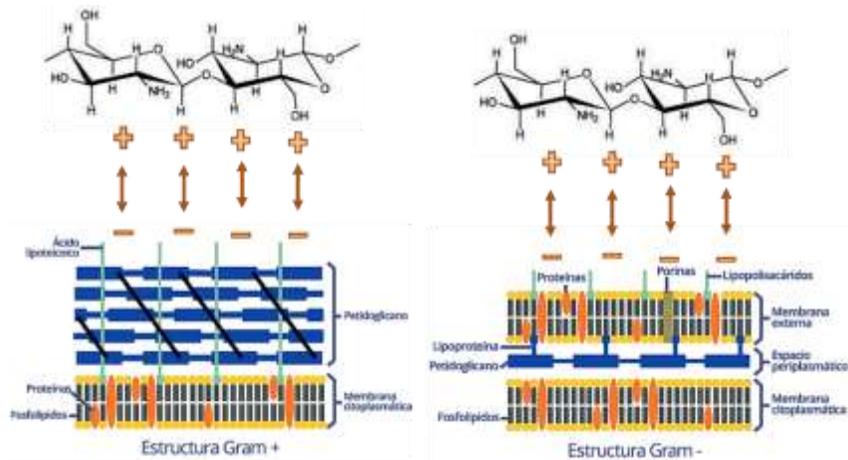


Figura 14. Interacción del quitosano con la pared de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Fuente: elaboración propia).

### Efecto antimicrobiano del AA

Se comparo la cuenta de viables en los grupos controles para descartar la acción antimicrobiana del ácido acético (AA). En los siguientes histogramas se puede observar que tanto para *S. aureus* y para *K. pneumoniae* la adición de AA al medio de cultivo no inhibió su crecimiento, por lo cual se descarta que la posible actividad antimicrobiana sea por el uso de AA en la preparación de los recubrimientos.

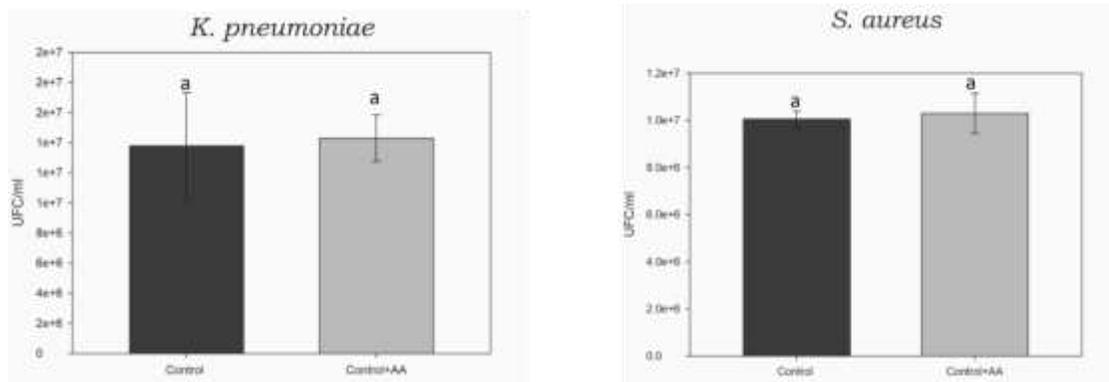


Figura 15. Comparación de las UFC/ml recuperadas en el grupo control sin AA (Control) y con la adición de AA al medio de cultivo (Control+AA).

Durante el año 2018, Yagnik et al. investigaron la capacidad antimicrobiana del ácido acético contra *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*. La dilución mínima de AA requerida para la inhibición del crecimiento varió para cada especie microbiana. Para *C. albicans*, una dilución de AA de 1/2 tuvo el efecto más fuerte, *S. aureus* requirió una dilución de 1/25, mientras que para cultivos de *E. coli*, se requirió una dilución de 1/50. La concentración de

AA utilizada en este trabajo para disolver el quitosano es de 0.1 M, para realizar una mejor comparación, la dilución de esta concentración es de 1/200, es decir, 8 veces más diluida que la requerida en el trabajo de Yagnik et al. (2018) para inhibir el crecimiento de *S. aureus*. Por esta razón, la adición de AA a los medios no fue significativa para ninguna cepa.

#### Determinación del I(%) de la cuenta de viables en recubrimientos de Q

En una primera prueba se utilizó un recubrimiento de Q al 1.15%, sin embargo, al recuperar las bacterias después de la incubación no hubo crecimiento de las colonias. Por esta razón, se probaron otras dos concentraciones de quitosano (0.25% y 0.05%). Para ambas cepas en la única concentración donde hubo recuperación de bacterias es en la concentración más baja de 0.05%, como se muestra en la Figura 16. Por esta razón se estableció la concentración de quitosano en 0.05%.

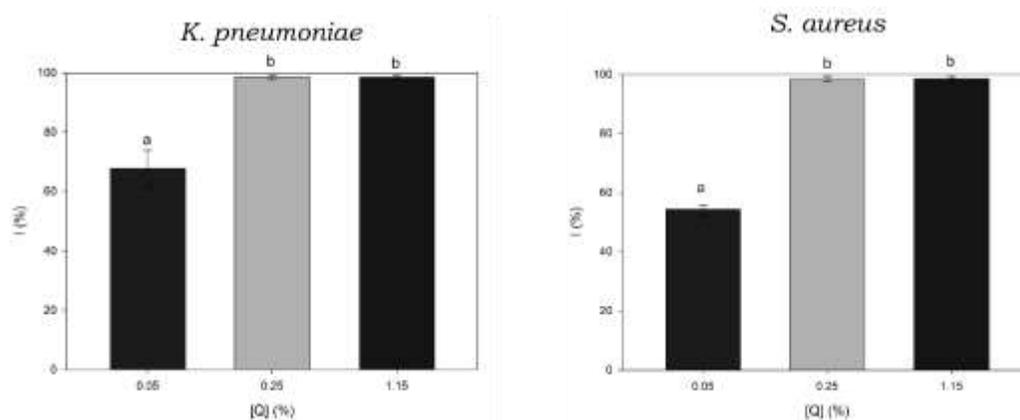


Figura 16. Comparación del porcentaje de inhibición en recubrimientos con diferentes concentraciones de Q. Letras distintas indican diferencia significativa entre los tratamientos mediante comparación múltiple de medias Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).

En el año 2017 Campo et al. aislaron 15 cepas bacterianas de muestras de agua residuales. Las especies de mayor porcentaje de aislamiento fueron *E. coli*, seguida de *E. faecalis*, *S. aureus* y de *K. pneumoniae*. Sobre estas cepas se realizaron experimentos para probar el efecto antimicrobiano del quitosano y la cáscara de naranja. Para ello, probaron concentraciones de Q de 1, 1.5 y 2% obteniendo un porcentaje de inhibición entre el 17 al 25% en las bacterias estudiadas. Sin embargo, el Q que Campo et al. (2017) utilizaron fue de bajo peso molecular y un GA de 81.4%. En contraste con el grado de acetilación de este trabajo que fue de 18.56%, esto podría ser el factor que causa la diferencia en el porcentaje de inhibición obtenidos.

Hernández-Ochoa et al. (2011) elaboraron películas de Q con una concentración de 2% demostrando una actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* (ATCC 43888), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 11778) y *Listeria monocytogenes*. Lo que demuestra que un porcentaje de Q alto aumenta el I(%) sobre distintas cepas.

### Determinación del I (%) mediante cuenta de viables con diferentes concentraciones de AM

Realizando un experimento previo en películas de Q y AM, se observó que el aumento de la concentración de AM es directamente proporcional al porcentaje de inhibición, por tal motivo se decidió probar el AM por sí solo y a diferentes concentraciones hasta encontrar la mínima concentración que permita el crecimiento de las bacterias.

Como se puede observar en la Figura 17, para *K. pneumoniae*, las concentraciones de AM a partir de 0.1 hasta 100  $\mu\text{M}$  no presentan diferencias significativas entre ellos en cuanto al % de I. Por su parte, las concentraciones de 0.025  $\mu\text{M}$  y 0.05  $\mu\text{M}$  son diferentes al grupo antes mencionado, pero entre ellas no presentan diferencias significativas, según las pruebas de Tukey-Kramer. En contraste, para *S. aureus* se pueden observar 3 diferentes grupos, los que presentan mayor porcentaje de inhibición son las concentraciones de 50, 75 y 100  $\mu\text{M}$  que no presentan diferencias entre sí, seguidas de las concentraciones de 1 y 0.1  $\mu\text{M}$  y por último las concentraciones más pequeñas de 0.05  $\mu\text{M}$  y 0.025  $\mu\text{M}$  que de igual manera son estadísticamente iguales.

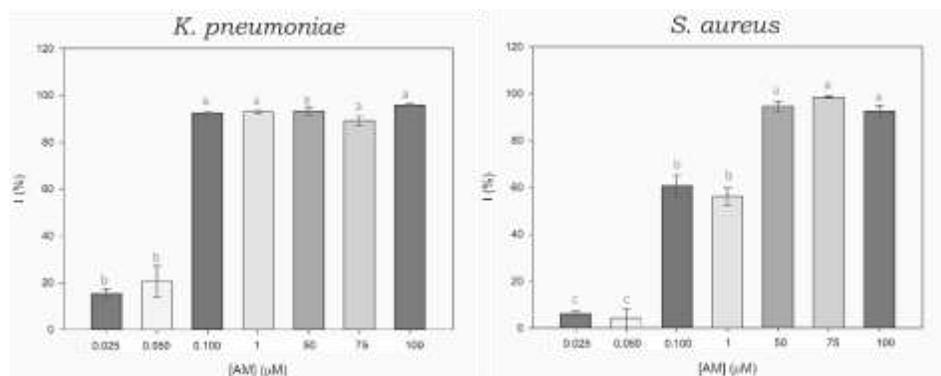


Figura 17. Comparación del porcentaje de inhibición de las diferentes concentraciones de AM. Letras distintas indican diferencia significativa entre los tratamientos mediante comparación múltiple de medias Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).

Para ambas cepas se puede observar que el PS aún sin ser activado es antimicrobiano ya que presenta un I (%) elevado a partir de las concentraciones de 0.1  $\mu\text{M}$ . Ansari et al. (2016) demostraron que el AM presenta una actividad antifúngica no fotodinámica sobre *Candida*

*albicans* en una concentración de 312.64  $\mu\text{M}$ . Posteriormente Pal et al. (2018) realizaron estudios sobre *Mycobacterium smegmatis* en donde observaron una concentración mínima inhibitoria de 48.85  $\mu\text{M}$ , además encontraron que el AM provocaba cambios en la superficie celular, daños en el ADN e impide la formación de biopelículas. Por esta razón el aumento en la concentración de AM se ve reflejado en el aumento en el I (%), de tal manera que se seleccionó trabajar con la concentración más baja (0.025  $\mu\text{M}$ ) para probar si existe un cambio significativo al momento de exponer el recubrimiento a la luz.

### 8.3 Inactivación fotodinámica y sinergismo

Como un primer paso se aseguró que la exposición a la luz roja no afecte las UFC/ml recuperadas del B y el B+IF en ambas cepas. Como se puede observar en la Figura 18 no hay cambios estadísticos entre los grupos. De tal manera que se descarta el efecto de la luz sobre *K. pneumoniae* y *S. aureus*.

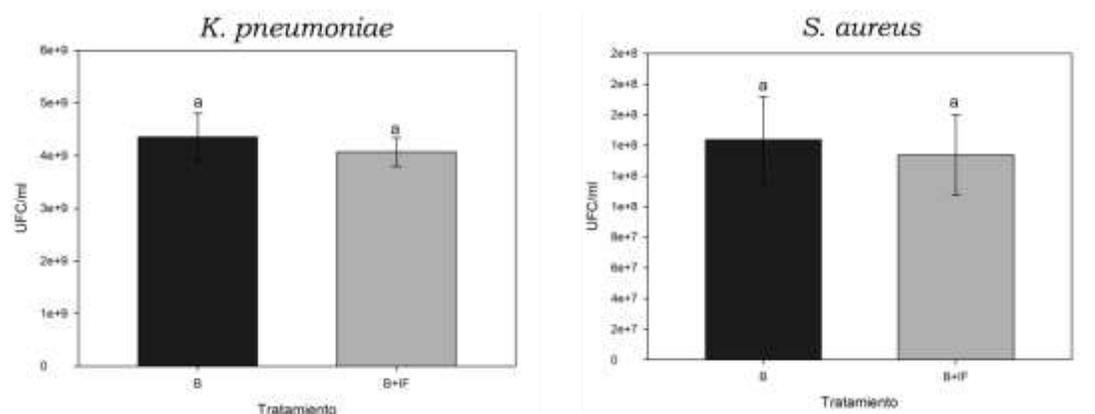


Figura 18. UFC/ml recuperadas del blanco (B) y el blanco expuesto a la luz roja (B+IF).

Al determinar el I(%) sobre *K. pneumoniae* para cada tratamiento (Q, Q+IF, AM, AM+IF, Q+AM Y Q+AM+IF) se observó que el que presentaba mayor I (%) ( $97.43 \pm 1.06\%$ ) y además fue significativamente diferente a los otros fue el tratamiento de Q+AM+IF, tal como se muestra en la Figura 19.

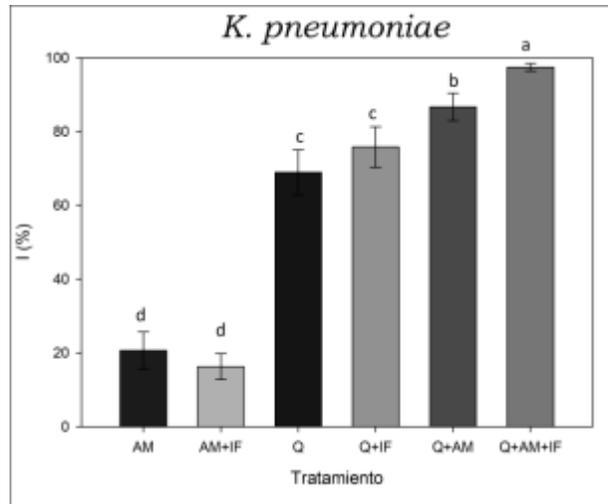


Figura 19. Porcentaje de inhibición de los diferentes tratamientos sobre *K. pneumoniae*. Letras distintas indican diferencia significativa entre los tratamientos mediante comparación múltiple de medias Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).

Para comprobar si el efecto es sinérgico se realizó un ANOVA factorial, utilizando dos niveles para la exposición a la luz (0 y 10 min) y 3 niveles para los diferentes tratamientos (Q, AM y QAM). La interacción entre el tratamiento y la exposición resultó ser significativa, lo cual demuestra que existe sinergismo.

En cuanto al porcentaje de inhibición sobre *S. aureus* de los diferentes tratamientos (Q, Q+IF, AM, AM+IF, Q+AM Y Q+AM+IF), se observó que el tratamiento de Q+AM+IF presentó el mayor I (%) ( $68.56 \pm 8.72$ ) y es significativamente diferente a los demás grupos.

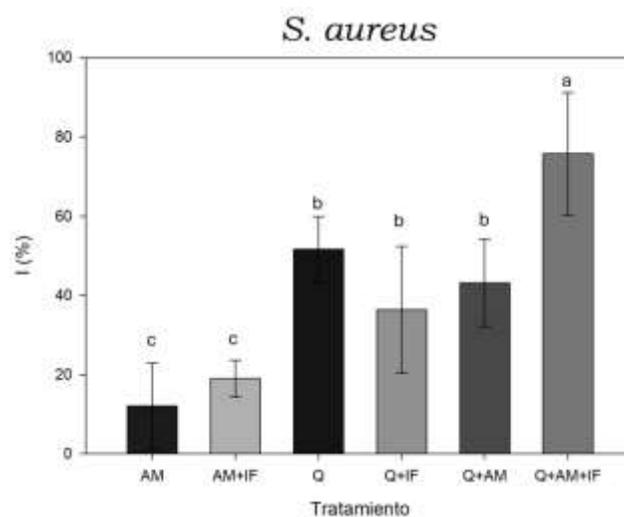


Figura 20. Porcentaje de inhibición de los diferentes tratamientos sobre *S. aureus*. Letras distintas indican diferencia significativa entre los tratamientos mediante comparación múltiple de medias Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).

De igual forma se realizó un ANOVA factorial como se describió anteriormente, el cual demostró que la interacción entre el tratamiento y la exposición es significativa, lo que denota que de igual forma existe un sinergismo de los tratamientos y la luz sobre *S. aureus*.

Como se puede observar el % de inhibición sobre *S. aureus* (68.56%) es significativamente menor que sobre *K. pneumoniae* (97.43%). Lo cual es explicado por los carotenoides bacterianos, en especial la estafiloxantina (STX), un pigmento presente en la pared celular de *S. aureus* y la cual le da el color característico (López, 2022). La STX tiene una estructura química con múltiples dobles enlaces conjugados los cuales le da la capacidad de eliminar radicales libres, oxígeno singulete, peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso, amortiguando el estrés oxidativo y actuando como un agente antioxidante al proteger a *S. aureus* contra las ROS generadas en el ambiente (Munera et al., 2024).

En cuanto al efecto sinérgico en este trabajo concuerda con lo reportado por Cotrina (2022) el cual demostró sinergismo entre la IF y el Q en biopelículas de *S. aureus* adheridas a Titanio. Sin embargo, Cotrina (2022) utilizó un kit comercial de IF que es comercializado en Alemania y contiene 3 fotosensibilizadores: azul de metileno, cloruro de fenotiazina y cloruro de 3,7-bis(dimetilamino)-fenotiazina-5-ium y como fuente de luz utilizaron un láser que de igual forma era parte del kit. En este trabajo se utilizó sólo azul de metileno y una lámpara que puede conseguirse fácilmente.

Para explicar la diferencia de los efectos con o sin luz, es necesario recordar cómo actúa el quitosano y el azul de metileno sobre las bacterias. El primero interactúa con los polímeros polianiónicos que se encuentran en la pared celular de las bacterias lo cual conlleva a diferentes alteraciones en la superficie celular, lo que finaliza con la fuga de constituyentes intracelulares (Raafat y Sahl, 2009). Por su parte en el año 2017, Pal et al. realizaron estudios sobre *Mycobacterium* y observaron que el AM provocaba cambios en la superficie celular.

En resumen, ambos factores actúan sobre cambios en la membrana; ahora bien, cuando se dirige la luz hacia el PS, éste absorbe un fotón, pasa a un estado triplete y posteriormente por la presencia de oxígeno molecular se produce  $^1O_2$  y otras ROS, los cuales pueden dañar todo tipo de moléculas, como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y por lo tanto, inducir muerte celular (Broekgaarden et al., 2015).

Nuestra hipótesis es que al tener los tres factores (Q, AM e IF) son capaces de atacar a las bacterias en dos diferentes tipos de niveles, el Q y el AM por sí solos actúan sobre la

membrana, mientras que el AM activado produce ROS aumentando significativamente el I(%). Para demostrarlo se procedió a la cuantificación de la producción de  $^1O_2$  y medición del potencial Z, lo cual afirmaría nuestra hipótesis.

#### 8.4 Generación de $^1O_2$ en solución

El espectro obtenido para cada tiempo se muestra en la Figura 21. Como se puede observar la absorbancia disminuyó conforme el tiempo de irradiación aumentaba.

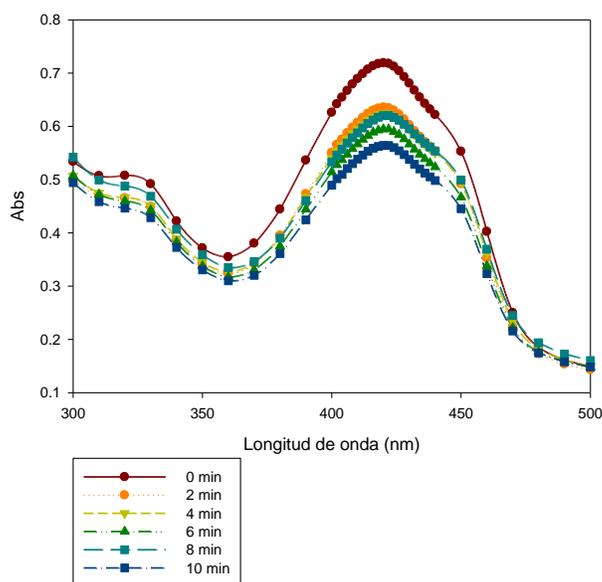


Figura 21. Absorbancia del DPBF a diferentes tiempos en la solución.

Utilizando la ley de Lambert-Beer (Ecuación 6), en donde A es la absorbancia,  $\epsilon$  es el coeficiente de absortividad molar, b es la longitud de paso de la cubeta y c es la concentración, se calculó la concentración de DPBF a cada tiempo despejando la concentración (Ecuación 7).

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \dots (6)$$

$$[DPBF]_t = \frac{A}{\epsilon \cdot b} \dots (7)$$

Posteriormente con la ecuación 8, descrita por Franzolin et al. (2022) se obtuvo la concentración de oxígeno singulete.

$$[^1O_2] = [DPBF]_0 - [DPBF]_t \dots (8)$$

En donde la concentración de oxígeno singulete es igual a la concentración de DPBF al tiempo cero menos la concentración de DPBF a cualquier tiempo. De esta manera se obtuvo la Figura 22, en donde se muestra la ecuación y la  $R^2$ .

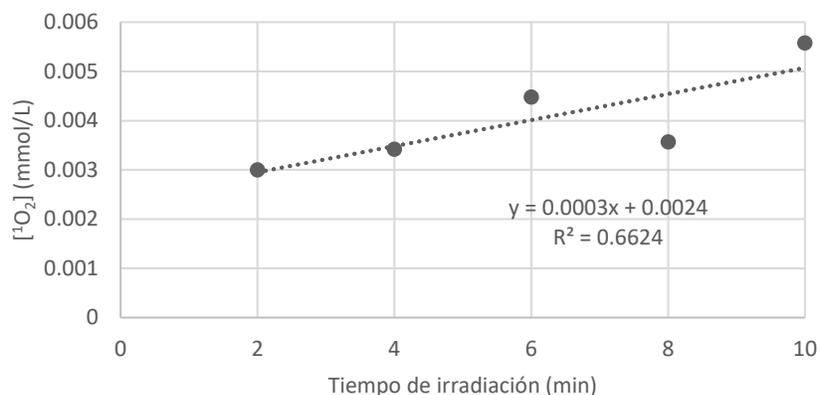


Figura 22. Generación de  $^1O_2$  a diferentes tiempos de irradiación.

### 8.5 Generación de $^1O_2$ en película de Q y AM

Para la medición sobre las películas de Q (0.05%) y AM (0.025  $\mu\text{M}$ ) los espectros obtenidos se muestran en la Figura 23. De igual manera, la absorbancia se vio disminuida conforme pasaba el tiempo de exposición.

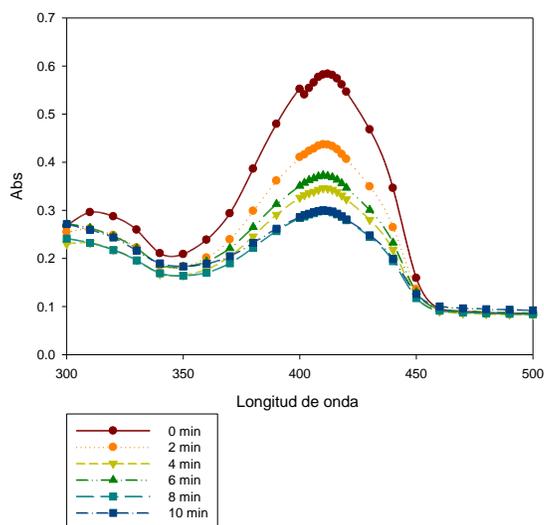


Figura 23. Absorbancia del DPBF a diferentes tiempos de irradiación en la película.

Utilizando la ecuación 7 se calculó la concentración de DPBF a cada tiempo de irradiación y posteriormente con la ecuación 8 se obtuvo la Figura 24. Como se puede observar la  $R^2$  aumento a 0.7802, por lo cual se decidió trabajar sólo en las películas.

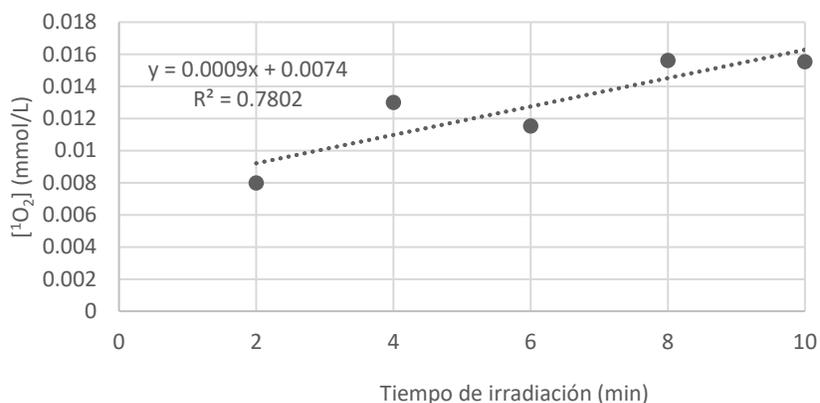


Figura 24. Generación de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> en las películas a diferentes tiempos de irradiación.

En la Figura 24 se puede observar que a los 10 min aún no se alcanza un punto máximo de producción de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, por lo cual se deciden agregar otros dos puntos, 15 y 20 min, obteniendo los espectros que se muestran en la Figura 25, en donde se puede apreciar que a los 15 min (línea morada con rombos) es en donde la absorbancia del DPBF disminuyó más que 20 min (línea vino con rombos). Esto nos indica que a los 15 min sería el punto máximo de degradación de la absorbancia y por lo tanto en donde se produce mayor cantidad de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

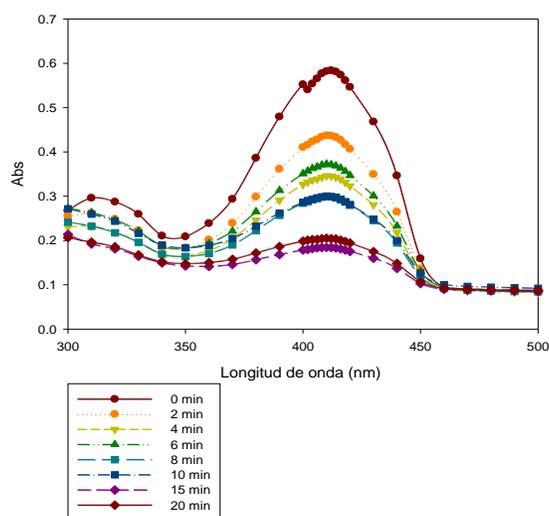


Figura 25. Absorbancia del DPBF a diferentes tiempos de irradiación en la película.

Utilizando la ecuación 9 descrita por Wei et al. (2005), en donde k es la tasa de generación de oxígeno singlete, se obtuvo la Figura 26 en donde efectivamente se observa que a los 15 min es el punto máximo.

$$\ln([DPBF]_t/[DPBF]_0) = -kt \dots (9)$$

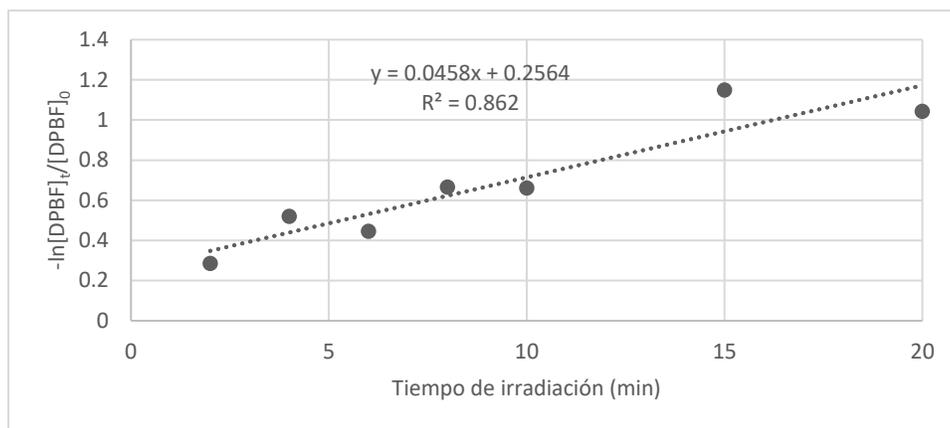


Figura 26. Tiempo de irradiación contra la absorbancia del DPBF.

Para obtener la tasa de generación de  $^1O_2$  se tomó sólo la parte de 2 a 15 min y de esta manera se graficó tal como se muestra en la Figura 27. La  $R^2$  aumentó significativamente a 0.91, lo que denota que el 91% de los datos son explicados por el modelo, además se observa que la k es igual a 0.0608, que es cercano a lo que Wang et al. (2015) encontraron (0.05), la diferencia se debe a que en su trabajo ellos utilizaron la clorina como agente fotodinámico.

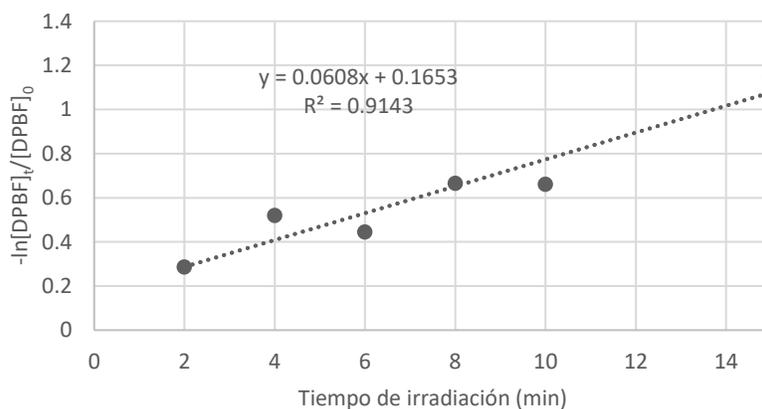


Figura 27. Tiempo de irradiación contra la absorbancia del DPBF.

## 8.6 Generación de $^1\text{O}_2$ en los diferentes componentes

Como siguiente paso se probó cada componente de la película por separado, es decir, el quitosano (Q), azul de metileno (AM), un blanco (B) y la mezcla de Q y AM (K), tanto sin exposición a la luz, como después de 15 min de exposición (Denotado por 15) (Figura 28). Como se puede observar los componentes que degradan el DPBF y por lo tanto producen mayor cantidad de oxígeno singlete es el K (línea vino y rombos) y AM (línea verde y triángulos) después de ser irradiados con luz roja durante 15 min.

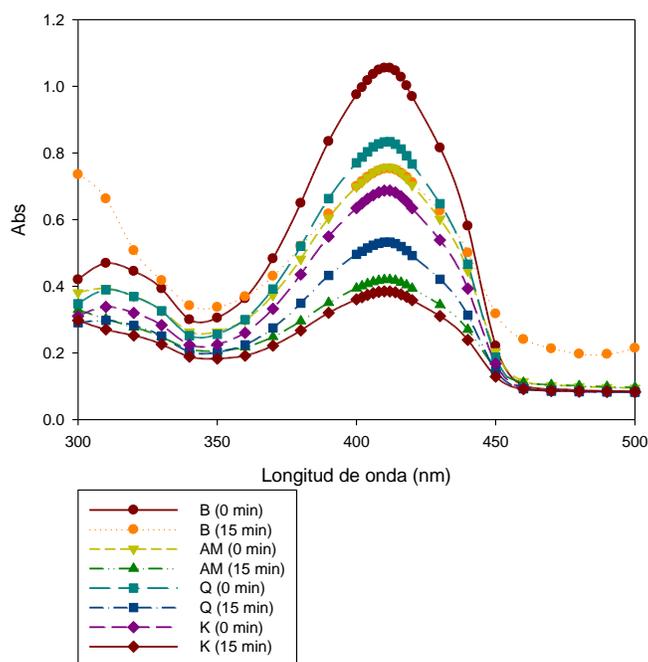


Figura 28. Absorbancia del DPBF para cada elemento de la película.

Realizando un histograma de la cantidad de  $^1\text{O}_2$  generado por cada elemento (Figura 29) se muestra que K15 produce 0.0246 mmol/L y el AM15 0.0235 mmol/L, esto nos indica que lo que le confiere a la película la capacidad de producir oxígeno singlete es justamente el azul de metileno.

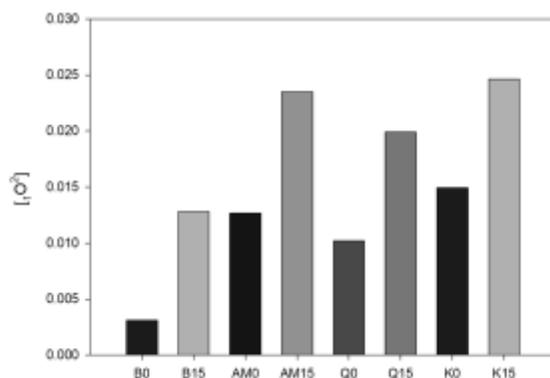


Figura 29.  $^1O_2$  producido por cada elemento de la película.

## 8.7 Potencial

## Z

En cuanto al potencial Z se pudo observar que tanto el quitosano, el azul de metileno y la combinación de ambos presentan unos potenciales positivos muy elevados (Figura 30), es decir que la carga superficial neta es positiva. En contraste, las células bacterianas generalmente tienen una carga negativa neta en su pared celular a pH 7 (Rijnaarts et al., 1999). Esta diferencia de cargas permite la interacción entre el recubrimiento y los lipopolisacáridos en Gram negativas y los ácidos teicoicos y lipoteicoicos en Gram positivas alterando la permeabilidad de la membrana y causando un desequilibrio osmótico de las células (Liu et al., 2004; Raafat et al., 2008; Ganán et al., 2009).

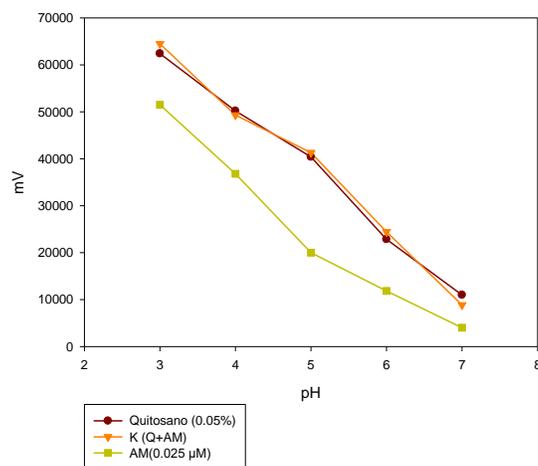


Figura 30. Potencial Z del quitosano (Q), el azul de metileno (AM) y K (Q+AM).

El potencial Z de cualquier dispersión está influenciado por la química de la superficie, la cual se puede modificar mediante diferentes métodos, como la variación del pH (Nurdin et

al., 2016). Por esta razón en la Figura 30 se puede observar un cambio del potencial Z con respecto al pH, también se puede apreciar que en pH 7 se acerca al punto isoeléctrico, que se encuentra entre 6.8 y 7.4, según lo reportado por Velasco-Rodríguez et al. (2012), en donde las partículas tienden a ser inestables y precipitan.

### 8.8 Mecanismo de acción del recubrimiento

Con la determinación del potencial Z se pudo determinar que el recubrimiento sin activación presenta una carga superficial neta positiva, por el contrario, la carga neta de las bacterias es negativa; al inocular el recubrimiento esta diferencia de cargas ocasiona una interacción con los componentes que se encuentran en la membrana de bacterias Gram positivas y negativas (Figura 31), lo cual altera la permeabilidad de la membrana (Liu et al., 2004; Raafat et al., 2008; Ganán et al., 2009). Es por esta razón, que el recubrimiento aún sin activación es capaz de inhibir a ambas cepas.

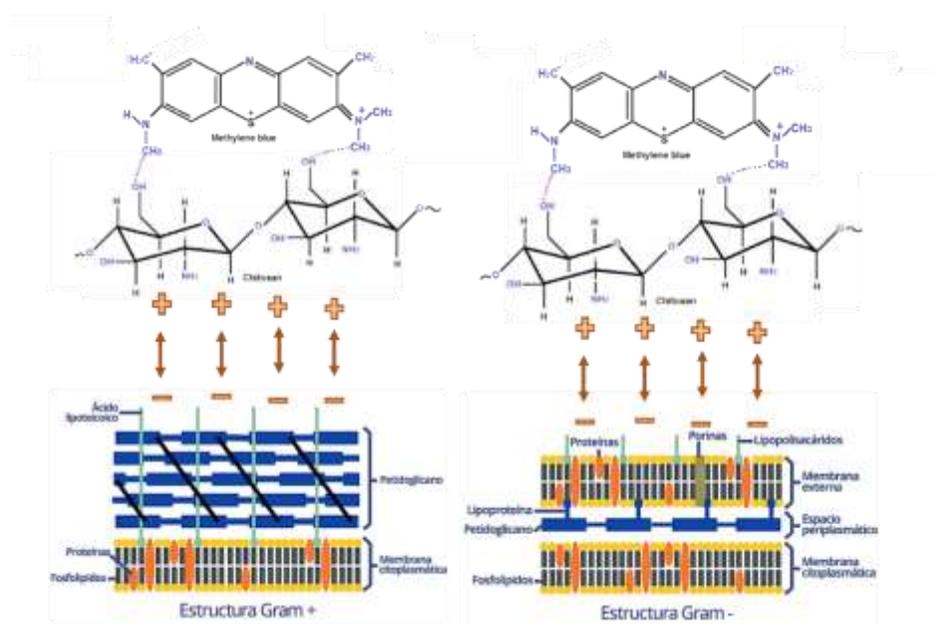


Figura 31. Mecanismo de unión del recubrimiento y la pared celular de las bacterias (Fuente: elaboración propia).

Ahora bien, cuando el recubrimiento es expuesto a la luz, se produce la reacción tipo II de la IF, en la cual se lleva a cabo la producción de  $^1\text{O}_2$  (Figura 32), lo que fue demostrado con el uso de DPBF. Este  $^1\text{O}_2$  desencadena diferentes tipos de daño celular y se ve reflejado en el aumento del I(%) cuando el recubrimiento es expuesto a la luz, además que nos indica un efecto sinérgico entre el Q, AM e IF.

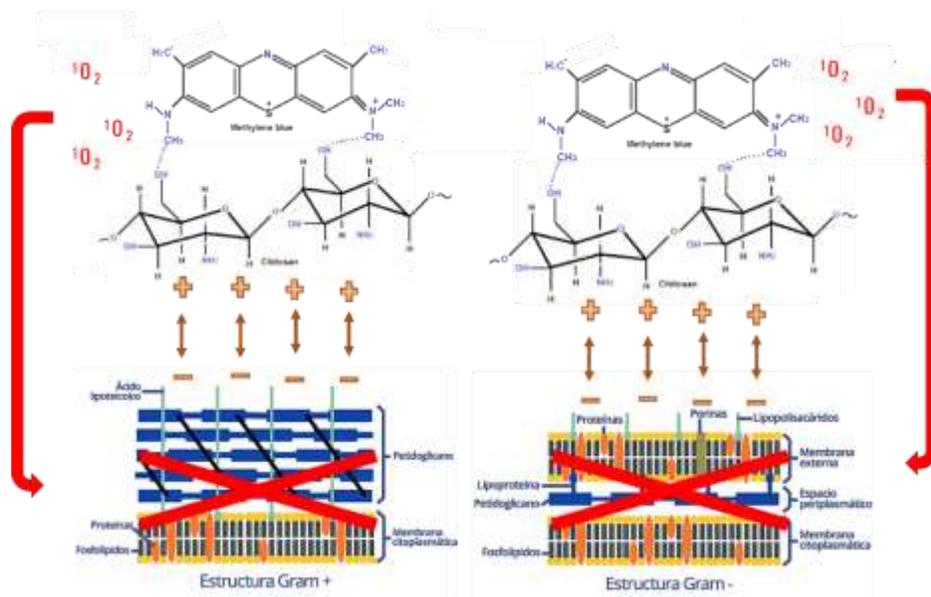


Figura 32. Generación de  $^1O_2$  por el recubrimiento, después de ser expuesto a la luz (Fuente: elaboración propia).

## 9. Conclusiones

El Q y el AM por sí solos presentan una alta actividad antimicrobiana, por esta razón en este trabajo se buscó la concentración mínima de cada uno para estudiar la técnica de inactivación fotodinámica. De tal manera que se logró fijar la [Q] en 0.05% y la [AM] en 0.025  $\mu$ M.

Realizando un experimento completo con IF, se observó un efecto sinérgico entre el Q (0.05%), AM (0.025  $\mu$ M) y la IF (10 min) sobre el porcentaje de inhibición de *K. pneumoniae* y *S. aureus*.

Por otra parte, se montó la técnica del uso de DPBF tanto en solución como película, lo que ayudó a la medición y obtención de una tasa de generación de  $^1O_2$  de 0.06, demostrando que el recubrimiento es capaz de generar 0.0246 mmol/L de esta especie reactiva de oxígeno cuando el recubrimiento es expuesto a una luz roja durante 15 min.

En cuanto al potencial Z, los resultados mostraron que el recubrimiento y sus componentes presentan una carga superficial positiva lo que permite la interacción con la pared celular de las bacterias.

Debido a estos resultados podemos concluir que el aumento en el porcentaje de inhibición al unir los tres factores (Q+AM+IF) es debido a que el recubrimiento es capaz de atacar a

las bacterias en dos diferentes niveles, el primero sobre la interacción con la membrana que altera la envoltura celular y el segundo es con la producción de  $^1\text{O}_2$  que es altamente tóxico para las células y dañan casi todo tipo de moléculas, como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y, en consecuencia, induce la muerte celular.

## **10. Perspectivas**

En este trabajo no fue posible el estudio del recubrimiento sobre una superficie específica, por lo cual se propone la búsqueda de una superficie en la cual pueda ser aplicado y estudiado sobre ésta.

Además, sería importante realizar varios ciclos de luz roja para determinar la vida útil del recubrimiento o hasta qué punto deja de producir  $^1\text{O}_2$ .

Por otro lado, sería interesante planear un estudio de citotoxicidad en células humanas para corroborar su seguridad.

## 11. Bibliografía

- Ängeby** K, Juréen P, Kahlmeter G, Hoffner SE, Schön T. (2012) Challenging a dogma: antimicrobial susceptibility testing breakpoints for *Mycobacterium tuberculosis*. *Bull World Health Organ.* 2012; 90(9): 693-698
- A.O.A.C.** (1990). *Methods of Analysis* (15th ed.). Association of Official Analytical Chemist. Washington, D.C.
- Ansari**, M. A., Fatima, Z., Hameed, S. (2016). Antifungal Action of Methylene Blue Involves Mitochondrial Dysfunction and Disruption of Redox and Membrane Homeostasis in *C. albicans*. *The open microbiology journal*, 10, 12–22. <https://doi.org/10.2174/1874285801610010012>
- Slinker**, B.K. (1998) The statistics of synergism. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 30 (4) , pp. 723-731, 10.1006/JMCC.1998.0655
- Baltazar**, L., Ray, A., Santos, D., Cisalpino, P., Friedman, A., Nosanchuk J. (2002) Terapia fotodinámica antimicrobiana: un enfoque alternativo eficaz para controlar las infecciones por hongos. *Microbiol Front* 2015;6
- Bartnicki-García**, S., Hergert, F., Gierz, G. (1970). Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma* 153: 46-47.
- Bautista-Baños**, S., Barrera-Necha, L. L., Hernández-López, M., Rodríguez-González, F. (2016). Morphological and ultrastructural modifications of chitosan-treated fungal phytopathogens. *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities* (pp. 251-271). USA: Academic Press/Elsevier . doi:10.1016/B978-0-12-802735-6.00009-4
- Broekgaarden**, M., Weijer, R., Van Gulik, T. M., Hamblin, M. R., Heger, M. (2015). Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: A molecular basis for pharmacological inhibition strategies. *Cancer Metastasis Reviews*, 34(4), 643-690. <https://doi.org/10.1007/s10555-015-9588-7>
- Cabanillas** Bojórquez, L. A. (2016) Efecto de cubiertas de Quitosano obtenido en condiciones óptimas de fermentación láctica de cabezas de camarón sobre el comportamiento poscosecha de papaya (*Carica papaya L.*) procesada mínimamente. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Sinaloa
- Calin**, M.A., Parasca, S.V. (2009). Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. *Lasers in Medical Science*, 24(3), 453-460. <https://doi.org/10.1007/s10103-008-0588-5>
- Campo** Vera, Y., Delgado, M., Roa, Y., Mora, G. (2017). Efecto antimicrobiano del quitosano y cascara de naranja en el tratamiento de aguas residuales. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 19(4), 381-388. <https://dx.doi.org/10.18271/ria.2017.312>
- Cheng**, Y., Ramos, D., Lee, P., Liang, D., Yu, X., Kumbar, S.G. (2014). Collagen functionalized bioactive nanofiber matrices for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: bone

- tissue engineering. *Journal of biomedical nanotechnology*, 10(2), 287–298. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1753>
- Cieplik**, F., Deng, D., Crielaard, W., Buchalla, W., Hellwig, E., Al-Ahmad, A., Maisch, T. (2018). Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(5), 571-589. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1467876>
- Cira**, L., Huerta, S., Hall, G. M., Shirai, K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 37(12), 1359–1366.
- Corona-Suárez**, I.J. (2011) Síntesis y caracterización de las propiedades mecánicas y antifúngicas de las películas de quitosano-co-citríco, *Tesis de Licenciatura Químico en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México, México.*
- Cotrina-Veizaga**, B.D. (2022) Efecto Sinérgico Antimicrobiano de la Terapia Fotodinámica y el quitosano en las biopelículas Adheridas al Titanio de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*: un Estudio *in vitro*. Tesis doctoral. Universidad de Murcia, España.
- Dash**, M., F. Chiellini, R.M. Ottenbrite, E. Chiellini (2011). Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical. *Progress in polymer science*, 36:981-1014
- De la Fuente-Salcido**, N.M., Villarreal-Prieto, J. M., Díaz León, M. A., García Pérez, A.P. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 46(2), 7-16. Recuperado en 09 de febrero de 2024, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-01952015000200007&lng=es&tlng=](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952015000200007&lng=es&tlng=).
- Demirbas**, A. (2007). Global renewable energy resources. *Energía Fuentes, Parte A: Recomendación, Utilización y Medio Ambiente todos los efectos*, 29(5), 419-424
- Dinesh**, S., Alok, R. (200) Biomedical applications of chitin, chitosan, and their derivatives. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 40(1): 69-83.
- Dröge** W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47-95.
- Dumitriu** S. (2005) Polysaccharides. Structural, diversity and functional versatility, *USA: Marcel Dekker*, 2a ed.
- Franzolin**, M.R., Lopes, I.S., Courrol, D.D.S., de Souza Barreto, S., Courrol, L.C. (2022). Synthesis, characterization, antimicrobial activity, and toxicity evaluation of aminolevulinic acid-silver and silver-iron nanoparticles for potential applications in agriculture. *RSC advances*, 12(46), 30094–30103. <https://doi.org/10.1039/d2ra05135d>
- Ganan**, M., Carrascosa, A.V., Martínez-Rodríguez, A.J. (2009). Antimicrobial activity of chitosan against *Campylobacter* spp. and other microorganisms and its mechanism of action. *Journal of food protection*, 72(8), 1735–1738. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.8.1735>

- Gimeno, M.,** Ramírez-Hernández, J.Y., Martínez-Ibarra, C., Pacheco, N., García- Arrazola, R., Bárzana, E., Shirai, K. (2007). One-solvent extraction of staxanthin from lactic acid fermented shrimp wastes. *J. Agric. Food Chem.* 55: 10345– 10350
- Giraldo Pedraza, J.** (2015). Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano. 10.13140/RG.2.1.3350.9287.
- Goosen, M.F.A.** (1996). Applications of Chitin and Chitosan (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003072812>
- Gordillo, D.C.,** Montero López, D. (2018). Efecto antimicrobiano de la terapia fotodinámica versus la terapia láser sobre la Porphyromona gingivalis: Estudio *in vitro*. *Revista Odontología*, 20(1), 20–32. <https://doi.org/10.29166/odontologia.vol20.n1.2018-20-32>
- Goycoolea, F.M.,** Aguelles, W., Peniche, C., Higuera I. (2000). *Chitin and chitosan*. Elsevier Science B.V., 265-308 [https://doi.org/10.1016/S0167-4501\(00\)80013-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4501(00)80013-8)
- Grenha, A.,** Seijo, B., Remuñán-López, C. (2005). Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25(4), 427-437
- Hernández-Ochoa, L.,** Gonzales-Gonzales, A., Gutiérrez-Mendez, N., Muñoz-Castellanos, L.N., Quintero-Ramos, A. (2011). Estudio de la actividad antibacteriana de películas elaboradas con quitosano a diferentes pesos moleculares incorporando aceites esenciales y extractos de especias como agentes antimicrobianos. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(3), 455-463.
- Hernández-Téllez, C.N.,** Plascencia-Jatomea, M., Cortez-Rocha, M.O. (2016). Chitosan-based bionanocomposites: development and perspectives in food and agricultural applications. *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities* 12, (pp. 315-338). USA: Academic Press/Elsevier . Doi: 10.1016/B978-0-12-802735-6.00012-4
- Heuser, M.,** Cárdenas, G. (2014). Tipos de pinturas de quitosano-cobre como antiincrustante. *Revista de la Sociedad Química de Chile* , 59 (2), 2415-2419. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072014000200004>
- Hirano, S.,** (1999). Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International*, 48, 47-59.
- Issa, M. C. A.,** Manela-Azulay, M. (2010). Photodynamic therapy: A review of the literature and image documentation. *Anais Brasileiros De Dermatologia*, 85(4), 501-511. <https://doi.org/10.1590/s0365-05962010000400011>
- Kashef, N.,** Huang, Y., Hamblin, M.R. (2017). Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale. *Nanophotonics*, 6(5), 853-879. <https://doi.org/10.1515/nanoph-2016-0189>
- Khan A.U.,** Kasha M. (1963) Red Chemiluminescence of Molecular Oxygen in Aqueous Solution *Journal of Chemical Physics*, 39, 2105–2106. <https://doi.org/10.1063/1.1734588>

- Kjoniksen** A.L., Nystrom B., Iversen C., Nakken T., Palmgren O., Tande T. (1997). Viscosity of dilute aqueous solution of hydrophobically modified chitosan and its unmodified analogue at conditions of salt and surfactant concentrations. *Langmuir*, 13, 4948-4952.
- Kong**, M., Chen X.G., Xing K, Park H.J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144: 51-63.
- Krochta**, J.M., De Mulder-Johnston C. (1997). Edible and Biodegradable Polymer Films: Challenges and Opportunities. *Food Technol.*, 51(2): 61-74.
- Lárez**, C. (2006) Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica, *UDO Agrícola*, Vol. 8.
- Lendvay** T.S., Chen J., Harcourt B.H., Scholte F.E.M., Lin Y.L., Kilinc-Balci F.S., Lamb M.M., Homdayjanakul K., Cui Y., Price A., Heyne B., Sahni J., Kabra K.B., Lin Y.C., Evans D., Mores C.N., Page K., Chu L.F., Haubruge E., Thiry E., Ludwig-Begall L.F., Wielick C., Clark T., Wagner T., Timm E., Gallagher T., Faris P., Macia N., Mackie C.J., Simmons S.M., Reader S., Malott R., Hope K., Davies J.M., Tritsch S.R., Dams L., Nauwynck H., Willaert J.F., De Jaeger S., Liao L., Zhao M., Laperre J., Jolois O., Smit S.J., Patel A.N., Mayo M., Parker R., Molloy-Simard V., Lemyre J.L., Chu S., Conly J.M., Chu M.C. (2022). Addressing personal protective equipment (PPE) decontamination: Methylene blue and light inactivates severe acute respiratory coronavirus virus 2 (SARS-CoV-2) on N95 respirators and medical masks with maintenance of integrity and fit. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 43(7), 876–885. doi:10.1017/ice.2021.230
- Li**, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., Wang, H., Yang, X. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology & Oncology*, 6(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-19>
- Liu**, H., Y. Du, X. Wang L. Sun. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology*, 95: 147-55.
- Liu**, X., Hu, Q., Fang, Z., Zhang, X., Zhang, B. (2009). Magnetic chitosan nanocomposites: a useful recyclable tool for heavy metal ion removal. *Langmuir*, 25(1), 3-8.
- López-Chicón**, P., Gulías, Ò., Nonell, S., Agut, M. (2016). Terapia fotodinámica antimicrobiana in vitro aplicada sobre *Trichophyton mentagrophytes* con nuevo azul de metileno como fotosensibilizador. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 107(9), 765-770. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2016.06.004>
- López**, G.D. (2022) Targeted metabolomics por LC-MS/MS de la variación de carotenoides de *Staphylococcus aureus* asociados al estrés oxidativo y su relación con la fluidez de la membrana. Tesis doctoral Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.
- Lozano**, C.M., Fernández Belda, F. (2020). Especies reactivas de oxígeno y su implicación en Biomedicina. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 34, 17–26. <https://doi.org/10.6018/analesvet.332621>

- Lushchak, V.** (2014) Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.*, 224: 164-175.
- Madamanchi, N.R., Runge, M.S.** (2007). Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation Research*, 100(4), 460-473. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000258450.44413.96>
- Mahdavi, M., Mahmoudi, N., Rezaie, F., Simchi, A.** (2016). Electrospinning of Nanodiamond-Modified Polysaccharide Nanofibers with Physico-Mechanical Properties Close to Natural Skins. *Marine drugs*, 14(7), 128. <https://doi.org/10.3390/md14070128>
- Mahoney, C., Conklin, D., Waterman, J., Sankar, J., Bhattarai, N.** (2016). Electrospun nanofibers of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/depolymerized chitosan for respiratory tissue engineering applications. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 27(7), 611–625. <https://doi.org/10.1080/09205063.2016.1144454>
- Narváez J.L.C., Ortega J.O.** (2014) La supervivencia de los gérmenes intrahospitalarios en superficies inanimadas. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 27(107):394-6
- Nath, A., Dixit, M., Bandiya, A., Chavda, S., Desai, A.J.** (2008). Producción mejorada de PHB y estudios de escala utilizando suero de queso en cultivo discontinuo alimentado de *Methylobacterium sp. ZP24*. *Biorecurso Tecnología*, 99 (13), 5749–5755.
- Navarro-Tovar G., Martínez Pruneda V., González Castillo M.,** (2020) ¿Qué hacen los nanomateriales en los recubrimientos, pinturas y tintas? *Elementos*, 120 37-42
- Nemtsev, S. V., Gamzazade, A. I., Rogozhin, S. V., Bykova, V. M. Bykov, V. P.** (2002). Deacetylation of chitin under homogeneous conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38(6):521-526.
- Nurdin, I., Syarofi, R., Satriananda.** (2016). The Effect of pH and Time on The Stability of Superparamagnetic Maghemite Nanoparticle Suspensions. *MATEC Web of Conferences*. 39. 01001. 10.1051/mateconf/20163901001.
- Nyman, E.S., Hynninen, P.H.** (2004). Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 73(1), 1-28. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2003.10.002>
- Oliveira Junior, E., Melo I., Franco T.** (2012). Changes in Hyphal Morphology due to Chitosan Treatment in Some Fungal Species. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55. 637-646. 10.1590/S1516-89132012000500001.
- Oromí, J.** (2000). Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Medicina Integral*, 36(10), 367-370.
- Pacheco, N.** (2010). Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos: caracterización y aplicación. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias UAMI, México.
- Pal, R., Ansari, M.A., Saibabu, V., Das, S., Fatima, Z., Hameed, S.** (2018) Nonphotodynamic Roles of Methylene Blue: Display of Distinct Antimycobacterial and Anticandidal Mode of Actions. *J*

*Pathog.* 2018:3759704. doi: 10.1155/2018/3759704. PMID: 29666708; PMCID: PMC5831920

- Paz-Lago**, D., Cabrera, G., Ramírez, M., Pombo, R., Gutiérrez, A. (1999). Influencia de derivados de quitina en la interacción tomate-*Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* a nivel de bioensayo. *Cultivos Tropicales*, 20: 59-61
- Peloi**, L., Soars, R., Biondo, C., Souza, V., Noburo H., Kimura E. (2008) Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *J Biosci.*, 33:231–7.
- Peña**, A., Sánchez, N. S., Calahorra, M. (2013). Effects of chitosan on *Candida albicans*: conditions for its antifungal activity. *BioMed Research International*, 527549. <https://doi.org/10.1155/2013/527549>
- Pham**, V.L., Kim, D.G., Ko, S.O. (2020) Mechanisms of Methylene Blue Degradation by Nano-Sized  $\beta$ -MnO<sub>2</sub> Particles. *KSCE J. Civ. Eng.*, 24, 1976–3808.
- Raafat**, D. , Von Bargen, K. , Haas, A., Sahl, H.G. ( 2008 ) Información sobre el modo de acción del quitosano como compuesto antibacteriano . *Aplicación Environ Microbiol.*, 74: 3764 – 3773
- Rabea**, E., Badawy, M., Stevens, C., Smaghe, G., Steurbaut, W., (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457-1465.
- Ravi Kumar**, M., Muzzarelli, R., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., Domb, A. (2004). Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chem Rev.*,104, 6017 6084.
- Renbutsu**, E., Okabe, S., Omura, Y., Nakatsubo, F., Minami, S., Shigemasa, Y., Saimoto, H. (2008). Palladium adsorbing properties of UV-curable chitosan derivatives and surface analysis of chitosan-containing paint. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(1), 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.10.025>
- Ríos**, M. A. J., Breddy, M. F. C., Villavicencio, P. R. G., Inca, H. E. C. (2022). Terapia fotodinámica antimicrobiana sobre *Candida albicans* en superficies acrílicas de prótesis dentales. Estudio in vitro. *Revista Eugenio Espejo*, 16(3), 72-82.
- Rijnaarts**, H.H.M., Norde, W., Lyklema, J., Zehnder, A.J.B. (1999) DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 14, 179-195.
- Rocha-Pino**, Z., Shirai, K., Arias, L., Vázquez-Torres, H. (2008). Efecto de la calidad del agua y tamaño de partículas en la producción de quitosano a partir de B-quitina extraída de desperdicios de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 7 (3), 299-307.
- Rodriguez** Hamamura, N., Valderrama Negron, A., Alarcon Cavero, H. (2010). Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Rev. Soc. Quím. Perú*, 76(4), 336- 354

- Sahu, S., Pahi, S., Sahu, J.K., Sahu, U.K., Patel, R.K.** (2020) Kendu (*Diospyros melanoxylon* Roxb) fruit peel activated carbon—an efficient bioadsorbent for methylene blue dye: Equilibrium, kinetic, and thermodynamic study. *Environ. Sci. Pollut.*, 27, 22579–22592.
- Sai, D.L., Jieun, L., Nguyen, D.L., Kim Y.** (2021) Tailoring photosensitive ROS for advanced photodynamic therapy. *Exp Mol Med.*, 53, 495–504 <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00599-7>
- Sajomsang, W., Gonil, P.** (2010). Preparation and characterization of  $\alpha$ -chitin from cicada sloughs. *Materials Science and Engineering: C*, 30, 357-363.
- Salehi, E., Farahani, A.** (2017) Macroporous chitosan/polyvinyl alcohol composite adsorbents based on activated carbon substrate. *J Porous Mater.*, 24, 1197–1207. <https://doi.org/10.1007/s10934-016-0359-9>
- Salimi, A., Roosta, A.** (2019) Experimental solubility and thermodynamic aspects of methylene blue in different solvents. *Thermochim*, 675, 134–139
- Salva, K.A.** (2020) Photodynamic Therapy: Unapproved uses, dosages, or indication. *Clin. Dermatol.*, 20, 571–581.
- Sashiwa, H., Saimoto, H., Shigemasa, Y., Ogawa, R., Tokura, S.** (1990). Lysozyme susceptibility of partially deacetylated chitin. *International journal of biological macromolecules*, 12(5), 295–296. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(90\)90016-4](https://doi.org/10.1016/0141-8130(90)90016-4)
- Schieber M, Chandel N.** (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* 24: R453-R462.
- Shahidi F., Arachchi, J.K.V., Jeon, Y.L.** (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*. 10, 37-51.
- Shigemasa, Y., Saito, K., Sashiwa, H., Saimoto, H.** (1994). Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. *International journal of biological macromolecules*, 16(1), 43–49. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(94\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0141-8130(94)90010-8)
- Shirai K. y Guerrero I., Hall. G.M.** (1996) Quitina: ocurrencia, propiedades y aplicaciones. *Ciencia*, - 4 Vol. 47.
- Shirai, K., Guerrero, I., Huerta, S., Saucedo, G., Castillo, A., González, R., Hall, G.** (2001). Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme and Microbial Technology*. 28, 446- 452.
- Shirai, Keiko; Hidalgo, Carmen; Hernández, Carmen y Barrera, Jorge** (2022) *Recubrimiento para la conservación poscosecha de frutas y hortalizas percederas* MX/a/2017/006635 IMPI (MX/a/2017/006635)
- Sousa, H.R., Silva, L.S., Sousa, P.A.A., Sousa, R.R.M., Fonseca, M.G., Osajima, J.A., Silva-Filho, E.C.** (2019) Evaluation of methylene blue removal by plasma activated palygorskites. *J. Mater. Res. Technol.*, 8, 5432–5442.

- Sperling**, L., (2006). Introduction to Physical Polymer Science. *Canadá: Jhon Wiley & Sons*, 3, 1292-1300.
- Takajo** T, Anzai K. (2020) Is There a Simple and Easy Way to Detect Singlet Oxygen? Comparison of Methods for Detecting Singlet Oxygen and Application to Measure Scavenging Activity of Various Compounds. *Arch Pharmacol Ther.* 2(2):29-33.
- Tamayo** D. A., (2014) Desarrollo de recubrimientos antimicrobianos sobre dispositivos médicos, *Tesis de licenciatura en Biotecnología*, Universidad de Zaragoza
- Tang**, W., Xu, H., Kopelman, R., Philbert, M.A. (2005). Photodynamic characterization and in vitro application of methylene blue-containing nanoparticle platforms. *Photochemistry and photobiology*, 81(2), 242–249. <https://doi.org/10.1562/2004-05-24-RA-176.1>
- Tao** X, Yang YJ, Liu S, Zheng YZ, Fu J, Chen JF. (2013) Poly(amidoamine) dendrimer-grafted porous hollow silica nanoparticles for enhanced intracellular photodynamic therapy. *Acta Biomaterialia*, 9: 6431–6438.
- Taylor**, V M, Cedeño, D L., Robledo, S M. (2011). Fototerapia para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. *Infection*, 15(4), 277-288. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-93922011000400010&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922011000400010&lng=en&tlng=es).
- Thomas** E., Roman E., Claypool S., Manzoor N., Pla J., Panwar S.L. (2013) Mitochondria influence CDR1 efflux pump activity, Hog1-mediated oxidative stress pathway, iron homeostasis, and ergosterol levels in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57(11):5580–5599. doi: 10.1128/AAC.00889-13.
- Trejo** Márquez M.A. (2010). Aplicación de recubrimientos comestibles. Taller multidisciplinario de ingeniería en alimentos-procesos tecnológicos de frutas y hortalizas. Facultad de estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Valenzuela**, C. (2006). Obtención de quitosano de pota empleando altas dosis de radiación gamma. Tesis para optar el título profesional de químico, Lima, Perú.
- Velasco-Rodríguez**, V., Cornejo-Mazón, M., Flores-Flores, J.O., Gutiérrez-López, G.F., Hernández-Sánchez, H.. (2012). Preparation and properties of alpha-lipoic acid-loaded chitosan nanoparticles. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(1), 155-161
- Verlee**, A., Mincke S., Stevens Ch.V. (2017). Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 164: 268- 283.
- Wainwright** M. (2010) Safe photoantimicrobials for skin and soft-tissue infections. *Int J Antimicrob Agents*, 36(1):14. Available from: <https://core.ac.uk/download/pdf/186637995.pdf>
- Wang**, L. X., Li, J. W., Huang, J. Y., Li, J.H., Zhang, L.J., O'Shea, D., Chen, Z.L. (2015). Antitumor activity of photodynamic therapy with a chlorin derivative in vitro and in vivo. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(9), 6839–6847. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3395-1>

- Wei, D., Sun, W., Qian, W., Ye, Y., Ma, X.** (2009). The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydrate Research*, 344(17), 2375-2382.
- Wei, W.; Yu, D.; Xiao, W.** (2008). Physical properties of fungal chitosan. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 2717-2720.
- Wilson, B.C., Patterson, M.S.** (2008). The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Physics in Medicine and Biology*, 53(9), R61-R109. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/53/9/R01>
- Winterbourn C., Hampton M.** (2008) Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, 45: 549-561.
- Xian-Fu Z., Xiaoli L.** (2011) The photostability and fluorescence properties of diphenylisobenzofuran, *Journal of Luminescence*, 131 (11): 2263-2266, <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2011.05.048>.
- Yagnik, D., Serafin, V., J Shah, A.** (2018). Antimicrobial activity of apple cider vinegar against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*; downregulating cytokine and microbial protein expression. *Scientific reports*, Num. 100.
- Yu, R.; Hang, Y. D.** (1989). Kinetics of direct fermentation of agricultural commodities to L (+) lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Biotechnology Letters*, 11: 597-600.
- Zamani, A.; Edebo, I.; Sjostrom, B.; Mohammad, J.** (2007). Extraction and precipitation of chitosan from cell wall of zygomycetes fungi by dilute sulfuric acid. *Biomacromolecules*, 8: 3786-3790.
- Zhang, M., Haga, A., Sekiguchi, H., Hirano, S.** (2000). Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27, 99-105.
- Zheng, L.Y.; Zhu, J.F.** (2003) Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydr. Polym.*, 54, 527-530.

## 12. Anexos

### Pruebas estadísticas

- UFC/ml recuperadas en MF 1 y 3

#### *S. aureus*

##### ANOVA

UFC

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3481000000	1	3481000000	139.240	.007
Dentro de grupos	50000000,00	2	25000000,00		
Total	3531000000	3			

#### *K. pneumoniae*

##### ANOVA

UFC

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,323E+10	1	1,323E+10	.110	.771
Dentro de grupos	2,399E+11	2	1,199E+11		
Total	2,531E+11	3			

- Comparación de los grupos control

#### *S. aureus*

##### ANOVA

UFC

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	6,250E+10	1	6,250E+10	.148	.738
Dentro de grupos	8,450E+11	2	4,225E+11		
Total	9,075E+11	3			

#### *K. pneumoniae*

**ANOVA**

UFC

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2,500E+11	1	2,500E+11	.034	.872
Dentro de grupos	1,492E+13	2	7,460E+12		
Total	1,517E+13	3			

- Porcentaje de inhibición de las diferentes concentraciones de AM

*K. pneumoniae*

**ANOVA**

Inhibición

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	16009.241	6	2668.207	333.643	.000
Dentro de grupos	55.980	7	7.997		
Total	16065.221	13			

Tukey B<sup>a</sup>

AM	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
1.00	2	15.4347	
2.00	2	20.5298	
6.00	2		89.0397
3.00	2		92.3842
4.00	2		92.7484
5.00	2		93.1788
7.00	2		95.9603

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2.000.

*S. aureus*

**ANOVA**

Inhibición

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	19510.724	6	3251.787	374.596	.000
Dentro de grupos	60.766	7	8.681		
Total	19571.490	13			

**Inhibición**

Tukey B<sup>a</sup>

AM	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
2.00	2	4.2980		
1.00	2	6.1177		
4.00	2		56.1605	
3.00	2		60.7450	
7.00	2			92.5501
5.00	2			94.5558
6.00	2			98.5674

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2.000.

- Porcentaje de inhibición sobre *K. pneumoniae* de los diferentes tratamientos

**ANOVA**

Inhibición

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	35381.213	5	7076.243	354.956	.000
Dentro de grupos	598.066	30	19.936		
Total	35979.279	35			

**Inhibición**

HSD Tukey<sup>a</sup>

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
2.00	6	16.2773			
1.00	6	20.6434			
3.00	6		68.9391		
4.00	6		75.7947		
5.00	6			86.6718	
6.00	6				97.4301
Sig.		.546	.114	1.000	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.

- Porcentaje de inhibición sobre *S. aureus* de los diferentes tratamientos

**ANOVA**

Inhibición

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	16149.139	5	3229.828	43.755	.000
Dentro de grupos	2214.500	30	73.817		
Total	18363.639	35			

**Inhibición**

HSD Tukey<sup>a</sup>

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
1.00	6	7.0000		
2.00	6	10.0000		
3.00	6		36.8333	
4.00	6		39.5000	
5.00	6		47.1667	
6.00	6			68.3333
Sig.		.990	.323	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.

- ANOVA factorial del % de I sobre *K. pneumoniae* para la determinación del sinergismo

**Analysis of Variance**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	P-Value	Significant at 5%?
Model	5	35307.33	7061.467	339.131	0.0000	Yes
TRATAMIENTO	2	34765.17	17382.58	834.809	0.0000	Yes
EXPOSICION	1	169	169	8.116	0.0079	Yes
TRATAMIENTO*EXPOSICION	2	373.1667	186.5833	8.961	0.0009	Yes
Error	30	624.6667	20.82222			
Total(Adjusted)	35	35932	1026.629			

- ANOVA factorial del % de I sobre *S. aureus* para la determinación del sinergismo

**Analysis of Variance**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	P-Value	Significant at 5%?
Model	5	16149.14	3229.828	43.755	0.0000	Yes
TRATAMIENTO	2	14756.72	7378.361	99.955	0.0000	Yes
EXPOSICION	1	720.0278	720.0278	9.754	0.0039	Yes
TRATAMIENTO*EXPOSICION	2	672.3889	336.1945	4.554	0.0187	Yes
Error	30	2214.5	73.81667			
Total(Adjusted)	35	18363.64	524.6754			

