

# Eliminación de *E. coli* usando fotodinámica potenciada con nanoestructuras de oxígeno.

## Elimination of *E. coli* using photodynamic enhanced by oxygen nanostructures.

Mireya Estefany Márquez López (1).  
CINVESTAV-Monterrey, Parque PIIT, Autopista al Aeropuerto km. 9,5, Apodaca, NL. México.  
[mireya.marquez@cinvestav.mx](mailto:mireya.marquez@cinvestav.mx).

Alberto Daniel Ortega Zambrano (2). Department of Electrical and Computer Engineering, North Carolina State University, Raleigh, NC, 27606, USA, [aldaox@hotmail.com](mailto:aldaox@hotmail.com).

Hilda Mercado Uribe\* (3). CINVESTAV-Monterrey, Parque PIIT, Autopista al Aeropuerto km. 9,5, Apodaca, NL. México, [hmercado@cinvestav.mx](mailto:hmercado@cinvestav.mx).

\*corresponding author.

Artículo recibido en octubre 05, 2024; aceptado en octubre 18, 2024.

### Resumen.

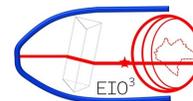
*La inactivación fotodinámica es un método alternativo que se basa en el uso de una molécula fotosensible que es irradiada a una longitud de onda apropiada en un ambiente con oxígeno molecular. Esto permite la generación de especies reactivas de oxígeno capaces de dañar y eliminar microorganismos. En el presente trabajo investigamos el efecto de la adición de nanoestructuras de oxígeno obtenidas mediante un aparato fabricado en el CINVESTAV-Unidad Monterrey, con el propósito de potenciar la generación de oxígeno singlete y la consecuente fotoinactivación de la bacteria *E. coli*. El resultado fue una potenciación de 58 veces en la reducción de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) con respecto al caso tradicional.*

**Palabras claves:** *E. coli*, fotoinactivación, oxígeno singlete.

### Abstract.

*Photodynamic inactivation is an alternative method based on the use of a photosensitive molecule which is exposed at an appropriate wavelength in an environment with molecular oxygen. This allows the generation of reactive oxygen species capable of damaging and eliminating microorganisms. In the present work, we investigated the effect of the addition of oxygen nanostructures obtained by a device manufactured at CINVESTAV-Monterrey to enhance the generation of singlet oxygen and the consequent photoinactivation of the *E. coli* bacteria. The result was an enhancement of 58 times in the reduction of Colony Forming Units (CFU) respect to the traditional case.*

**Keywords:** *E. coli*, photoinactivation, singlet oxygen.



## 1. Descripción de la conferencia.

La resistencia antimicrobiana (RAM) se origina por mutaciones de las bacterias en respuesta al uso de fármacos. La RAM representa una amenaza considerable para la salud humana a nivel mundial. Se estima que, en el año 2050 alrededor de 10 millones de personas perderán la vida por esta causa, que también costará un gasto aproximado de 100 billones de dólares a la economía mundial (O'Neill J., 2016). Por ello, es una necesidad urgente investigar e implementar métodos alternativos que sean capaces de inactivar microorganismos patógenos, y que a su vez tengan menos potencial para desarrollar nuevas resistencias. Una de estas alternativas es la inactivación fotodinámica (IFD) (Comini, L, 2010 & Mariam, M., 2016).

La IFD se basa en el uso de una molécula fotosensible que es irradiada a una longitud de onda apropiada en un ambiente con oxígeno molecular en donde se encuentra el cultivo celular bajo estudio. La molécula excitada decae a su estado basal, y en este proceso puede interactuar con el oxígeno molecular ocasionando la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Las ROS inducen daños en biomoléculas esenciales, como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Una de las ROS más citotóxica es el oxígeno singlete (Cieplick, F., 2014).

Diversos grupos de investigación han enfocado sus esfuerzos en el área de IFD sintetizando nuevas moléculas fotosensibilizadoras, o modificando otras ya estudiadas (Tingting H. & Zhengdi W., 2021). Sin embargo, hasta la fecha no se ha prestado atención a trabajar con el oxígeno molecular. Este estudio se basa en producir un aumento en la concentración del oxígeno molecular en cultivos de *E. coli*, lo que podría desencadenar a su vez, un incremento en la generación de oxígeno singlete y, en consecuencia, la potenciación de la fotoinactivación. Para llevar a cabo este objetivo, los cultivos fueron incubados con azul de metileno (MB) y expuestos a luz roja. En otro experimento similar, antes de la irradiación, se adicionaron al cultivo nanoestructuras de oxígeno, que consisten en estructuras amorfas que involucran moléculas huésped en configuraciones mediadas por agua. El proceso de elaboración de éstas contempla el uso de un aparato diseñado y construido en el Grupo de Laboratorio del Dr. Carlos Ruiz del CINVESTAV-Monterrey (Jaramillo-Granada, y col. 2022). Posteriormente, se evaluó el incremento en la generación de oxígeno singlete, y se demostró su efecto en la fotoinactivación de la *E. coli*.

## 2. Métodos.

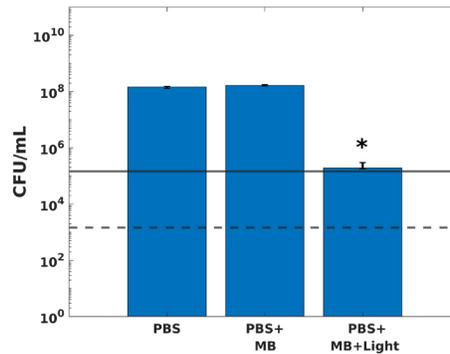
La cepa utilizada en este proyecto fue la *E. coli* K12- MG1655. El protocolo para el cultivo de esta bacteria ha sido estandarizado ya por nuestro grupo de laboratorio (Ortega-Zambrano y col. 2022). El fotosensibilizador usado fue el azul de metileno, preparado en solución stock estéril a una concentración de 100  $\mu$  M en PBS, a partir de otra a 46.9 mM. Las muestras sin nanoestructuras de oxígeno estuvieron conformadas por dos grupos controles y un experimental. Cada uno preparados en alícuotas de 2 mL. El primero de los controles (control PBS) consistió en una mezcla de 900  $\mu$  L de PBS y 100  $\mu$  L de bacterias preparadas. El segundo (control fotosensibilizador) formado por 900  $\mu$  L de solución de azul de metileno y 100  $\mu$  L de bacterias preparadas. El grupo experimental fue constituido por 900  $\mu$  L de la solución con fotosensibilizador y 100  $\mu$  L de bacterias preparadas.

Las muestras con nanoestructuras de oxígeno estuvieron constituidas por grupos similares a los anteriores, ajustando las concentraciones de cada componente, PBS, bacterias y nanoestructuras. En ambos casos se realizaron tres experimentos independientes y por triplicados.

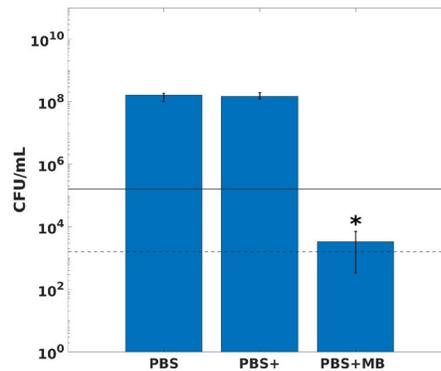
La medición de oxígeno singlete se llevó a cabo en cajas de Petri de 35 x10 mm. Tanto para este proceso, como para las irradiaciones de las muestras, se utilizaron arreglos optoelectrónicos implementados en trabajos previos en nuestro grupo de investigación (Ortega-Zambrano y col. 2022). Al concluir este último, se realizaron cultivos de bacterias por el método de vertido en caja, para poder determinar cuántas colonias sobrevivieron al proceso de irradiación.

### 3. Resultados.

En las **Figs. 1 y 2** se presentan los resultados de la fotoinactivación con y sin nanoestructuras de oxígeno. La adición de las nanoestructuras de oxígeno a la muestra evidenció un aumento casi inmediato en la generación de oxígeno singlete al ser expuesto a la luz roja. El uso de nanoestructuras de oxígeno produce una potenciación en la fotoinactivación de 58 veces más que el caso tradicional.



**Figura 1.** Fotoinactivación de *E. coli* con MB. Las primeras dos barras representan a los controles, PBS y fotosensibilizador (10  $\mu$  M), respectivamente. La tercera barra la fotoinactivación de la bacteria. La línea continua representa una reducción de 3 log<sub>10</sub>, y la línea punteada una reducción de 5 log<sub>10</sub>, n=3. \*p<0.05.



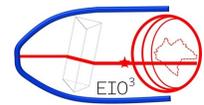
**Figura 2.** Fotoinactivación de *E. coli* con nanoestructuras de oxígeno y MB. Las primeras dos barras corresponden a los controles, PBS y fotosensibilizador (10  $\mu$  M), respectivamente. La tercera es la fotoinactivación de la bacteria con nanoestructuras. La línea continua representa una reducción de 3 log<sub>10</sub> y la punteada una reducción de 5 log<sub>10</sub>. \*p < 0.05.

### Conclusiones.

La fotoinactivación de *E. coli* mediante luz roja, azul de metileno y nanoestructuras de oxígeno adicionadas al cultivo celular, produce un efecto potenciador de 58 veces más que el caso tradicional.

### Créditos.

El autor agradece al CONAHCyT México por el financiamiento del proyecto A1-S-8125.



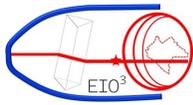
### Referencias bibliográficas.

- Cieplik, F. y col. (2014)** *Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens*. *Frontiers in Microbiology*. 5 (2014), 1-17.
- Comini, L. R. & Núñez, S. (2010)** *Fotosensibilizadores naturales activos en terapia fotodinámica*. Bitácora digital, FCQ, UNC. 1-3.
- Márquez, M. E. (2023)**. *Fotoinactivación de Escherichia coli potenciada con nanoestructuras de oxígeno* (Tesis de maestría). CINVESTAV-Monterrey, México.
- Jaramillo-Granada, Reyes-Figueroa & Ruiz-Suárez, J.C. (2022)** *Xenon and krypton dissolved in water form nanoblobs: No evidence for nanobubbles*. *Physical Review Letters*, 094501.
- Mariam M. A. & col. (2016)** *Important cellular targets for antimicrobial photodynamic therapy*. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 100(17), 7679-7688.
- O'Neill J. (2016)** *Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations*. *Medicine, Environmental Science*, <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:36259397>.
- Ortega-Zambrano, D., Fuentes-López, D. & Mercado-Uribe, H., (2022)** *Photoinactivation of Escherichia coli using five photosensitizers and the same number of photons* *Journal of Innovative Optical Health Sciences* 15(6), DOI: 10.1142/S1793545822400107.
- Tingting, H. & Zhengdi W. (2021)** *Recent advances in innovative strategies for enhanced cancer photodynamic therapy*. *Theranostics* 11(7), 3278-3300.

### Biografía de los investigadores.



**Mireya Estefany Márquez López**, Estudiante de Doctorado en Ingeniería y Física Biomédicas del CINVESTAV-Monterrey. Es miembro del grupo experimental de la Dra. Hilda Mercado, y su trabajo se ha centrado en usar métodos novedosos para potenciar el efecto de la fotodinámica, como el uso de nanoestructuras de oxígeno. Realizó sus estudios de Maestría en Ingeniería y Física Biomédicas en la misma institución, y la licenciatura en Física en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.



**Alberto Daniel Ortega Zambrano**, Doctor en Ingeniería y Física Biomédicas del CINVESTAV-Monterrey. Realizó sus estudios de doctorado en el grupo de la Doctora Hilda Mercado. Se especializó en Fotodinámica de bacterias y células de cáncer. Realizó sus estudios de Licenciatura en Ingeniería Biomédica, y de Maestría en Ingeniería en Electrónica y Computación en el CUCEI, de la Universidad de Guadalajara. Actualmente se encuentra haciendo una estancia posdoctoral en la Universidad de Carolina del Norte.



**Hilda Josefina Mercado Uribe**, Doctora. en Física, trabaja en el CINVESTAV-Unidad Monterrey desde el 2006. Es egresada del Instituto de Física de la Universidad de Guanajuato. Sus líneas de investigación son el estudio de la hidratación de biomoléculas y la fotodinámica en microorganismos patógenos y células cancerígenas. Ha graduado 6 estudiantes de doctorado, 14 de maestría y 6 de licenciatura. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores, nivel 2.