



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE HIDALGO



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingenierías

Licenciatura en Ingeniería en Electrónica y Telecomunicaciones

**DISPOSITIVO ELECTRÓNICO PARA LA APLICACIÓN DEL
PROCESO DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA EN HONGOS
DERMATOFITOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

INGENIERO EN ELECTRÓNICA Y TELECOMUNICACIONES

Presenta:

Erick Iván Barros de la Cruz

Asesores:

Dra. Karina Alemán Ayala

Dra. Teresita Spezzia Mazzoco

M. en C. Julián Ramírez Ramírez

Abril 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Institute of Basic Sciences and Engineering
Área Académica de Computación y Electrónica
Computer Science and Electronics Department

Mineral de la Reforma, Hidalgo, a 13 de marzo del 2018.

Número de control: ICBI-AACyE/387/2018
Asunto: Autorización de impresión de Tesis

PDIET. Erick Iván Barros de la Cruz
 Presente.

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado al trabajo de titulación de nombre "Dispositivo electrónico para la aplicación del proceso de la terapia fotodinámica en hongos dermatofitos" después de ser revisado en reunión de sinodales, ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE: Ing. Emmanuel Gutiérrez Rojas
 PRIMER VOCAL: Dra. Karina Alemán Ayala
 SEGUNDO VOCAL: Dra. Rosa Ángeles Vázquez García
 TERCER VOCAL: M. en C. José Rogelio Efraín Escorcía Hernández
 SECRETARIO: Dr. Esteban Rueda Soriano
 PRIMER SUPLENTE: Ing. Mauricio Hernández Castillo
 SEGUNDO SUPLENTE: Ing. Benigno Martínez Gutiérrez

Sin otro particular, le reitero a usted la seguridad y mi atenta consideración.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Atentamente
 "Amor, Orden y Progreso"

Ing. Emmanuel Gutiérrez Rojas
 Coordinador de la Licenciatura en
 Ingeniería en Electrónica y Telecomunicaciones



Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
 Área Académica de Computación y Electrónica

EGR/pov



Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5
 Colonia Carboneras
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
 Tel. +52 771 7172000 ext. 6320
 aacye_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

Índice

Índice de figuras	iii
Agradecimientos	v
Capítulo 1: Introducción.....	6
1.1 Antecedentes	6
1.2 Planteamiento del Problema	7
1.3 Justificación	8
1.4 Propuesta de Solución.....	8
1.5 Objetivos	8
1.5.1 Objetivo General	8
1.5.2 Objetivos Específicos.....	8
1.6 Hipótesis.....	8
1.7 Metodología	9
Capítulo 2: Marco Teórico.....	10
2.1 La Luz.....	10
2.1.1 Espectro Electromagnético	10
2.2 Láser	11
2.3 LEDs	13
2.4 Parámetros de la Terapia	15
2.4.1 Fotosensibilizador	16
2.4.2 Dosis de Luz.....	16
2.4.3 Efectos de los Oxígenos Reactivos	17
2.5 Muerte Celular	17
2.5.1 Apoptosis.....	18
2.5.2 Necrosis	19
2.5.3 Autofagia	20
2.6 Hongo Dermatofito	20
2.7 Medio de Cultivo	21
Capítulo 3: Desarrollo Experimental	22
3.1 Seguridad en el Laboratorio	22
3.2 Aplicaciones de la TFD con Láser.....	22
3.3 Desarrollo de la TFD	23

3.3.1 Medio de Cultivo	23
3.3.2 Inoculación del <i>T. Mentagrophytes</i>	24
3.3.3 Recolección de Esporas	25
3.4 Parámetros de las Sesiones.....	28
3.4.1 Primera Aplicación de la TFD con Láser	28
3.4.2 Segunda Aplicación de la TFD con Láser	30
3.4.3 Tercera Aplicación de la TFD	32
3.5 Diseño del Dispositivo	34
3.5.1 Selección de LEDs	34
3.5.2 Disposición de los LEDs	36
3.5.3 Alimentación del Dispositivo.....	37
3.6 Primera Aplicación de la TFD con LED.....	41
Capítulo 4: Discusión Y Resultados	43
4.1 Resultados de la Primera Aplicación con Láser.....	43
4.2 Resultados Segunda Aplicación con Laser.....	45
4.3 Resultados de la Tercera Aplicación con Láser	48
4.4 Resultados Primera Aplicación con LED	50
Capítulo 5: Conclusiones	53
Glosario	54
Bibliografía	56

Índice de figuras

Figura 1 El espectro electromagnético (Yurkanis, 2008).....	10
Figura 2 Interacción del fotón con el átomo (Alonso et al., 2010).....	12
Figura 3 Elemento LED (Stanley Electric Co., Ltd, 2008).	13
Figura 4 Alambre de unión (Stanley Electric Co., Ltd, 2008).....	14
Figura 5 Comparación entre tipo de LEDs (Stanley Electric Co., Ltd, 2008).....	15
Figura 6 Excitación triplete (Espinosa <i>et al.</i> , 2015).	16
Figura 7 Comparación de muerte celular en microscopio de Celulas Epiteliales de Mama (Herrero, 2008).	18
Figura 8 Diagrama de la Muerte por Apoptosis (Herrero, 2008).	19
Figura 9 Diagrama de la Muerte por Necrosis (Kumar <i>et al.</i> , 2013).	19
Figura 10 Diagrama del proceso de autofagia (Aráguiz <i>et al.</i> , 2006).	20
Figura 11 A) Área de Trabajo. B) Medio de cultivo en placa Petri. [Imagen en colaboración con Luis Daniel Luna Hernández].....	24
Figura 12 A) Cámara de Neubauer. B) Cuadrícula vista por microscopio.	26
Figura 13 Microplaca de 96 pozos.....	27
Figura 14 A) Espejo; B) Objetivo de Microscopio; C) Microplaca con muestra; D) Mechero de alcohol; E) Láser He-Ne. [Imagen en colaboración con Luis Daniel Luna Hernández].....	28
Figura 15 A) Control de Hongo. B) Tratamiento 20 J/cm ² con MB a 40 μM con 2 radiaciones.	30
Figura 16 A) Control Hongo. B) Tratamiento 20 J/cm ² con MB a 40 μM con 2 radiaciones.	32
Figura 17 A) Control Hongo. B) Tratamiento 10 J/cm ² con MB a 40 μM con 3 radiaciones.	33
Figura 18 LED SuperFlux (piraña).	35
Figura 19 Medición de potencia del LED. [Imagen en colaboración con Luis Daniel Luna Hernández].....	35
Figura 20 LEDs de alta potencia.	36
Figura 21 Boceto de disposición de los LEDs.....	37
Figura 22 Simulación del driver para LEDs. [Imagen en colaboración con Luis Daniel Luna Hernández].....	38
Figura 23 Simulación del driver con LEDs encendidos. [Imagen en colaboración con Luis Daniel Luna Hernández].....	39
Figura 24 Simulación de fuente de alimentación. [Imagen en colaboración con Luis Daniel Luna Hernández].....	39
Figura 25 Simulación de circuito completo. [Imagen en colaboración con Luis Daniel Luna Hernández].....	40
Figura 26 Placa de metal con LEDs. [Imagen en colaboración con Luis Daniel Luna Hernández]	40
Figura 27 A) Control Hongo. B) Tratamiento 20 J/cm ² con MB a 40 μM con 2 radiaciones.	42
Figura 28 Colonias de Controles. A) Op2 sin tratamiento de TFD. B) Control de Hongo con MB 40 μM, C) Control de Luz a 2 J/cm ² . D) Control de Luz a 5 J/cm ² . E) Control de Luz a 10 J/cm ² . F) Control de Luz a 20 J/cm ²	44
Figura 29 Colonias de Terapias con MB 40 μM. A) Op2 sin tratamiento de TFD. B) Control MB. C) Tratamiento a 2 J/cm ² con 1 radiación. D) Tratamiento a 2 J/cm ² con 2 radiaciones. E) Tratamiento a 5 J/cm ² con 1 radiación. F) Tratamiento a 5 J/cm ² con 2 radiaciones. G) Tratamiento a 10 J/cm ² con 1 radiación. H) Tratamiento a 10 J/cm ² con 2 radiaciones. I) Tratamiento a 20 J/cm ² con 1 radiación. J) Tratamiento a 20 J/cm ² con 2 radiaciones.	44
Figura 30 Colonias de Controles, 30 min de incubación. A) Op2 sin tratamiento de TFD. B) Control MB. C) Control de Luz a 3 J/cm ² con 2 radiaciones. D) Control de Luz a 3 J/cm ² con 3 radiaciones. E) Control de Luz a 20 J/cm ² con 2 radiaciones. F) Control de Luz a 20 J/cm ² con 3 radiaciones.....	46

Figura 31 Colonias de Tratamientos con MB 40 μ M y 30 min de incubación. A) Op2 sin tratamiento de TFD. B) Control MB. C) Tratamiento a 2 J/cm ² con 2 radiaciones. D) Tratamiento a 2 J/cm ² con 3 radiaciones. E) Tratamiento a 20 J/cm ² con 2 radiaciones. F) Tratamiento a 20 J/cm ² con 3 radiaciones.	46
Figura 32 Colonias de Controles, 60 min en incubación. A) Op2 sin tratamiento de TFD. B) Control MB. C) Control de Luz a 3 J/cm ² con 2 radiaciones. D) Control de Luz a 20 J/cm ² con 2 radiaciones.	47
Figura 33 Colonias de Tratamientos con MB 40 μ M a 60 min en incubación. A) Op2 sin tratamiento de TFD. B) Control MB. C) Tratamiento a 3 J/cm ² con 2 radiaciones. D) Tratamiento a 20 J/cm ² con 2 radiaciones.	47
Figura 34 Colonias de Controles a 30 min de incubación. A) Op2 sin tratamiento de TFD. B) Control MB. C) Control de Luz a 10 J/cm ² con 2 radiaciones. D) Control de Luz a 10 J/cm ² con 3 radiaciones.	49
Figura 35 Colonias de Tratamiento con MB 40 μ M a 30 min de incubación. A) Op2 sin tratamiento de TFD. B) Control MB. C) Tratamiento a 10 J/cm ² con 2 radiaciones. D) Tratamiento a 10 J/cm ² con 3 radiaciones.	49
Figura 36 Colonias de Control y Tratamiento con MB 40 μ M a 60 min de incubación. A) Op2 sin tratamiento de TFD. B) Control MB. C) Tratamiento a 10 J/cm ² con 2 radiaciones. D) Control de luz a 10 J/cm ² con 2 radiaciones.	50
Figura 37 Colonias de controles y tratamientos con MB 40 μ M. A) Op2 sin tratamiento de TFD. B) Control de Luz a 5 J/cm ² con 2 radiaciones. C) Control de Luz a 5 J/cm ² con 3 radiaciones. D) Tratamiento a 5 J/cm ² con 2 radiaciones. E) Tratamiento a 5 J/cm ² con 3 radiaciones.	51
Figura 38 Colonias de controles y tratamientos a 20 J/cm ² . A) Op2 sin Tratamiento de TFD. B) Control de Luz a 20 J/cm ² con 2 radiaciones. C) Control de Luz a 20 J/cm ² con 3 radiaciones. D) Tratamiento a 20 J/cm ² con 2 radiaciones. E) Tratamiento a 20 J/cm ² con 3 radiaciones.	52

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, al área académica de Computación y Electrónica y a todos los profesores que me impartieron clases durante mi carrera.

Agradezco a los Doctores, al Maestro y a los Ingenieros que conforman mi comité de tesis, gracias por invertir su tiempo en mí y en este documento.

Agradezco a la Doctora Teresita Spezzia Mazzocco, que actualmente trabaja en el Instituto Nacional de Astrofísica Óptica y Electrónica, y que participa en un proyecto sobre inactivación de diferentes especies de hongos dermatofitos, donde me permitió trabajar y poder desarrollar esta tesis.

Agradezco a la Doctora Karina Alemán, por guiarme, apoyarme y motivarme a concluir este trabajo de investigación. De igual forma a todas aquellas personas que me asesoraron cuando requería de su apoyo.

Agradezco al Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE) por abrirme sus puertas y permitir que pudiera realizar los trabajos que requería para sustentar esta tesis.

Agradezco a mis padres y a mi familia por su apoyo incondicional, su grande amor y su eterna paciencia hacia conmigo. A todos mis amigos, sin los cuales esto no pudo ser posible.

Agradezco al Eterno por sus infinitas bendiciones a lo largo de toda mi vida.

Capítulo 1: Introducción

1.1 Antecedentes

La Terapia Fotodinámica (TFD) es una técnica innovadora con aplicaciones biomédicas que utilizan sustancias activadas por una fuente de luz de una longitud de onda específica. La foto activación induce una cascada de eventos fotoquímicos y fotobiológicos que causan cambios irreversibles en las células expuestas y eventualmente las llevan a la muerte (Espinosa 2015).

Aunque ya en la antigüedad muchas culturas usaban tratamientos que, consistían en colocar hierbas en partes del cuerpo y posteriormente colocarlas en donde les diera la luz del sol, se dice que la TFD fue descubierta accidentalmente hace más de 100 años por Oskar Rabb y Hermann Von Tappeiner pertenecientes a la Universidad de Múnich, cuando observaron que paramecios teñidos con naranja de acridina murieron cuando fueron colocados en una zona muy iluminada. Posteriormente, encontraron que la naranja de acridina se vuelve toxica bajo iluminación visible. Usando este hecho Von Tappeiner utilizo la TFD para tratar carcinoma de piel (Espinosa 2015).

La TFD ha sido desarrollada principalmente para luchar contra las lesiones cancerosas, esta terapia se puede emplear para el tratamiento de varias condiciones, incluyendo enfermedades infecciosas. Una amplia gama de microorganismos, incluyendo bacterias Gram positivas y Gram negativas, virus, protozoos y hongos han demostrado la susceptibilidad a la terapia fotodinámica antimicrobiana. Este tratamiento puede ser una alternativa al tratamiento de las infecciones fúngicas. La terapia fotodinámica anti fúngica se ha empleado con éxito contra *Cándida albicans* y otras especies de *Cándida* y también contra dermatofitos (Pereira 2011).

Las dermatofitosis, comúnmente llamadas tiñas, son un conjunto de micosis superficiales que afectan a la piel, específicamente a la epidermis, y sus anexos (uñas y pelos). Son causadas por un grupo de hongos parásitos de la queratina llamados dermatofitos. Las más habituales son las que afectan a las uñas, ingle, planta y espacios interdigitales de pies, cuero cabelludo y cualquier zona de piel lampiña en cualquier localización anatómica. Los romanos acuñaron el término *tinea*, que significa "Apolillado", mismo que fue utilizado por Cassius en el siglo V para referirse al cuadro clínico de la *tinea capitis* quien creía que era causado por insectos o gusanos (Alexandro, 2000).

Estos dermatofitos afectan la capa córnea de la piel, pelos y uñas. Los dermatofitos se dividen en tres géneros que se distinguen por las características morfológicas de sus macroconidios: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*. En la actualidad se consideran 40 las especies causantes de enfermedad, de las cuales cinco son las más frecuentes: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *M. canis*, *E. floccosum*. El dermatofito que causa el 80-90% de esta micosis es *T. rubrum*. La mayoría de los dermatofitos tienen una amplia distribución mundial, aunque algunos están geográficamente restringidos, como *T. concentricum*. (Manzano-Gayosso, 2015)

En los años 60, investigadores de la Clínica Mayo advirtieron que al administrar hematoporfirina a pacientes con cáncer aparecían puntos de luz fluorescente en los tumores torácicos cuando se iluminaban con luz ultravioleta. A partir de esta observación se intensificó la búsqueda de sustancias que marcaran mejor los tumores. Más adelante se logró inducir la necrosis de tumores en pacientes con cáncer a los que se les administró derivados de la hematoporfirina y posteriormente fueron expuestos a una dosis de energía lumínica (Moreno *et al.*, 2007).

En 1978, Dougherty TJ desarrolló la extracción de la porción más fotosensible de los derivados de la hematoporfirina, el llamado porfímero sódico (Dougherty *et al.*, 1998) que actualmente se encuentra en el mercado como Photofrin, el cual se usa en la terapia fotodinámica con el objetivo de tratar o aliviar los síntomas del cáncer de esófago y el cáncer de pulmón de células no pequeñas.

1.2 Planteamiento del Problema

La Terapia Fotodinámica es un tratamiento donde se tienen resultados muy favorables, en México esta terapia es poco aplicada e investigada debido a que es poco conocida. Es común utilizar luz láser en las aplicaciones de los tratamientos, pero resulta costoso.

¿Qué le sucede al hongo con la Terapia Fotodinámica?

¿Qué efectos desencadena el Fotosensibilizador con la luz?

¿Qué cantidades de luz y azul de metileno son suficientes para tener un efecto anti fúngico?

¿Qué ventaja tiene cambiar una fuente de luz láser a una de luz emitida por diodos (LED)?

1.3 Justificación

Resulta interesante desarrollar este tema ya que en México la TFD es algo relativamente nuevo con aplicaciones innovadoras, con la ventaja de que se incursiona en una rama de la biología aplicando la electrónica. La intervención de la electrónica en la aplicación de la TFD, vuelve a esta más económica y eficiente.

Por otra parte, es relevante mencionar que la TFD es un tratamiento que ayuda a combatir algunas enfermedades. Algunos tratamientos que llegan a ser agresivos para el cuerpo podrían ser remplazados por dicha terapia, por ejemplo en el caso del tratamiento de la dermatitis (enfermedades de la piel), al usar colorantes inocuos estos no generan ningún tipo de alergia o reacción secundaria no deseada.

1.4 Propuesta de Solución

Diseñar una fuente de luz que consista en un dispositivo electrónico con LEDs para lograr obtener una dosis de luz igual o mayor que la que se tiene con un láser, con un menor costo.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo General

- Diseñar un dispositivo LED para la aplicación de la terapia fotodinámica en hongos dermatofitos con una metodología de optimización

1.5.2 Objetivos Específicos

- Desarrollo de la metodología para la preparación de medios de cultivo, soluciones y para la manipulación de hongos.
- Establecer la metodología de referencia para la TFD utilizando una fuente de luz láser.
- Calcular los valores de las variables (voltaje, intensidad, resistencia y potencia) para el uso de LEDs en la terapia fotodinámica.

1.6 Hipótesis

Con la aplicación de la TFD a una cantidad de fotosensibilizador definida y una dosis de luz aplicada con láser en la cepa del hongo *T. Mentagrophytes* se obtiene

un efecto anti fúngico. Usando el dispositivo LED propuesto se obtiene el mismo resultado en la TFD bajo las mismas condiciones.

1.7 Metodología

Se realizó un experimento el cual consistía en realizar varias repeticiones de la TFD, observándose que tanto afectaba a una cepa específica de hongo.

Para el desarrollo experimental se trabajó con la cepa de un hongo dermatofito aplicándole la terapia fotodinámica usando un láser, y posteriormente con un dispositivo LED para que pudiera radiar más muestras al mismo tiempo, así como al momento de pasar de un tratamiento *in vitro* a uno *in vivo* fuese más práctico y cómodo para el paciente. Para el diseño y elaboración del dispositivo se simuló el circuito por medio del software Proteus, considerando distintos tipos de LEDs para poder realizar mediciones de potencia luminosa y así realizar el prototipo con el cual se replicó los experimentos de la TFD.

Capítulo 2: Marco Teórico

2.1 La Luz

Al referirse a luz se debe tomar en cuenta que esta se comporta de dos aproximadas y paradójicas maneras, una de ellas es el modelo ondulatorio de la luz, el cual la define como una onda electromagnética donde continuamente se generan campos eléctricos y magnéticos mientras se propagan en el vacío o cualquier otro medio a una velocidad característica aproximada de $3 \cdot 10^8$ m/s (Gonzales, 2008). A esta forma de ver la luz como una onda electromagnética se le denomina Espectro Electromagnético.

Mientras que el modelo corpuscular de la luz dice que esta cuenta con una partícula elemental llamada fotón que es capaz de “chocar” con un electrón y entregarle toda su energía, poniéndolo en movimiento. A este choque entre fotón y electrón se le conoce como efecto fotoeléctrico (Gonzales, 2008).

2.1.1 Espectro Electromagnético

El espectro electromagnético es un conjunto de distintas clases de radiaciones electromagnéticas (Figura 1). Estas pueden ser: los rayos cósmicos que proceden del sol y tienen la mayor energía, las mayores frecuencias y las menores longitudes de onda; los rayos γ (rayos gamma) son emitidos por los núcleos de ciertos elementos radiactivos; los rayos X, con energía algo menor que los rayos γ , son menos dañinos, excepto en grandes dosis; la luz ultravioleta (UV), componente de la luz solar; la luz visible es la radiación electromagnética que vemos; la radiación infrarroja se percibe como calor; las microondas se aprovechan para cocinar y también en el radar; las ondas de radio poseen la menor energía de las distintas clases de radiación electromagnética (Yurkanis, 2008).

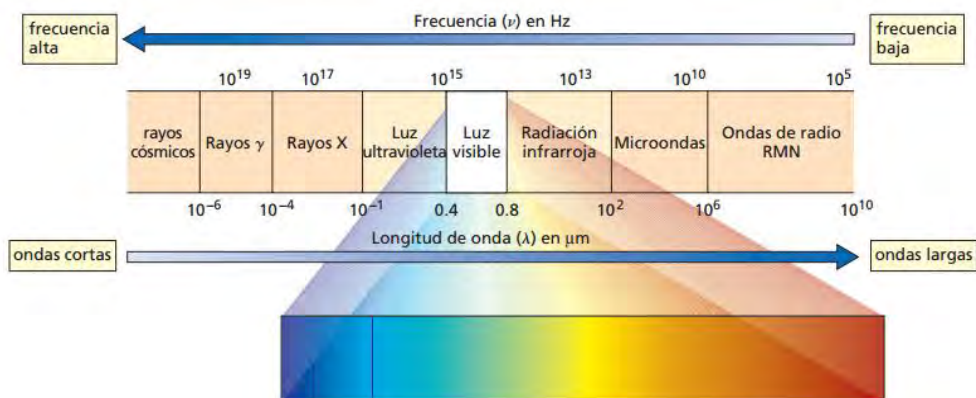


Figura 1 El espectro electromagnético (Yurkanis, 2008).

La luz visible es la radiación del espectro electromagnético a la cual el ser humano está más acostumbrado, pues es la que podemos percibir con nuestros ojos sin necesidad de algún agente externo, su rango comprende desde los 390 nm hasta los 750 nm, como se ve en la Tabla 1, en donde se pueden encontrar colores como el violeta, azul, cian, verde, amarillo, anaranjado y rojo. Cada uno de estos colores cuenta con su respectivo rango de longitudes de onda, el rojo por ejemplo va desde los 618 nm a los 780 nm (Hecht, 2000).

Tabla 1 Rangos de frecuencia de la luz visible (Hecht, 2000).

Color	λ_0 (nm)	ν (THz)*
Rojo	780-622	384-482
Naranja	622-597	482-503
Amarillo	597-577	503-520
Verde	577-492	520-610
Azul	492-455	610-659
Violeta	455-390	659-769
*1 Tera hertzio (THz) = 10^{12} Hz, 1 nanómetro (nm) = 10^{-9} m.		

2.2 Láser

La palabra láser es un acrónimo en inglés para Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, que en español significa Amplificación de Luz por Emisión Estimulada de Radiación. La clave del Láser es la emisión estimulada, que parte del principio de que un fotón interactúe con un átomo excitado (cuando el electrón ocupa un nivel de energía superior) para que decaiga a su estado fundamental (cuando el electrón se encuentra en el nivel de menor energía) y emita un nuevo fotón, el cual se caracteriza por tener las mismas propiedades idénticas al fotón inicial. En la Figura 2 se ve este proceso (Alonso *et al.*, 2010).

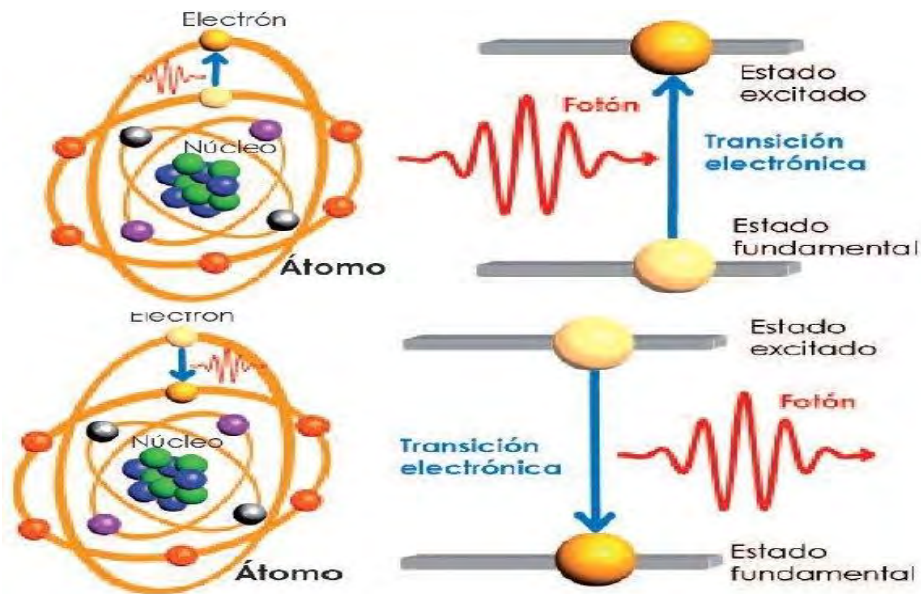


Figura 2 Interacción del fotón con el átomo (Alonso et al., 2010).

Para que un láser funcione correctamente, deben de haber más átomos excitados que en su estado fundamental, ya que en promedio debe haber más fotones agregándose que absorbidos. A este estado se le conoce como inversión. Para lograr este estado, los átomos se mantienen en un estado excitado por "bombeo" del láser con algún agente externo. Esto puede derivar en un proceso de avalancha, si pensamos que el aumento del número de fotones estimulará aún más la emisión en otros átomos excitados del medio (Lasertlab Europe, 2015).

La luz que es emitida por un láser se caracteriza por ser monocromática y coherente. Que la luz sea monocromática implica que debe de estar compuesta de paquetes de ondas electromagnéticas que tienen la misma longitud de onda, por ende, la misma frecuencia y esto hace que se emita un solo color. La coherencia se logra cuando las amplitudes relativas de la onda del rayo de luz que se emite, están en fase, esto quiere decir, que un láser genera luz que viaja en la misma dirección de manera muy ordenada en tiempo y espacio (Molpeceres, 2010).

Los láseres se pueden clasificar en diferentes maneras: según la forma de excitación, según el tipo de medio activo, según la longitud de onda que emite, según la potencia de salida, entre otros. Dentro del medio activo a su vez se pueden clasificar por láseres gaseosos, de estado sólido, eximieres y líquidos; los láseres gaseosos generan un haz de luz por un gas o una mezcla de gases. Ejemplos de este tipo de láseres son el Láser Helio-Neón (He-Ne) que emite una longitud de onda en 633 nm, continuo y de baja potencia; el Láser Argón iónico (Ar^+) que emite a 514 y 488 nm, continuo y de alta potencia; el Láser Dióxido de Carbono (CO_2) que emite en infrarrojo, puede ser continuo o pulsado, de baja y alta potencia (Torres, 2011).

2.3 LEDs

Los Diodos Emisores de Luz (LEDs por sus siglas en inglés) son tecnología de iluminación en estado sólido, que generan luz al pasar una baja corriente por dos capas de material semiconductor a diferencia de otras fuentes de luz que calientan un filamento de metal a grandes temperaturas debido a la resistencia que se genera por el paso de la corriente eléctrica. Los LEDs generan fotones de luz en un reducido rango de frecuencias que dependen del material del semiconductor y el tipo de dopaje que se utilice, el semiconductor se coloca en un una caja epoxi (polímero termoestable) que funciona de manera paralela como una lente para enfocar la luz producida (GREANPEACE, 2008).

Aunque físicamente la arquitectura de los LEDs sea diferente, tipo alfiler o de montaje superficial los componentes que permiten su funcionalidad son los mismos, siendo estos el elemento LED, el cuerpo conductor, el alambre de unión, el material de fusión y la resina de encapsulamiento.

Elemento LED: Es un tipo de dispositivo electrónico que convierte corriente eléctrica en luz, construido básicamente por una unión de capas de semiconductores tipo P y N, típicamente por compuestos tales como GaAs, GaP, AlGaInP y InGaN. Para convertir la energía de los electrones en energía luminosa, se aplica una corriente eléctrica al elemento y se inyecta corriente en la unión P-N haciendo que los electrones en el semiconductor tipo n se unan con los huecos de electrones en el semiconductor tipo p. Cuando los electrones y los huecos de electrones se recombinan, sus cargas eléctricas se anulan, pero la energía sostenida por el electrón se libera al mismo tiempo en forma de ondas electromagnéticas y se expulsa como luz. En la Figura 3 se puede ver un ejemplo básico de la configuración del elemento LED.

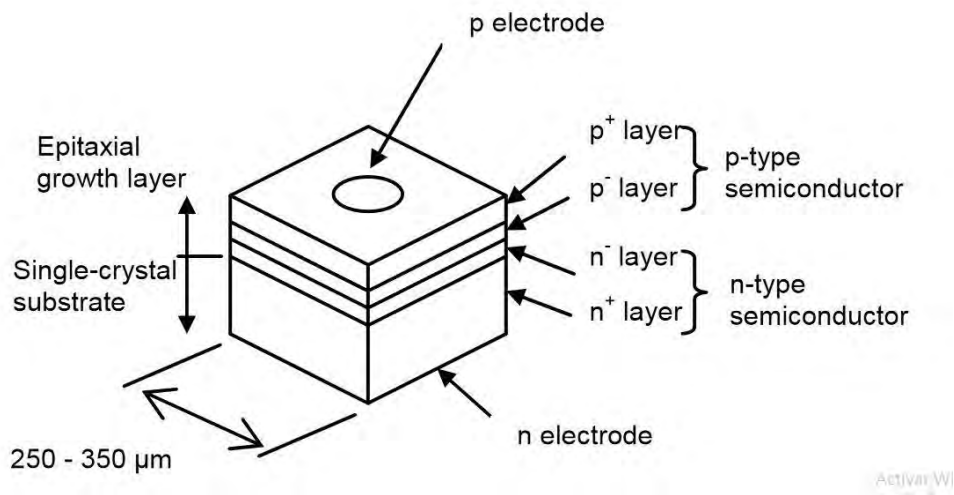


Figura 3 Elemento LED (Stanley Electric Co., Ltd, 2008).

Cuerpo conductor: Estos componentes mantienen el elemento LED y le proporcionan las conexiones eléctricas para una fuente de alimentación externa. Están hechos de una aleación de cobre y de hierro, teniendo un recubrimiento de plata altamente reflectante en la parte más cercana al elemento LED para minimizar la absorción de la luz. También juegan un papel importante en la disipación del calor del elemento LED ya que se encuentran conectados directamente al elemento y forman un canal importante para que el calor generado por el elemento escape.

Alambre de unión: En la mayoría de los casos se usa en alambre de oro para conectar el electrodo del elemento LED a una sección conductora del cuerpo conductor. Se utilizan ondas ultrasónicas para realizar la conexión y se calienta la punta del alambre con una descarga eléctrica para fundirla con el elemento LED. En la Figura 4 se puede apreciar el alambra de unión.

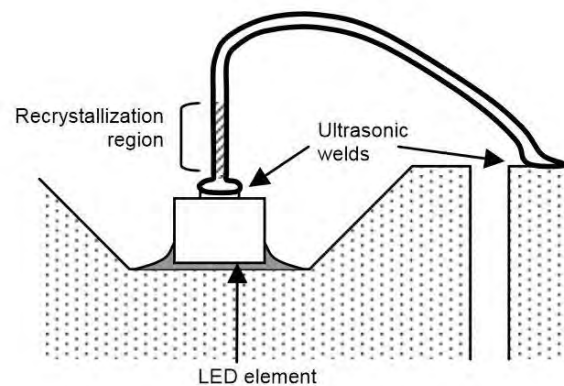


Figura 4 Alambre de unión (Stanley Electric Co., Ltd, 2008).

Material de Fusión: Este es el material utilizado para fijar el elemento LED en el marco de derivación. Debido a que la mayoría de los elementos LED están contruidos de tal manera que la corriente fluye desde las capas semiconductoras, el elemento está situado en el camino eléctrico para el cuerpo conductor. El hilo de unión se funde entonces al elemento LED para suministrar energía. El material de fusión más comúnmente utilizado es una pasta de plata compuesta de gránulos de plata suspendidos en una resina epoxi y una vez que este material se endurece tiene excelente conductividad eléctrica y térmica.

Resina de encapsulamiento: La resina llena y sella el área alrededor del elemento LED protegiéndolo de la humedad y los impactos externos. La resina usada es clara o, al menos, es una que es altamente transparente a las longitudes de onda

de luz emitidas. La construcción más sencilla es la que se utiliza para los LEDs tipo alfiler, en los que la resina soporta toda la estructura del dispositivo, utilizando en la mayoría de los casos una resina epoxi de alta resistencia. La resina también se utiliza para formar una lente en forma de cúpula que enfoca la luz emitida por el elemento LED. Agentes difusores se pueden mezclar en la resina para controlar las características de distribución de luz. En LEDs de montaje superficial, debido a que la construcción está soportada por un bastidor moldeado, pueden usarse resinas de silicio que son más flexibles que las resinas epoxi pero son más resistentes a la degradación.

En la Figura 5 se muestra una comparación de donde se ubican estos componentes en LEDs de montaje superficial o tipo alfiler, se puede apreciar de igual manera el tamaño que estos pueden llegar a tener con respecto al LED en sí.

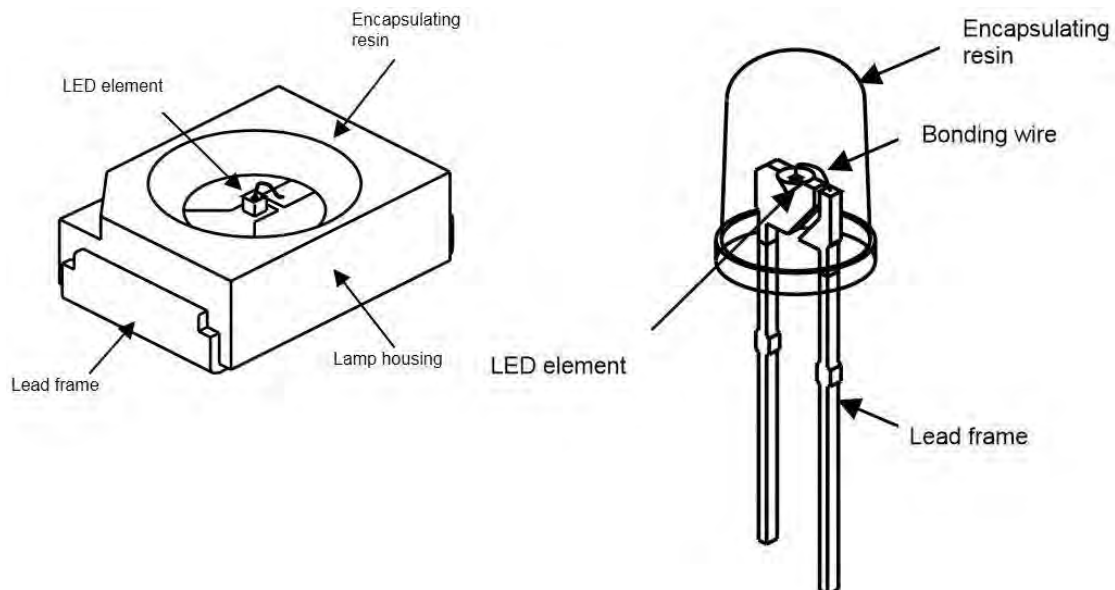


Figura 5 Comparación entre tipo de LEDs (Stanley Electric Co., Ltd, 2008).

2.4 Parámetros de la Terapia

La Terapia Fotodinámica (TFD) es una técnica innovadora con aplicaciones biomédicas que utilizan sustancias activadas por una fuente de luz de una longitud de onda específica (Espinosa *et al.*, 2015). Esta sustancia que se quiere activar se denomina como “Fotosensibilizador” que normalmente es un colorante inocuo, pero no todos los colorantes pueden ser fotosensibilizador, estos deben de poder alcanzar un nivel de excitación triplete al ser radiados con luz.

Este nivel de excitación es cuando los electrones de una molécula acceden a orbitales moleculares desocupados de más alta energía. Si los electrones toman la misma orientación del spin como estado fundamental, el spin resultante es cero y el estado excitado es llamado singulete. Si el spin tiene un valor total a uno, el estado excitado se denomina triplete y que por lo general ocasionan fosforescencia (Cabriales, 2004).

2.4.1 Fotosensibilizador

Lo que se busca al activar el fotosensibilizador, como se ve en la Figura 6, es la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) que incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos. El azul de Metileno (MB) tiene un gran potencial para ser usado como fotosensibilizador, ya que tiene una fuerte absorción de luz en el rango visible, una formación relativamente alta de ROS y tiene una larga historia de seguridad en tratamiento humano sin efectos secundarios dañinos (Redmound & Gamlin, 1999).



Figura 6 Excitación triplete (Espinosa *et al.*, 2015).

2.4.2 Dosis de Luz

La cantidad de luz que se aplique en la TFD necesita ser medida y controlada para que solo tenga los efectos deseados, dado que no solo se puede aplicar la terapia con luz visible (Choi, 2012), es necesario tener en cuenta que una sobre exposición a radiaciones concretas puede desencadenar reacciones llegan a ser perjudiciales.

La dosis de luz es igual a la cantidad de energía aplicada en una superficie, lo cual puede expresarse como J/cm^2 . Aquí el tiempo juega un papel muy importante, pues mientras más tiempo se tenga una fuente de luz radiando una superficie, mayor será la dosis de luz final. Por lo que podemos decir que la dosis de luz

(J/cm²) es igual al flujo radiante de la fuente (W) por el tiempo de la sesión (s) entre la superficie radiada (cm²). La fórmula es la siguiente:

$$Dosis \left(en \frac{J}{cm^2} \right) = \frac{W(Potencia) \text{ por } T(en \text{ segundos})}{Superficie (en cm^2)}$$

Con un simple despeje se puede obtener la fórmula de cuánto tiempo se necesita radiar una superficie para poder obtener una dosis de luz definida (Rodríguez, 2001).

2.4.3 Efectos de los Oxígenos Reactivos

Las células en un ambiente aerobio generan constantemente ROS, estos pueden regular la transcripción (proceso genético mediante el cual se transfiere la información contenida en la secuencia del ADN) y también como defensa contra infecciones patógenas. Si existe una excesiva producción de ROS se puede llegar al estrés oxidativo, daño intracelular de moléculas y membranas, y finalmente a la muerte celular por necrosis, apoptosis o autofagia. Sin embargo una de las principales ventajas de la TFD, es que los colorantes usados como fotosensibilizador no tocan el ADN, sino que, cuando una mitocondria se ve afectada por un colorante fotosensibilizador lo que sucede es que los ROS perforan pequeños orificios en la membrana mitocondrial, lo que permite que se libere citocromo C, este citocromo C inicia un proceso de apoptosis. Cuando el fotosensibilizador no entra en las mitocondrias sino que se queda en la membrana celular, entonces la muerte será necrótica porque estará afectando directamente a la membrana, rompiéndola (De Toro, 2006).

2.5 Muerte Celular

La muerte celular es un tipo de lesión celular irreversible, en el cual la célula no logra producir una reparación, que se produce por: necrosis resultante de una agresión aguda que produce la muerte de un órgano por degradación celular y la apoptosis o muerte celular programada, realizada por agentes inmunitarios propios del organismo. La autofagia es una lesión celular reversible en la cual la célula puede recobrar su integridad estructural y funcional una vez retirado el agente agresor (Uri, 2014).

Los procesos de muerte celular se pueden apreciar gracias al uso de equipo de microscopio, en la Figura 7 se muestran estos procesos en acción en células epiteliales humanas (células que forman el tejido de los órganos). En A se observa la necrosis por estrés oxidativo se ve la ruptura de la membrana, hinchazón de los organelos y pérdida de la estructura mitocondrial; en B por apoptosis inducida por radiación se observa condensación de la integridad de la cromatina; en C la autofagia se nota la formación de vesículas autofágicas siendo D una ampliificación de C donde se puede ver la doble membrana características de los autofagosomas.

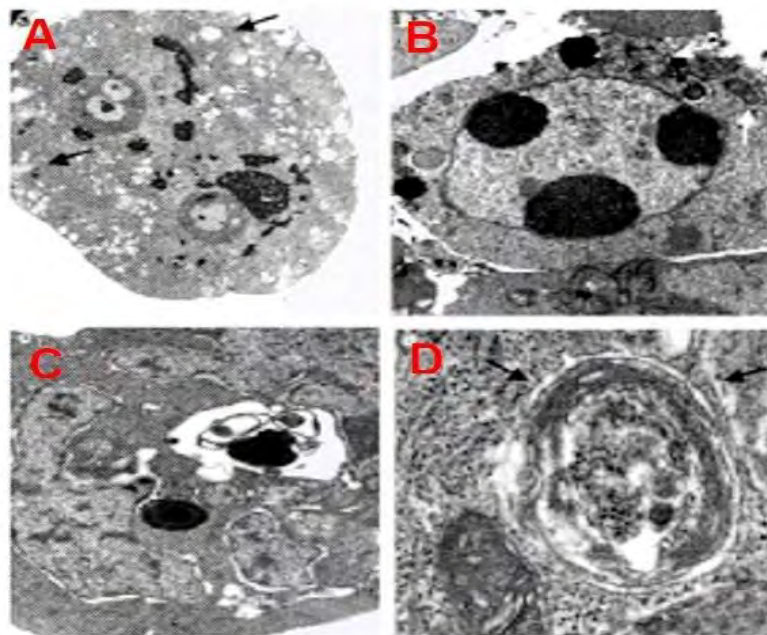


Figura 7 Comparación de muerte celular en microscopio de Celulas Epiteliales de Mama (Herrero, 2008).

2.5.1 Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada, en la que se eliminan células innecesarias para el organismo, este proceso se encuentra mediado por el sistema inmunitario y las citoquinas propias del organismo. Como se puede ver en la Figura 8, el proceso consiste en la disminución progresiva del citoplasma, junto con una condensación nuclear, se produce pérdida de tamaño de la célula (fase 1), el retículo endoplasmático liso forma pequeños cuerpos (fase 2) los cuales son fagocitados ya sea por células cercanas o por macrófagos (fase 3), donde son digeridos sin producir ningún proceso inflamatorio (Jordán, 2003).

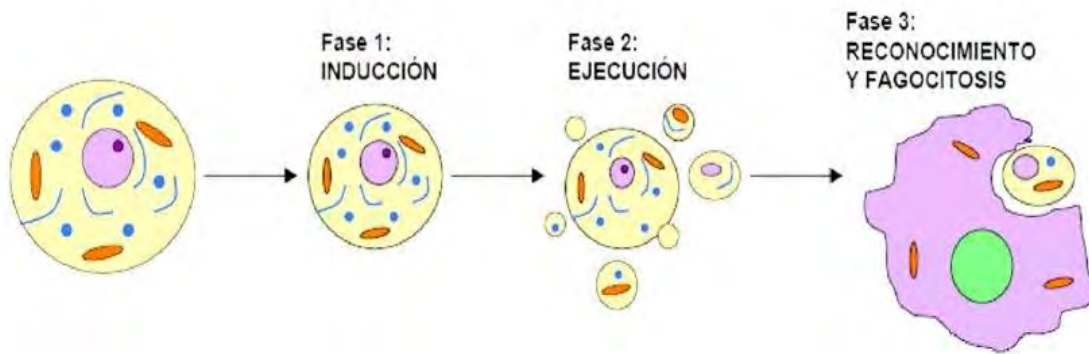


Figura 8 Diagrama de la Muerte por Apoptosis (Herrero, 2008).

2.5.2 Necrosis

La necrosis es la muerte patológica de las células o tejidos del organismo que se origina por una lesión aguda, irreversible, derivada de una situación no fisiológica y que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y de resistencia. Se considera un proceso violento ya que las células se hinchan, se deterioran las estructuras celulares, y se paralizan funciones críticas para la vida por la rotura de la membrana plasmática con la consecuente liberación al exterior de los organelos, dañando al tejido en el que se encuentra como se ve en la Figura 9. La liberación del contenido celular puede provocar a su vez reacciones inflamatorias (Lizarbe, 2007).

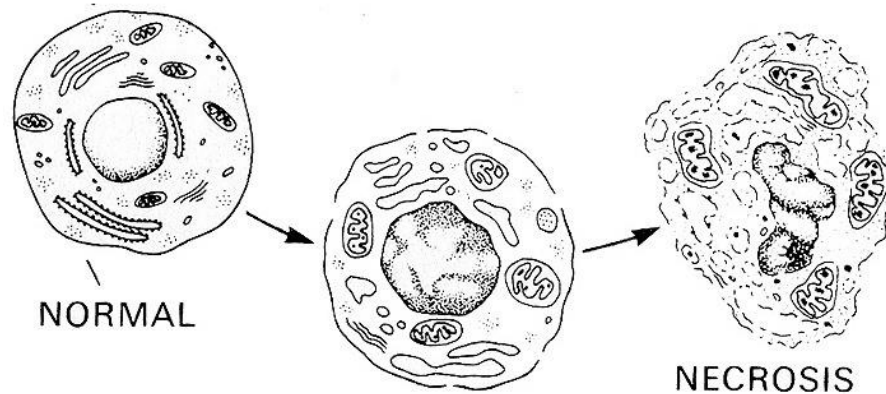


Figura 9 Diagrama de la Muerte por Necrosis (Kumar *et al.*, 2013).

2.5.3 Autofagia

Es un mecanismo adaptativo que permite mantener las funciones vitales a falta de nutrientes, que promueve la supervivencia celular, removiendo los organelos dañados, metabolitos tóxicos y patógenos intracelulares, que puede actuar como una forma de muerte celular cuando ocurre una excesiva auto-digestión y degradación de constituyentes celulares esenciales. El primer paso de la autofagia consiste en la formación de autofagosomas, que son estructuras con doble membrana que contienen organelas y otros elementos citoplasmáticos, que al fusionarse con lisosomas y el contenido interno son degradadas por enzimas hidrolíticas (Teijo, 2012).

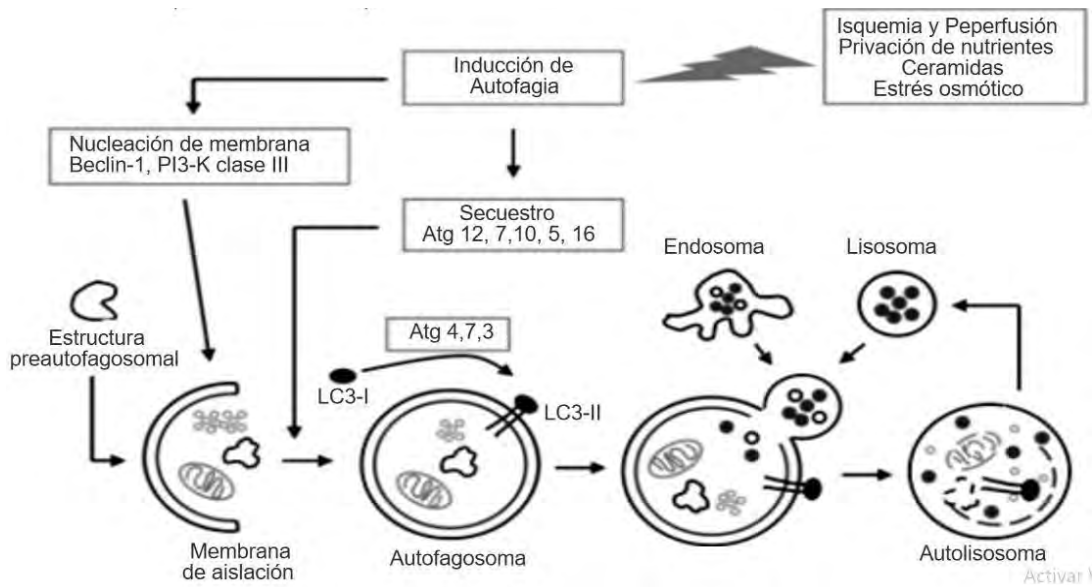


Figura 10 Diagrama del proceso de autofagia (Aráguiz *et al.*, 2006).

En la Figura 10 podemos observar como es el proceso de la autofagia, la cual al ser un mecanismo de supervivencia, donde la excesiva auto digestión sucede en el autolisosoma, tiene una probabilidad de que la célula se pueda regenerar por lo que se desearía que se produzca un proceso apoptótico más que uno necrótico al aplicarse la TFD debido a la inflamación que este último puede producir.

2.6 Hongo Dermatofito

Trichophyton Mentagrophytes es un hongo dermatofito que invade el estrato córneo de la epidermis y estructuras como el cabello y uñas, causando micosis cutáneas comúnmente conocidas como tineas (López *et al.*, 2016).

2.7 Medio de Cultivo

Un medio de cultivo es un conjunto de componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. Este medio puede contener compuestos como: macronutrientes, micronutrientes y factores de crecimiento, los cuales a su vez contienen elementos químicos y vitaminas (Doménech & García Valdés).

El medio de cultivo que fue utilizado se llama Agar Dextrosa Sabouraud, ya que este es un medio no selectivo para el cultivo y mantenimiento de hongos patógenos y no patógenos, en especial dermatofitos. El cual contiene aproximadamente por cada litro de agua purificada: 5 g de digerido péptico de tejido animal, 40 g de dextrosa y 15 g de agar (Becton, Dickinson and Company, 2015).

Capítulo 3: Desarrollo Experimental

En este capítulo se explicara de manera detenida el proceso que se realizó para la adecuada aplicación de la terapia fotodinámica en la cepa del hongo *T. Mentagrophytes*.

3.1 Seguridad en el Laboratorio

Es importante tener en cuenta algunas medidas de seguridad al trabajar en cualquier laboratorio para evitar posibles accidentes y contratiempos, al trabajar con material biológico estas medidas se intensifican. Algunas recomendaciones son:

1. Siempre utilizar bata de laboratorio, esto debido al uso de sustancias que pueden ser corrosivas o perjudiciales para la piel.
2. Utilizar siempre guantes y cubre bocas.
3. Utilizar material estéril cuando se trabaje con hongos, para no contaminar la muestra.
4. Depositar los utensilios que hayan estado en contacto con hongos en contenedores especiales.
5. Mantener siempre limpio el material de laboratorio.
6. Estar siempre atentos al trabajo que se esté realizando.

3.2 Aplicaciones de la TFD con Láser

Según los resultados obtenidos por (Spezzia-Mazzocco, 2016) se tiene que la cepa del hongo *T. Mentagrophytes* fue necesario radiarla a 60 J/cm^2 para obtener un efecto antifúngico. Debido a esto, los experimentos en los que se participó consistieron en reducir la dosis de luz pero teniendo el mismo porcentaje de muerte celular, para esto se propuso radiar la muestra 2 o 3 veces con dosis menores. Asimismo, se acordó de que las sesiones que se hicieran para encontrar esto se aplicaran con una fuente de luz láser.

El reporte de las aplicaciones de la TFD con láser se puede dividir convenientemente en 2 partes: desarrollo de la TFD y parámetros de las sesiones.

3.3 Desarrollo de la TFD

3.3.1 Medio de Cultivo

El medio de cultivo fue lo primero que se preparó dado que el hongo necesita un lugar en donde pueda proliferar, una vez hecho y puesto sobre la placa Petri su manipulación es más sencilla. Ya que la preparación del medio de cultivo es un proceso tardado, pues debe enfriarse y solidificarse es necesario hacerse unos días antes de las radiaciones. La forma de preparación de este medio se realizó de la siguiente manera:

1. Pesar en una balanza de laboratorio 35 gramos de Agar Dextrosa Sabouraud.
2. En un vaso de precipitado agregar el Agar y agua destilada hasta medir 500 ml.
3. Medir el pH de la solución, esta debe de tener 5.6, puesto que un bajo pH favorece el crecimiento de hongos, en especial los dermatofitos, con efecto ligeramente inhibitorio para las bacterias contaminantes. (Becton, Dickinson and Company, 2015)
4. Vaciar la solución en Matraces, llenándolos solo hasta la mitad de estos.
5. Colocar los matraces en un autoclave a 15 Lb de presión por 15 min.
6. Servir la solución en placas Petri.

Se usó un medidor de pH para verificar si la solución estaba en el nivel deseado, dado que con esta marca de agar se tiene un nivel más alto al de 5.6, así que fue necesario agregar un poco de Ácido Clorhídrico (HCl) para poder bajar el pH de la solución.

Después de sacar la solución de la autoclave, está presente un color un poco más oscuro (es de color marrón) y se dejó enfriar por unos 15 min para posteriormente poder vaciarla en las placas Petri (aproximadamente 20 placas). Es importante señalar que algunos procedimientos, como es el vaciado del medio en las placas Petri, se requiere tener un área de trabajo donde el riesgo de contaminación sea mínimo ya que cualquier bacteria o moho podría crecer dentro del medio de cultivo. En este caso en particular se colocaron mecheros de alcohol para delimitar dicha área de trabajo, como se ve en la Figura 11, se trabaja en la zona rodeada por los mecheros.

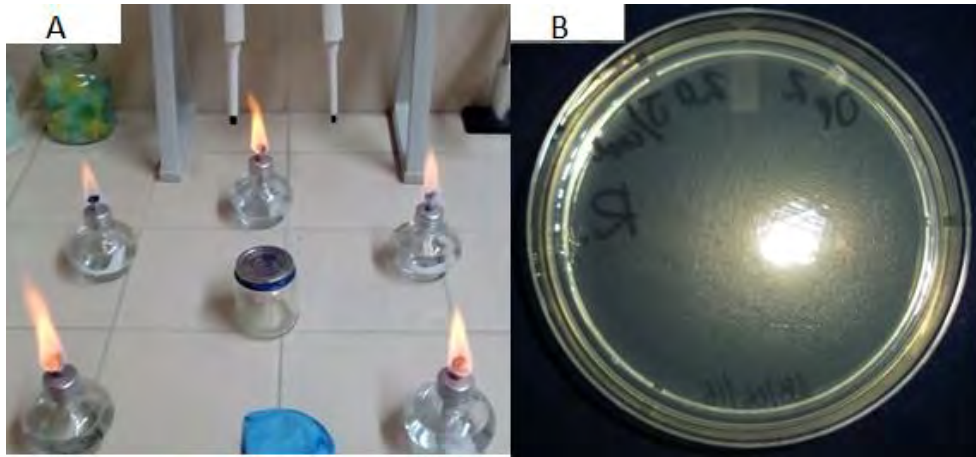


Figura 11 A) Área de Trabajo. B) Medio de cultivo en placa Petri. [Imagen en colaboración con Luis Daniel Luna Hernández]

Una vez vaciado el medio en las placas se dejaron reposar hasta que éstas se gelificaron. En la figura 11 parte B se muestra el medio en la placa.

3.3.2 Inoculación del *T. Mentagrophytes*

Contando ya con las placas del medio de cultivo listas se procedió a inocular la cepa del hongo para poder trabajar con ellas en el momento que estas tengan una mayor producción de esporas. Particularmente en esta investigación se usaron hongos con 15 días después de su inoculación.

Existen muchos métodos para la inoculación, la técnica que se aplicó en este caso en particular fue la “inoculación masiva”, la cual consiste en usar un asa metálica con la cual se raspa en los bordes de una cepa ya crecida para poder recolectar una muestra de este y así poder pasarla a una placa limpia con medio de cultivo pasando el asa formando líneas por toda la placa, esto para que el hongo puede crear colonias en toda el área disponible y crecer de una forma rápida. Otro método consiste en enterrar el asa con la muestra del hongo en la mitad del medio de cultivo, está permite ver el crecimiento del hongo de forma diferente.

Después de este proceso, la placa inoculada con el hongo se pone en una incubadora para que se mantenga en una temperatura constante de 30 °C en la obscuridad y así pueda crecer. Después de unos días, aproximadamente 4 o 5 si se realizó de forma correcta, el hongo debería de haber crecido sin contaminaciones y abarcando gran cantidad del medio de cultivo. Como ya se mencionó, la ventaja de inocular haciendo rayas con el asa, es la velocidad de crecimiento del hongo, pero si la placa llegase a contaminarse la cepa no serviría para su uso en la terapia.

3.3.3 Recolección de Esporas

Una vez que el hongo sembrado creció se dispuso a recolectar esporas que no hayan germinado, para esto se realizó un proceso el cual consiste en agregar 10 ml de una solución que no contamine la cepa donde las esporas queden suspendidas y recolectarlas con ayuda de una pipeta. Se usó un buffer fosfato salino o por sus siglas en inglés PBS (phosphate buffered saline), el cual está compuesta por 2015 mg de NaCl, 55 mg de KCl, 287.5 mg de Na₂HPO₄ y KH₂PO₄ en 250 ml de agua destilada.

Una vez obtenido el PBS, se agregaron 10 ml con ayuda de una pipeta (Accumax PRO) al interior de la placa donde se encontraba la cepa desprendiéndola con cuidado del agar, para que así la solución se mezclase solo con el hongo. Al conseguir la solución PBS mezclada con el hongo con ayuda de la misma pipeta se recolectaron las esporas. Dado que solo se quería tener esporas que aún no hayan germinado se pasó por un papel filtro hacia un frasco esterilizado para poder separarlas de las que ya estaban germinadas, este proceso de filtrado puede tardar un par de días en terminar, por lo que con la ayuda de un guante estéril se oprimió el filtro.

Una vez teniendo la muestra ya filtrada, se contó la cantidad de esporas que se tienen por ml con una cámara de Neubauer, que se muestra en la Figura 12-A, y un Microscopio de Contraste de Fase Leica DMI3000B, esto se realiza porque la cantidad por ml es directamente proporcional al número de colonias que pueden crecer en la parte final de la terapia, para determinar esta cantidad lo que se hizo fue poner 10 μ l en la parte central superior y 10 μ l en la parte central inferior de la cámara de Neubauer para así contar las esporas encontradas en 10 cuadros consecutivos de la cámara, sacar el promedio de estas y multiplicar por 250000 que es el factor para los cuadros específicos de la cámara de Neubauer que se contaron, en la Figura 12-B se muestra cómo es que se ven los cuadros con las esporas en la cámara, si la cantidad de esporas por ml es muy grande no se podría realizar el conteo de colonias al término de la TFD, puesto que dará como resultado una cifra en el orden de los miles, dicho eso se sugiere reducir el valor diluyendo la muestra para obtener un número $\times 10^5$ esporas existentes en 1 ml. Esta dilución solo consta en agregar más PBS a la muestra, tantos mililitros de PBS por tantos mililitros de muestra.

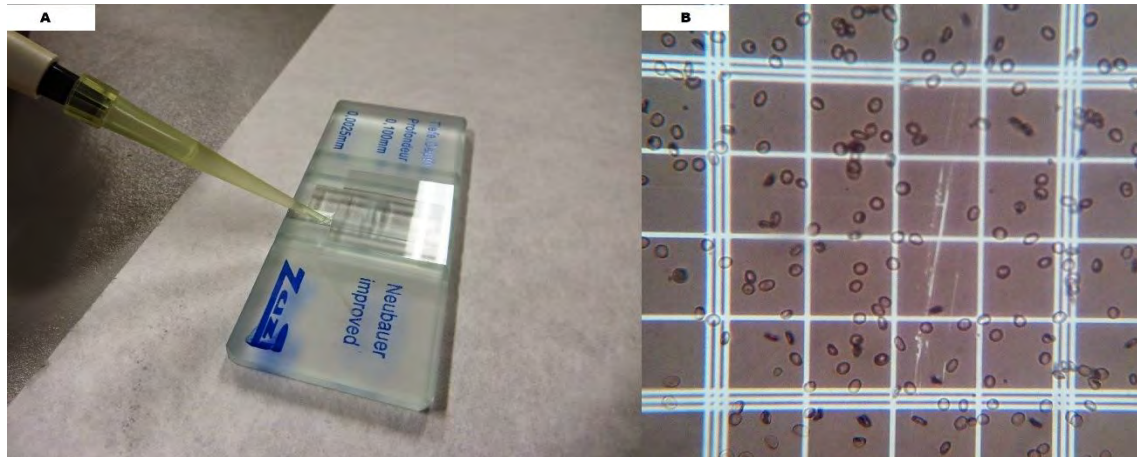


Figura 12 A) Cámara de Neubauer. B) Cuadrícula vista por microscopio.

Para poder saber si la aplicación de TFD a una muestra fue efectiva se necesita tener algo con que compararla, por lo que no solo se realiza una radiación a una única muestra, generalmente las radiaciones se realizan por duplicado esto debido a la posibilidad de contaminación de la muestra o anomalías que pudieran presentarse en el crecimiento de las esporas del hongo. Por lo que en todas las sesiones se realizaron diferentes trabajos a las muestras, los cuales se mencionan a continuación:

- Tratamiento: Consiste en añadir MB a la muestra, radiarla e incubarla (TFD)
- Control de Luz: Solo se radia la muestra sin añadir MB con la misma dosis de luz que el tratamiento.
- Control de Hongo: No se radia, ni se le agrega MB, representara el total de crecimiento del hongo.
- Control MB o control de toxicidad en oscuridad: Se añade MB pero no se radia, para conocer si existe algún efecto sin necesidad de aplicar luz

Cuando se obtiene la muestra diluida se colocan 50 μ l en una de las cavidades de una microplaca de 96 pozos, la cual se muestra en la Figura 13. Gracias a que esta microplaca tiene un código alfanumérico para identificar cada uno de los pozos, se puede designar un pozo para poner un control o un tratamiento de la muestra.

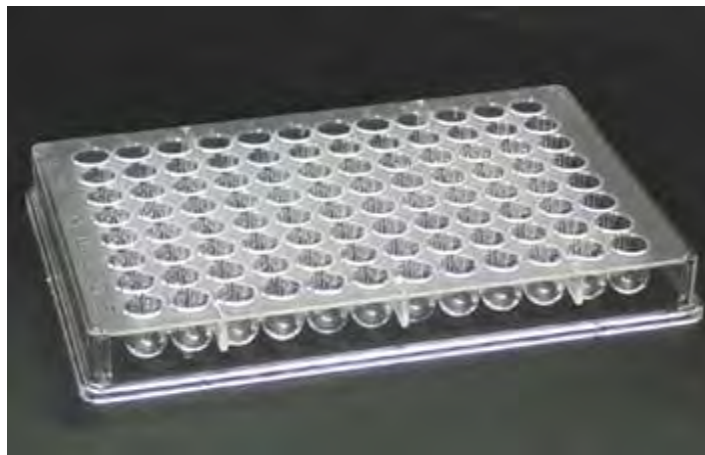


Figura 13 Microplaca de 96 pozos.

Ya que a los tratamientos y a los controles de MB se les agrega 50 μ l de solución de fotosensibilizador a una concentración de 40 μ M, estos se deben de dejar reposar antes de la primera radiación para que así las moléculas del azul de metileno tengan tiempo de penetrar en las mitocondrias de las células del hongo.

La fuente de luz con las que se hicieron las sesiones fue un láser Helio-Neón de la marca Uniphase, con una longitud de onda 633 nm y una potencia lumínica de 17 mW. Se hizo un arreglo con el láser para la realización de las radiaciones a las muestras (controles y tratamientos), se ocupó un espejo para reflejar el haz de luz hacia la microplaca y un objetivo de microscopio 10x para que el haz de luz abarcara el área de uno de los pozos de la microplaca, esta área es de 0.32 cm². Las radiaciones de igual manera se realizaron dentro del área rodeada de mecheros para evitar la contaminación de las muestras, por último, se colocó tinta china en los pozos que rodean el pozos con muestra para que la radiación no afecte las muestras adyacentes. Este arreglo se puede apreciar en la Figura 14.

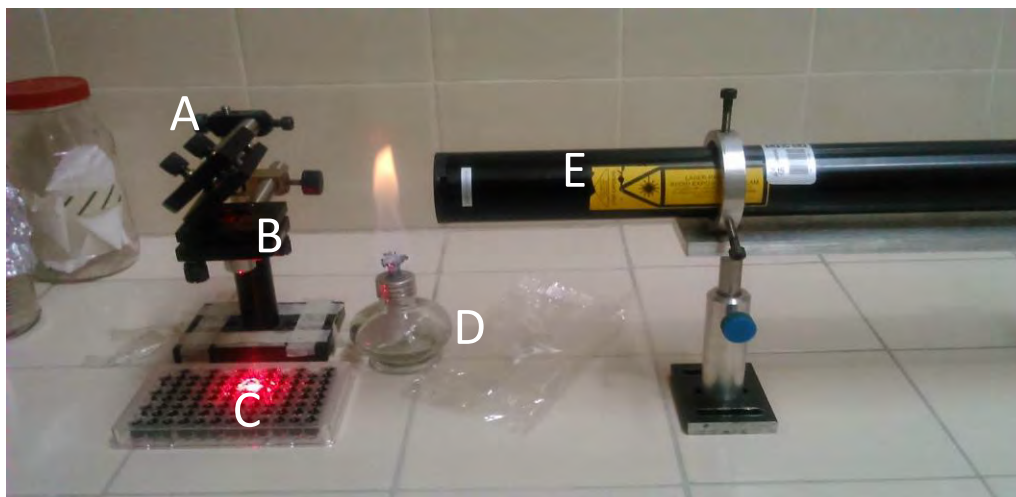


Figura 14 A) Espejo; B) Objetivo de Microscopio; C) Microplaca con muestra; D) Mechero de alcohol; E) Láser He-Ne. [Imagen en colaboración con Luis Daniel Luna Hernández]

3.4 Parámetros de las Sesiones

3.4.1 Primera Aplicación de la TFD con Láser

En esta primera aplicación de la terapia se propuso que se le aplicara a la misma muestra cuatro diferentes dosis de luz, usando Azul de Metileno (MB) como fotosensibilizador a una concentración de $40 \mu\text{M}$, las dosis de luz fueron 20 J/cm^2 , 10 J/cm^2 , 5 J/cm^2 y 3 J/cm^2 . Se realizó una corrida de la terapia, tanto tratamientos como controles, con una sola radiación de luz y otra corrida para 2 radiaciones, con 30 min de incubación entre radiaciones.

Se procedió a obtener la cantidad de esporas por cada ml de una cepa crecida con la que ya se contaba, dando como resultado que habían 6.57×10^6 esporas por ml por lo que fue necesario diluir la muestra, por lo que se dividió la cantidad resultante entre 20 dando como resultado 3.3×10^5 . Esto dio la pauta a que por cada tanto que se pusiera de la muestra se necesitarían 19 tantos más de solución PBS, por lo que se tomaron $100 \mu\text{l}$ de la muestra y $1900 \mu\text{l}$ de PBS los cuales se colocaron en un frasco esterilizado y se mezclaron. Usando la fórmula de la dosis de luz se obtuvo que los tiempos de exposición fueron de 6 min 2 s, 3 min 1 s, 1 min 30 s y 45 s respectivamente.

Tratamientos: Usando las pipetas se colocaron $50 \mu\text{l}$ de muestra y $50 \mu\text{l}$ de solución de MB en un pozo de la microplaca por cada tratamiento. Como ya se mencionó, todos los procesos con las muestras se tienen que hacer por duplicado, por lo tanto, de la corrida de una radiación por cada dosis de luz fueron 8 tratamientos y de la corrida de 2 radiaciones por cada dosis de luz fueron otros 8

tratamientos, dando un total de 16 tratamientos. Una vez que las muestras estuvieron en contacto con el MB se dejaron incubar por 30 minutos antes de pasar a radiarla con la dosis de luz correspondiente. Después de la incubación se procedió a radiar los tratamientos, tomando el tiempo con un cronómetro y acoplado el haz de luz de tal forma que abarcara solo el área del pozo de la microplaca. Para las corridas de una sola radiación, después de administrar la dosis de luz y con ayuda de una pipeta se recolectaron los 100 μ l de muestra para su inoculación en una placa Petri con medio de cultivo. Para las corridas de dos radiaciones, lo que se hizo fue dejar la muestra en incubación por otros 30 minutos después de la primera radiación, radiarla una segunda vez e inocularla en una placa Petri con medio.

Control de luz: Para estos controles con ayuda de la pipeta se agregaron 50 μ l de muestra y 50 μ l de PBS para que se radiara una cantidad igual a los tratamientos. Al no contener fotosensibilizador, estos controles no se tuvieron que incubar antes de la radiación. Se realizaron 8 controles de luz en total, 2 por cada dosis de luz, dado que solo se quería saber si existía algún efecto anti fúngico al aplicar la luz sin el MB solo se hizo la corrida de una radiación. Al igual que los tratamientos después de las radiaciones las muestras se inocularon en placas con medio.

Control de MB: Este control, al igual que los controles de luz, se realiza para saber si el fotosensibilizador tiene algún efecto anti fúngico por sí solo sin radiación. Se colocaron 50 μ l de muestra y 50 μ l de MB en un pozo de la microplaca para ponerlo a incubar por 30 min antes de su inoculación en una placa con medio.

Control de Hongo: Se realiza este control para tener un punto de comparación ya que este representara el total de colonias que forma el hongo, por lo que no se radia y no se le agrega MB. Se inoculan en una placa con medio 50 μ l de muestra y 50 μ l de PBS, esto para que sea el mismo volumen de inóculo entre tratamientos y controles.

Después de la inoculación en placas Petri con medio de cultivo, tanto de controles como de tratamientos, se dejan en la incubadora unos días para que las esporas del hongo germinen y formen colonias.

Luego de 3 días de la aplicación de la TFD se realizó un conteo de colonias a las placas Petri guardadas en la incubadora, esto se realizó poniendo las placas a contra luz, contando y marcando las unidades formadoras de colonias o UFC del hongo, las cuales tienen forma de un asterisco de color blanco. Después se les tomó foto a las placas para realzar una imagen comparativa entre ellas, la cual se explicará en el siguiente capítulo.

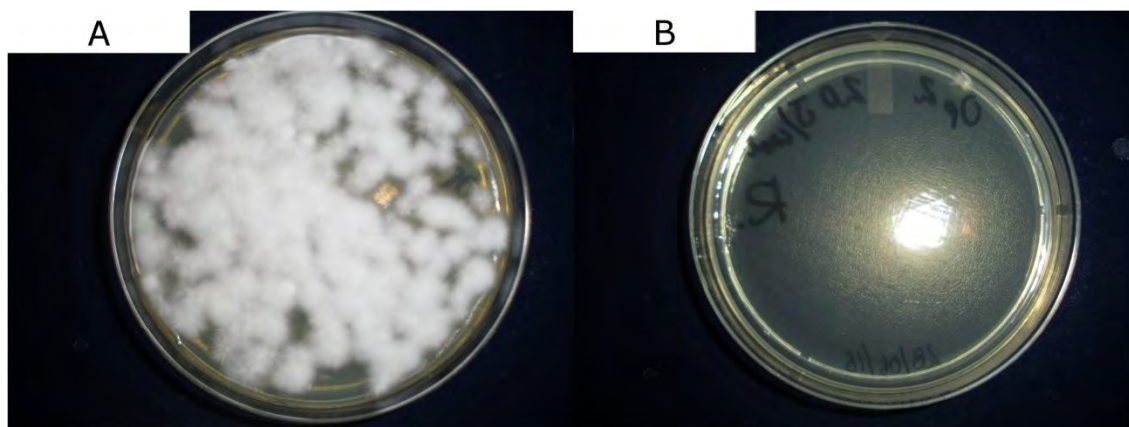


Figura 15 A) Control de Hongo. B) Tratamiento 20 J/cm² con MB a 40 μM con 2 radiaciones.

La parte A de la Figura 15 muestra la placa de control de hongo con colonias creciendo y la parte B el tratamiento con el mejor efecto en esta sesión el cual fue la dosis de luz de 20 J/cm² con 2 radiaciones, como se muestra, esta placa no contiene ninguna colonia.

3.4.2 Segunda Aplicación de la TFD con Láser

Tomando en consideración los resultados de la primera aplicación se propuso hacer otra sesión de TFD con la misma concentración de MB pero solo aplicando dosis de luz de 3 y 20 J/cm², dado que se observó que las terapias en las que se aplicó una segunda radiación de luz tuvieron un mejor efecto anti fúngico, se decidió realizar corridas de la terapia a 2 y 3 radiaciones para poder observar si es que este efecto incrementa de forma considerable con cada repetición.

De igual manera se dispuso revisar, si el incremento del tiempo de incubación que se le da a las muestras podría tener alguna alteración en la respuesta del hongo a la TFD, proponiendo que se hiciera una corrida con las mismas dosis de luz (3 y 20 J/cm²) a 2 radiaciones pero con 60 min de incubación entre repeticiones.

Los procesos que se llevaron a cabo para esta aplicación de la TFD fueron muy similares a los de la primera aplicación, se acordó en realizar tratamientos, controles de luz, control MB y control de hongo para cada corrida. Después del conteo de esporas por ml y de la dilución de la muestra, se repartió de la siguiente manera:

Tratamientos: Usando las pipetas se colocó 50 μl de muestra y 50 μl de solución MB a 40μM en un pozo de la microplaca por cada tratamiento. Teniendo un total de 12 tratamientos, 4 para la corrida de 2 repeticiones, 4 para la corrida de 3

repeticiones y 4 para la corrida de 2 repeticiones con 60 min de incubación. Una vez que las muestras estuvieron en contacto con el MB se incubaron el tiempo asignado, 8 muestras a 30 min y 4 muestras a 60 minutos, antes de pasar a radiarla con la dosis de luz correspondiente. Después de la incubación se procedió a radiar los tratamientos, tomando el tiempo con un cronometro y acoplado el haz de luz de tal forma que abarcara solo el área del pozo de la microplaca, repitiendo este proceso de incubar-radiar hasta que se cumpliera las radiaciones necesarias para cada tratamiento. Una vez concluido con las radiaciones, con la ayuda de la pipeta se recogieron los 100 μ l de cada pozo, inoculando en placas Petri con medio de cultivo, las cuales se rotularon y se metieron en la incubadora para que las colonias crecieran.

Controles de Luz: Para estos controles con ayuda de la pipeta se agregaron 50 μ l de muestra y 50 μ l de PBS para que se radiara un volumen igual a los tratamientos. Al no contener fotosensibilizador, estos controles no se tuvieron que incubar antes de la radiación. Siendo 12 controles en total, en este experimento se decidió radiarlos conforme a los tratamientos, esto es, para 2 y 3 radiaciones con incubación de 30 y 60 min según sea el caso. Una vez concluido con las radiaciones y con la ayuda de la pipeta se recogieron los 100 μ l de cada pozo, inoculándolos en placas Petri con medio de cultivo.

Control de MB: Este control, al igual que los controles de luz, se realiza para saber si el fotosensibilizador tiene algún efecto anti fúngico por sí solo sin radiación. Se colocaron 50 μ l de muestra y 50 μ l de MB en un pozo de la microplaca para ponerlo a incubar por 30 min antes de su inoculación en una placa con medio.

Control de Hongo: Se realizó este control para tener un punto de comparación ya que este representara el total de colonias que forma el hongo, por lo que no se radia y no se le agrego solución de MB. Se inoculó en una placa con medio 50 μ l de muestra y 50 μ l de PBS, esto para que sea el mismo volumen entre tratamientos y controles. Se inoculó en una placa Petri con medio de cultivo.

Al igual que en la primera aplicación, pasado 3 días de incubación se realizó un conteo de UFC a las placas Petri puestas en incubación, esto se realizó poniendo las placas a contra luz contando y marcando las esporas germinadas del hongo, las cuales tienen forma de un asterisco de color blanco. Después se les tomó foto a las placas para realizar una imagen comparativa entre ellas, la cual se explicara en el siguiente capítulo.

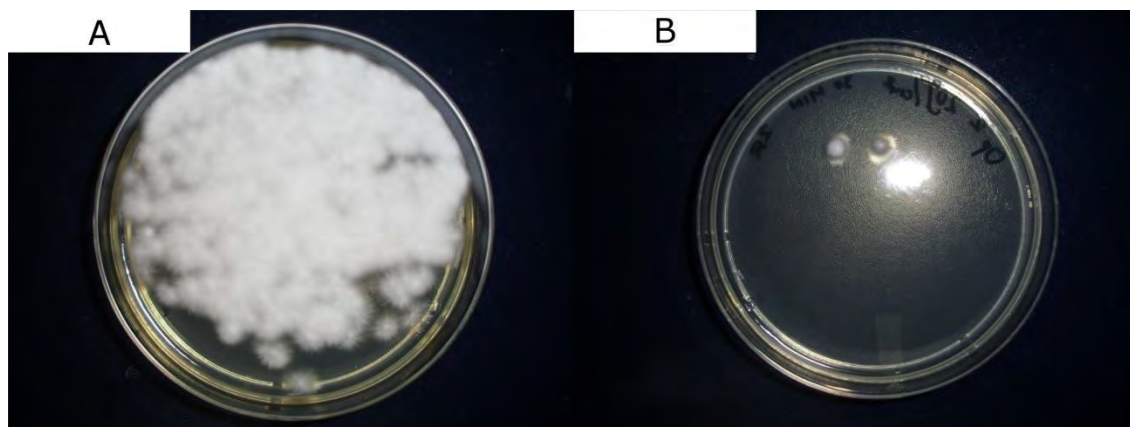


Figura 16 A) Control Hongo. B) Tratamiento 20 J/cm^2 con MB a $40 \mu\text{M}$ con 2 radiaciones.

En la parte A de la Figura 16 se muestra la placa de control de hongo con el total de UFC y en la parte B el tratamiento más eficiente con respecto a los otros en esta sesión, el cual fue la dosis de luz de 20 J/cm^2 a 2 radiaciones, como se puede observar esta placa presenta muy pocas colonias creciendo.

3.4.3 Tercera Aplicación de la TFD

A pesar de que se vio en la primera y segunda aplicación de la TFD que 20 J/cm^2 de luz láser son suficientes para tener un efecto anti fúngico en la cepa del hongo, se consideró la posibilidad de que suministrando una dosis de 10 J/cm^2 en 2 y 3 radiaciones se pudiera tener un efecto similar, planificándose así una sesión de TFD con esta dosis de luz, con la concentración de MB con la que se trabajó anteriormente con 30 min de incubación. Al mismo tiempo que se hacía una corrida con incubaciones de 60 min con 2 radiaciones para corroborar si en realidad existe una ventaja el aumentar el tiempo de incubación.

Se empezó de la misma manera en que se realizaron las otras sesiones, comenzando por el conteo de las esporas por ml para poder diluirla y así realizar los tratamientos y controles.

Tratamientos: Usando las pipetas se colocaron $50 \mu\text{l}$ de muestra y $50 \mu\text{l}$ de solución de MB a $40 \mu\text{M}$ en un pozo de la microplaca por cada tratamiento. Fueron 6 tratamientos en total, 2 para la corrida de 2 radiaciones, 2 para la de 3 radiaciones y 2 para 2 radiaciones con 60 min de incubación. Siguiendo el mismo procedimiento que se ha estado trabajando, una vez que las muestras estuvieron en contacto con el MB se incubaron durante el tiempo asignado, 4 muestras a 30 min y 2 muestras a 60 minutos antes de pasar a radiarla con la dosis de luz correspondiente. Después de la incubación se procedió a radiar los tratamientos, tomando el tiempo con un cronometro y acoplado el haz de luz de tal forma que

abarcará solo el área del pozo de la microplaca, repitiendo este proceso de incubar-radiar hasta que se cumpliera las radiaciones necesarias para cada tratamiento. Una vez concluido con las radiaciones, con la ayuda de la pipeta se recolectaron los 100 μ l de cada pozo, inoculando en placas Petri con medio de cultivo las cuales se rotularon para identificarlas.

Controles de luz: Para estos controles con ayuda de la pipeta se agregaron 50 μ l de muestra y 50 μ l de PBS para que se radiara un mismo volumen igual a los tratamientos. Al no contener fotosensibilizador, estos controles no se tuvieron que incubar antes de la radiación. Solo se realizaron 2 controles por cada tiempo de incubación, aplicándoles las mismas radiaciones que los tratamientos. Una vez concluido con las radiaciones y con la ayuda de la pipeta se recogieron los 100 μ l de cada pozo, inoculándolos en placas Petri con medio de cultivo.

Control de MB: Este control, al igual que los controles de luz, se realiza para saber si el fotosensibilizador tiene algún efecto anti fúngico por sí solo sin radiación. Se colocaron 50 μ l de muestra y 50 μ l de MB en un pozo de la microplaca para ponerlo a incubar por 30 min antes de su inoculación en una placa con medio.

Control de Hongo: Se realizó este control para tener un punto de comparación ya que este representara el total de colonias que forma el hongo, por lo que no se radió ni se le agregó solución de MB. Se inoculan en una placa con medio 50 μ l de muestra y 50 μ l de PBS, esto para que sea el mismo volumen entre tratamientos y controles. Se inoculó en una placa Petri con medio de cultivo.

Pasado 3 días de incubación se realizó un conteo de UFC a las placas Petri puestas a incubar, esto se realizó poniendo las placas a contra luz, contando y marcando las esporas germinadas del hongo, las cuales tienen forma de un asterisco de color blanco. Después se les tomó foto a las placas para realzar una imagen comparativa entre ellas, la cual se explicará en el siguiente capítulo.

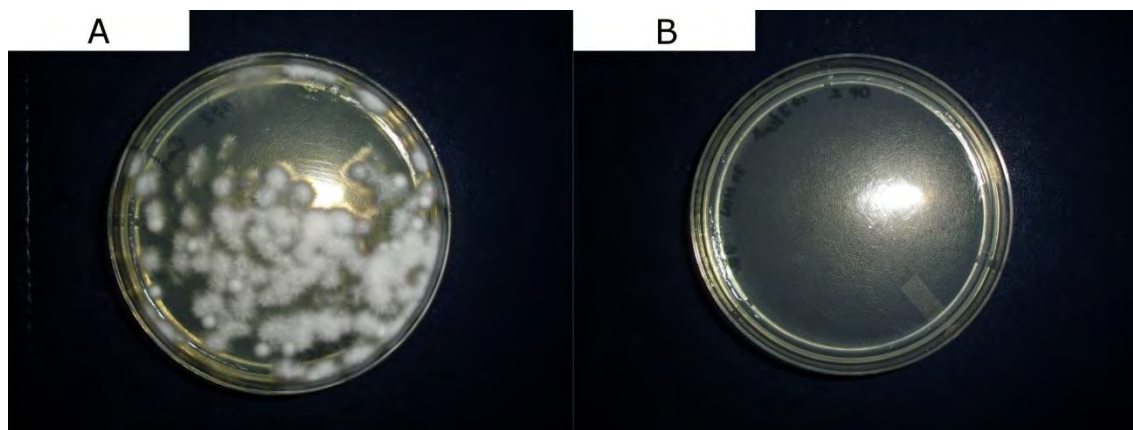


Figura 17 A) Control Hongo. B) Tratamiento 10 J/cm² con MB a 40 μ M con 3 radiaciones.

En la Figura 17 parte A se muestra la placa de control de hongo que representan el total de CFU y en la parte B el tratamiento más eficiente con respecto a los otros en esta sesión, el cual fue la dosis de luz de 10 J/cm^2 con MB a $40 \mu\text{M}$ con 3 radiaciones, como se muestra esta placa no contiene ninguna colonia creciendo.

3.5 Diseño del Dispositivo

La decisión de realizar un dispositivo que se centrará en un arreglo de LEDs para la aplicación de la TFD, fue debido a que algunos autores han reportado el uso de estos diodos en experimentos *in vivo* (da Silva, 2015) e *in vitro* (ARBOLEDA, 2014). No solo se trató de remplazar la fuente de luz LASER por una de luz LED, sino que se buscó que este cambio resultara en un menor consumo de energía y que se pudiera reducir los tiempos de radiación a las muestras en experimentos *in vitro*.

El diseño se realizó en colaboración con Luis Daniel Luna Hernández, quien era alumno de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), y que para fines prácticos fue el encargado de la selección del tipo de LEDs que se utilizarían en el dispositivo, dejando la parte de la alimentación de estos a mi cargo. De igual manera se contó con asesoramiento por parte el M. en C. Julián Ramírez Ramírez del departamento de Óptica del INAOE

3.5.1 Selección de LEDs

Al querer buscar que la eficiencia del proceso de la aplicación de la TFD fuese mejor al cambiar el tipo de fuente de luz, se tuvo que pensar en qué tipo de diodo emisor de luz era más conveniente utilizar, debido a que en el mercado existen una gran variedad de opciones. Dado que el único parámetro que se cambiaría se trataba de la potencia luminosa que suministra la fuente de luz, se requirió buscar LEDs que pudieran superar los 17.1 mW que suministraba el láser.

Se pensó en utilizar LEDs SuperFlux (igual llamados piraña) de color rojo, los cuales funcionan de 3.3 V a 3.8 V (Volts) y 30 mA a 50 mA (Ampere), se muestra en la Figura 18 uno de estos. No se utilizaron LEDs tipo pin, aunque estos sean los que más abundan en el mercado, dado a que se creyó que los piraña entregarían una mayor potencia luminosa.



Figura 18 LED SuperFlux (piraña).

Para saber que potencia entregaban los LEDs se midió utilizando un luxómetro de la marca Newport, colocando el sensor de luz enfrente de un solo LED a una distancia a la cual, la luz pudiera cubrir toda el área del sensor, así como se ve en la Figura 19. Los resultados de la medición arrojaron que la potencia fue de 0.264 mW lo que en comparación a la potencia del láser es muy poca y se tendría que concentrar la luz de varios de estos LEDs para poder alcanzarla.

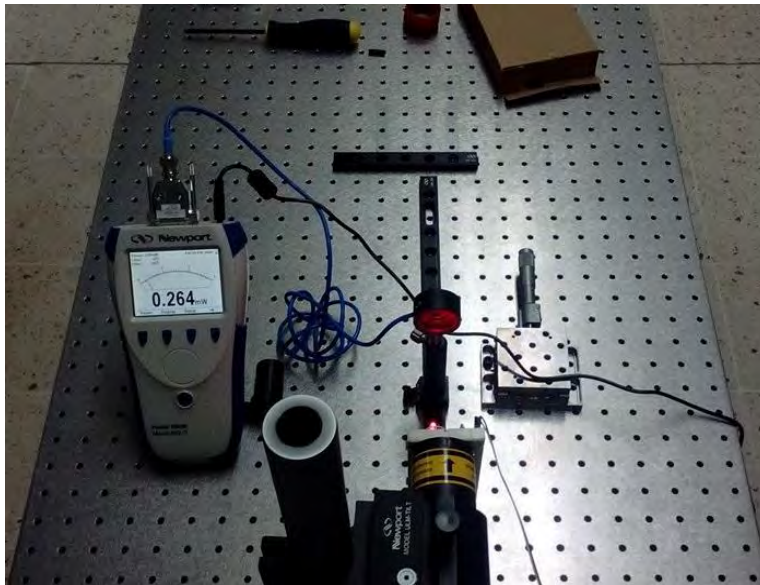


Figura 19 Medición de potencia del LED. [Imagen en colaboración con Luis Daniel Luna Hernández]

Debido a lo anterior, se supuso que LEDs con consumos similares, de voltaje y amperaje, entregarían una potencia luminosa menor a la del láser, por lo que se decidió optar por el uso de LEDs de alta potencia (Figura 20). El tipo de diodo que se dispuso para trabajar, se consigue en el mercado como “LED de 1W”, el cual trabaja de 1.8 V - 2.6 V a 350 mA y que puede llegar a consumir 1 Watt de potencia (no luminosa) de ahí su nombre, algunos modelos pueden poseer un disipador de calor. Se realizó la medición de la misma manera que con el LED anterior y dio como resultado que la potencia luminosa otorgada por este diodo

emisor de luz fue de 27.5 mW superando la del láser, por lo que se decidió que se trabajaría con este tipo de LED para seguir con los experimentos *in vitro*.



Figura 20 LEDs de alta potencia.

3.5.2 Disposición de los LEDs

Debido al bajo costo de los diodos emisores de luz que se decidieron usar (costo aproximado por unidad de \$50 MNX en el 2017) se pudo pensar en realizar un arreglo de 12 LEDs capas de radiar 12 muestras en la microplaca de 96 al mismo tiempo. Como se mencionó más arriba en este capítulo, en las aplicaciones con láser de la TFD solo se podía radiar un solo pozo de la microplaca debido al arreglo que se realizó con dicho laser.

Se consideró usar más LEDs para radiar más muestras pero dado el tamaño de la microplaca, la distancia entre pozos, el tamaño de los diodos con su disipador y el hecho de que la luz que reflejaran las muestras pueden inferir en otras muestras adyacentes, se optó que solo se usaran 12 LEDs acomodados de tal manera tomando en cuenta lo ya mencionado.

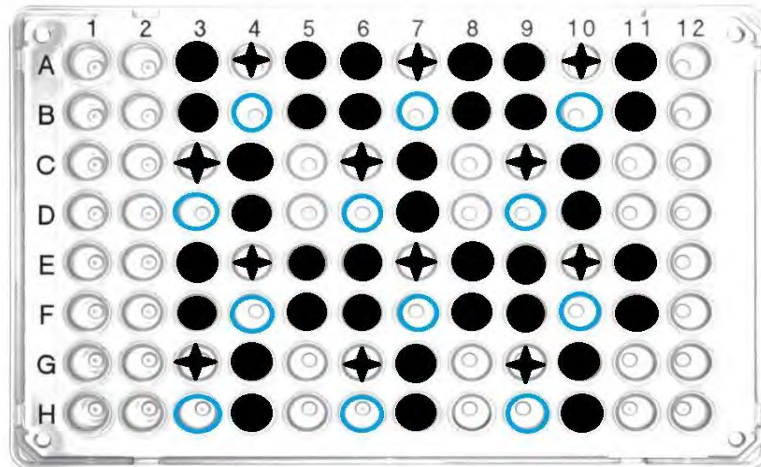


Figura 21 Boceto de disposición de los LEDs.

La Figura 21 muestra el boceto de la forma en la que se acomodarían los LEDs para que coincidieran con los pozos de la microplaca. Acomodando los diodos de esta manera se puede radiar 24 muestras por placa pero solo 12 al mismo tiempo, esto se planteó que se lograría girando el dispositivo una vez construido. Los círculos sombreados representan los pozos donde se colocaría la tinta china, los círculos tachados es donde irían las muestras, los círculos azules donde se pondrían muestras una vez volteado el dispositivo y los pozos en blanco son los que no se ocuparán.

3.5.3 Alimentación del Dispositivo

Una vez que se definió la cantidad de LEDs que conformarían el dispositivo se tuvo que realizar el circuito que lo alimentaría. A diferencia de los convencionales, el LED de 1W debe ser alimentado con una corriente constante de 350 mA o mayor, por lo que limitar la corriente por medio de una resistencia no es conveniente.

Tomando en consideración lo anterior se pensó en poner los LEDs en conexión en serie para que el voltaje se dividiera, pero la corriente se mantuviera igual para todos, y dado que estos diodos físicamente no son ideales y llegan a presentar variaciones en su funcionamiento fue necesario diseñar un Driver, o regulador de corriente, capaz de entregar más de 350 mA.

Se hizo uso de un software de simulación para realizar el diseño del driver y así tener mayor seguridad de que esté funcionaría al momento de realizarlo físicamente. Los componentes con los que se simuló el driver fueron un MOSFET IRF530, un transistor BC548, una resistencia de 47 K Ω y una de 2 Ω .

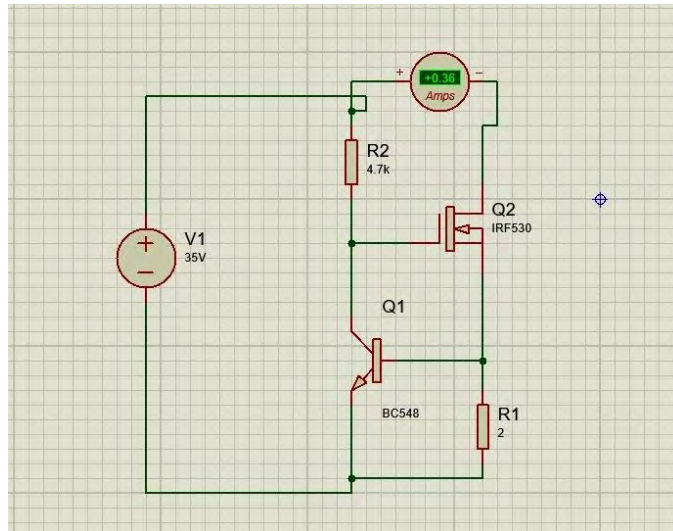


Figura 22 Simulación del driver para LEDs. [Imagen en colaboración con Luis Daniel Luna Hernández]

La simulación de este driver se muestra en la Figura 22, en la cual se puede apreciar la corriente que entrega el circuito, los LEDs encenderán cuando el gate del MOSFET recibe una tensión positiva a través de la resistencia de 47 K Ω , produciendo una caída de tensión en la resistencia de 2 Ω . Si la corriente aumenta, también aumenta la caída de tensión y si la tensión de umbral de la base del transistor es superada, este último, empieza a conducir disminuyendo la tensión del gate del MOSFET y reduciendo como consecuencia la corriente sobre los LEDs. Debido a que el voltaje se va a repartir entre los componentes del circuito, la simulación se realizó con una fuente de 35 V ya que solo los LEDs pueden llegar a consumir de 24 V a 31 V. De la misma manera se simuló el driver junto con los LEDs para asegurar que este lograra encenderlos sin ninguna complicación, lo que se puede ver en la Figura 23.

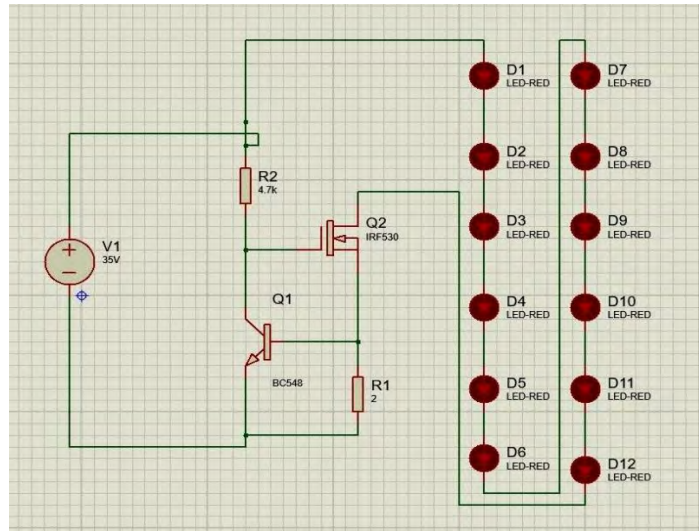


Figura 23 Simulación del driver con LEDs encendidos. [Imagen en colaboración con Luis Daniel Luna Hernández]

Una vez que se comprobó que el diseño del driver era suficiente para prender los LEDs, se pensó en diseñar una fuente de alimentación que nos otorgara los 35 V que se necesitaban para el driver, dado que se consideró que sería estorboso para los experimentos tener que manipular una fuente de poder variable regulada. Nuevamente con la ayuda del software de simulación se realizó esta fuente de alimentación, se ocupó un transformador de 26 VAC, un puente de diodos y dos capacitores electrolíticos de 4700uF-30V.

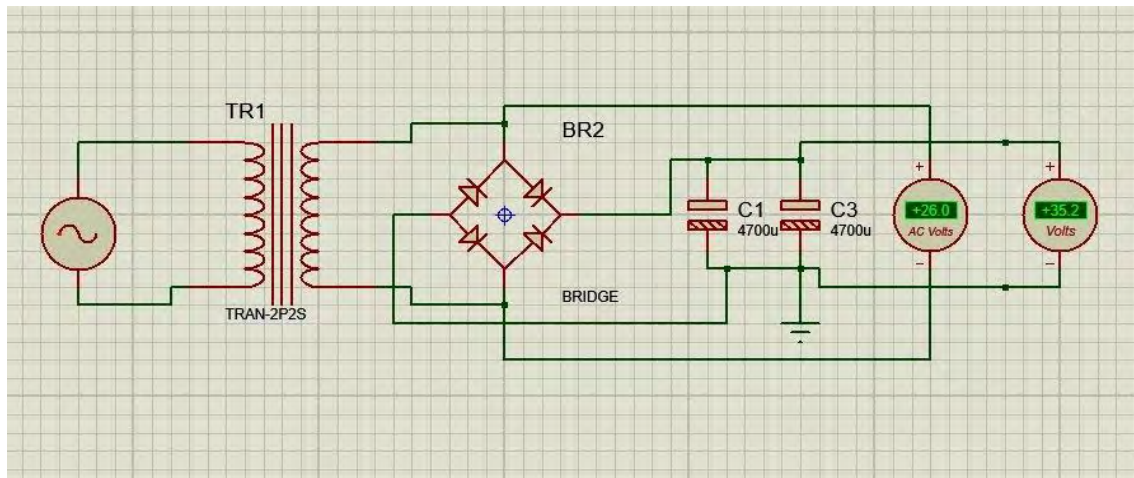


Figura 24 Simulación de fuente de alimentación. [Imagen en colaboración con Luis Daniel Luna Hernández]

La Figura 24 muestra la fuente de alimentación simulada, donde el alternador (primer componente de la izquierda) representa la Corriente Alterna (AC) que suministra la Comisión Federal de Electricidad en México que es de 127 V a 60

Hz, la cual al pasar por el transformador baja hasta 26 V aun como AC hasta que llega al puente de diodos que se encarga de rectificar la señal transformándola a Corriente Directa (DC) pero aun con variaciones de 0 a 26 V cada medio ciclo. Los capacitores son cargados filtrando la señal, disminuyendo las variaciones de voltaje hasta que se obtiene los 35 V deseados. La simulación del circuito completo se muestra en la Figura 25 el cual no presento ningún problema en encender los 12 LEDs.

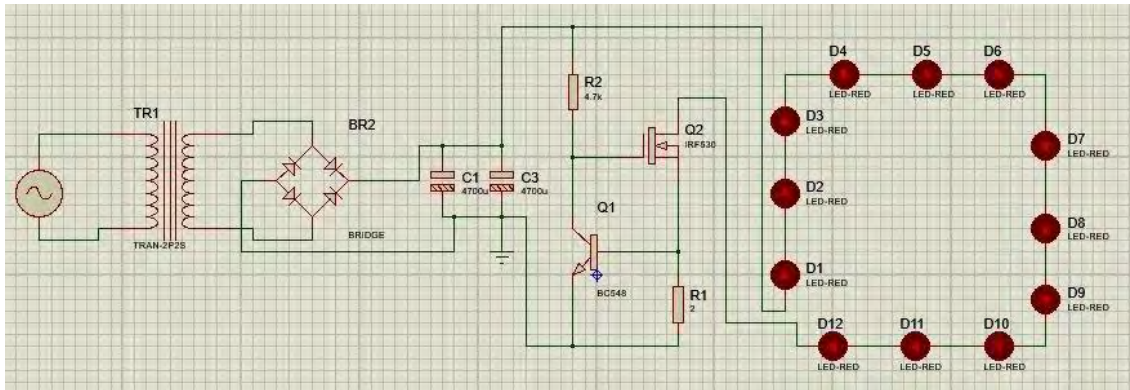


Figura 25 Simulación de circuito completo. [Imagen en colaboración con Luis Daniel Luna Hernández]

Después de la simulación se procedió a conseguir los componentes para poder armar el circuito. La fuente de alimentación y el driver se montaron sobre una placa fenólica perforada, se le añadió un disipador de calor al MOSFET dado que este consumiría una potencia que se perderá en forma de calor. Los LEDs se colocaron separados del resto del circuito sobre una placa de metal que funcionará como disipador de calor y ayudará a la manipulación de estos, esto se muestra en la Figura 26.



Figura 26 Placa de metal con LEDs. [Imagen en colaboración con Luis Daniel Luna Hernández]

Una vez que se tuvo el circuito armado, se procedió a medir la potencia luminosa nuevamente de los LEDs de la misma manera que la primera vez, los resultados arrojaron que está había disminuido a 25.1 mW lo que aun fue aceptable comparado con la potencia que entregaba el láser.

3.6 Primera Aplicación de la TFD con LED

Se decidió hacer una sesión de la TFD con el dispositivo LED como fuente de luz para verificar su funcionamiento en la terapia, se planificó hacer varias corridas con distintas dosis de luz a 2 y 3 radiaciones. Dos corridas con 20 J/cm² de dosis de luz a 2 y 3 radiaciones respectivamente, y otras dos corridas con 5 J/cm² de dosis de luz a 2 y 3 radiaciones igualmente. Se usaron 50 µl de solución de MB a la misma concentración de 40 µM con la que se hicieron las aplicaciones con láser, así como el mismo tiempo de incubación, el cual fue de 30 min para todas las corridas.

De la misma manera en que se realizaron las otras sesiones, se comenzó por el conteo de las esporas por ml de una placa con la cepa del hongo crecida, para poder diluirla y así realizar los tratamientos y controles.

Tratamientos: Haciendo uso de las pipetas se colocaron 50 µl de muestra y 50 µl de MB en un pozo de la microplaca por cada tratamiento. Fueron 8 tratamientos en total, 4 para la corrida de 2 radiaciones de las dos dosis de luz y otras 4 para la de 3 radiaciones de las mismas dos dosis de luz. Siguiendo el mismo procedimiento que se ha estado trabajando, una vez que las muestras estuvieron en contacto con el MB se incubaron 30 min antes de pasar a radiarla con la dosis de luz correspondiente. Después de la incubación se procedió a radiar los tratamientos, tomando el tiempo con un cronómetro y acoplado el dispositivo LED para que cubrieran correctamente los pozos de la microplaca, repitiendo este proceso de incubar-radiar hasta que se cumpliera las radiaciones necesarias para cada tratamiento. Una vez concluido con las radiaciones, con la ayuda de la pipeta se recogieron los 100 µl de cada pozo, inoculando en placas Petri con medio de cultivo las cuales se rotularon.

Controles de luz: Para estos controles, con ayuda de la pipeta se agregaron 50 µl de muestra y 50 µl de PBS para que se radiara un volumen igual a los tratamientos. Al no contener fotosensibilizador, estos controles no se tuvieron que incubar antes de la radiación. Realizando 2 controles para cada dosis de luz aplicándoles las mismas radiaciones que los tratamientos. Una vez concluido con las radiaciones y con la ayuda de la pipeta se recogieron los 100 µl de cada pozo, inoculándolos en placas Petri con medio de cultivo.

Control de MB: En esta sesión no se realizó este tipo de control.

Control de Hongo: Se realizó este control para tener un punto de comparación ya que este representará el total de UFC del hongo, por lo que no se radió y no se le agregó solución de MB. Se inoculan en una placa con medio 50 μ l de muestra y 50 μ l de PBS, esto para que sea el mismo volumen entre tratamientos y controles. Se inoculó en una placa Petri con medio de cultivo.

Al igual que las aplicaciones anteriores después de 3 días de incubación se hizo un conteo de UFC a las placas Petri puestas a incubar, esto se realizó poniendo las placas a contra luz contando y marcando las esporas germinadas del hongo, las cuales tienen forma de un asterisco de color blanco. Después se les tomo foto a las placas para realzar una imagen comparativa entre ellas.

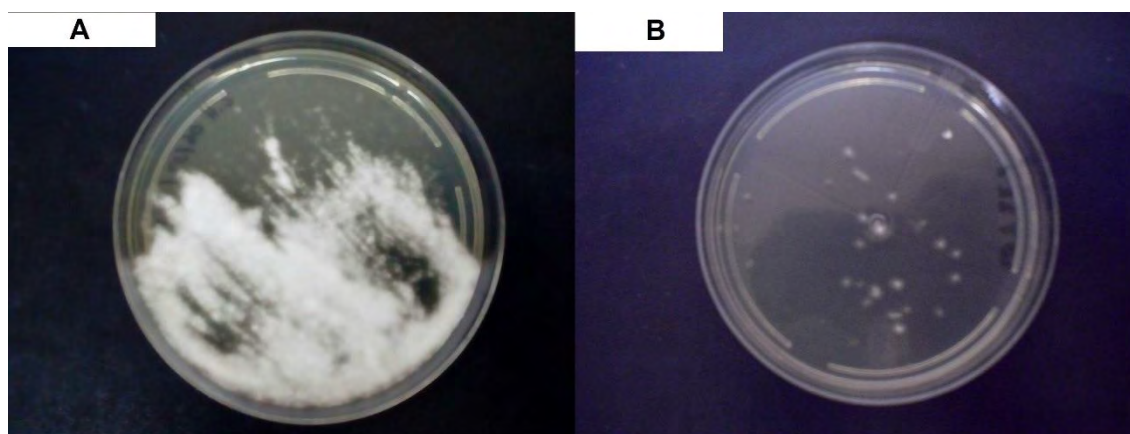


Figura 27 A) Control Hongo. B) Tratamiento 20 J/cm² con MB a 40 μ M con 2 radiaciones.

En la Figura 27 parte A se muestra la placa de control de hongo que representan el total de crecimiento de colonias y en la parte B el tratamiento más eficiente con respecto a los otros en esta sesión, el cual fue la dosis de luz de 20 J/cm² con MB a 40 μ M con 2 radiaciones, como se muestra, esta placa contiene pocas UFC creciendo a comparación del control de hongo.

Capítulo 4: Discusión Y Resultados

En el capítulo anterior se hacía mención al tratamiento que mostraba un mejor efecto anti fúngico en cada una de las aplicaciones de la TFD, esta era determinada por el conteo de UFC que realizaba a las diferentes corridas en cada una de las sesiones. Como ya se ha mencionado el conteo de UFC se realizó después de 3 a 5 días de la aplicación de la TFD y se les tomó una foto a las placas para hacer una imagen comparativa entre ellas.

4.1 Resultados de la Primera Aplicación con Láser

Los resultados que arrojó la primera aplicación de la TFD fueron de mucha ayuda ya que así se dio la pauta de saber con qué dosis de luz se seguirían trabajando, los cuales fueron los siguientes:

Tabla 2 Conteo de UFC de la primera aplicación.

Conteo de UFC (Op 2)								
Dosis de Luz	20 J/cm ²		10 J/cm ²		5 J/cm ²		3 J/cm ²	
Repeticiones	1	2	1	2	1	2	1	2
Control de Luz	77		51		44		34	
	59		58		43		32	
TFD	91	1	49	9	14	5	16	5
	41	9	51	11	52	11	4	8
Control MB	176							
	187							
Control de Hongo	220							
	192							

En la Tabla 2 se puede apreciar que el tratamiento de 20 J/cm² presenta un conteo de UFC menor a comparación de los demás tratamientos cuando se aplican dos radiaciones a la misma muestra. Otro tratamiento con el que se tiene una inhibición de crecimiento considerable es la de 3 J/cm² aplicando igual dos radiaciones. En las siguientes imágenes se muestra la comparación de las distintas placas Petri donde se puede apreciar el efecto que tuvo la TFD sobre los tratamientos y controles.

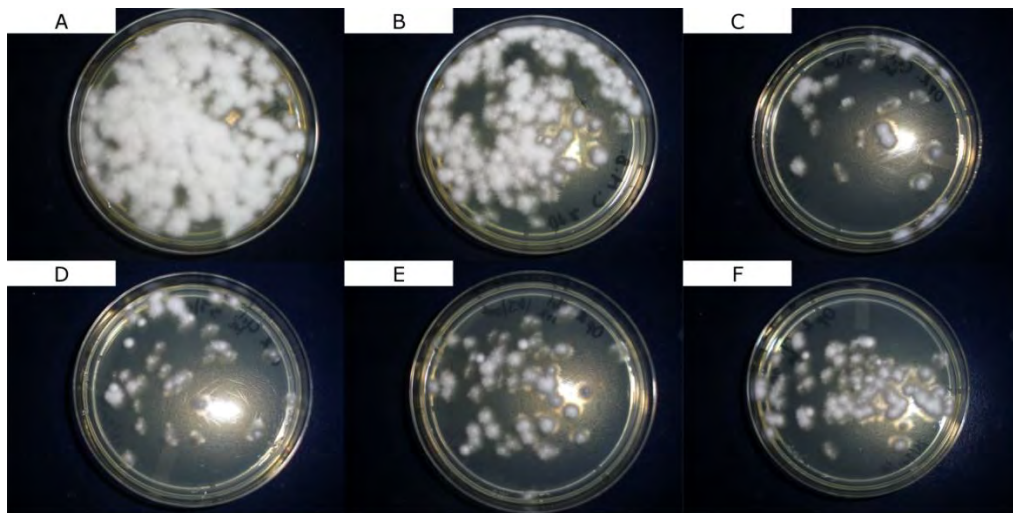


Figura 28 Colonias de Controles. A) Op2 sin tratamiento de TFD. B) Control de Hongo con MB 40 μ M, C) Control de Luz a 2 J/cm². D) Control de Luz a 5 J/cm². E) Control de Luz a 10 J/cm². F) Control de Luz a 20 J/cm².

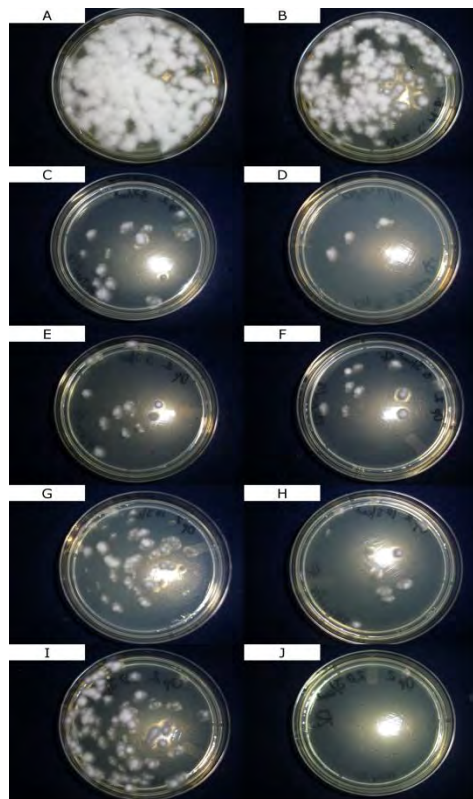


Figura 29 Colonias de Terapias con MB 40 μ M. A) Op2 sin tratamiento de TFD. B) Control MB. C) Tratamiento a 2 J/cm² con 1 radiación. D) Tratamiento a 2 J/cm² con 2 radiaciones. E) Tratamiento a 5 J/cm² con 1 radiación. F) Tratamiento a 5 J/cm² con 2 radiaciones. G) Tratamiento a 10 J/cm² con 1 radiación. H) Tratamiento a 10 J/cm² con 2 radiaciones. I) Tratamiento a 20 J/cm² con 1 radiación. J) Tratamiento a 20 J/cm² con 2 radiaciones.

radiaciones. I) Tratamiento a 20 J/cm² con 1 radiación. J) Tratamiento a 20 J/cm² con 2 radiaciones.

En la Figura 28 se muestran las comparaciones de las UFC de cada uno de los controles de luz que se realizaron en esta aplicación de la TFD con láser. Mientras que en la Figura 29 se muestran las comparaciones de las UFC de la primera aplicación de TFD con láser, donde se puede observar que los tratamientos con 2 radiaciones presentan menos UFC a de los que solo se les radió una sola vez.

4.2 Resultados Segunda Aplicación con Laser

Se esperaba que los resultados de esta aplicación fueran similares a los de la primera, al igual que se comprobaba si el tiempo de incubación influía de manera positiva a la terapia por lo que se realizó la corrida con 60 min de incubación entre radiaciones. El conteo de colonias que se realizó a las placas dio lo siguiente:

Tabla 3 Conteo de Colonias de la segunda aplicación.

Conteo de Colonias (Op 2)												
Dosis de luz Incubación	20 J/cm ² 30 min			20 J/cm ² 60 min			5 J/cm ² 30 min			5 J/cm ² 60 min		
Repeticiones	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Control de Luz		202	215		456			594	251		556	
		353	282		460			572	277		446	
TFD		1	0		180			364	174		654	
		2	4		296			360	78		356	
Control MB	458											
	268											
Control Hongo	626											
	1162											

En esta aplicación la cantidad de colonias que hay en el Control de Hongo el cual representa el total del crecimiento, es mayor que la primera aplicación como se muestra en la Tabla 3, esto nos permite ver que el tratamiento con dosis de luz de 20 J/cm² con MB a 40 µM sigue alcanzando una mayor de inhibición de crecimiento con 2 radiaciones con 30 min de incubación en comparación a los otros tratamientos. Así mismo el tratamiento con 3 radiaciones mostró un bajo conteo de UFC similar al de 2 radiaciones, pero no presenta una ventaja

considerable. Por el contrario el tratamiento con dosis de luz de 5 J/cm^2 disminuyó la cantidad de UFC comparado con el de la primera aplicación.

Con respecto al incremento del tiempo de incubación no se mostró ninguna ventaja en esta sesión. En las siguientes imágenes se muestra esta comparación entre controles de luz y tratamientos:

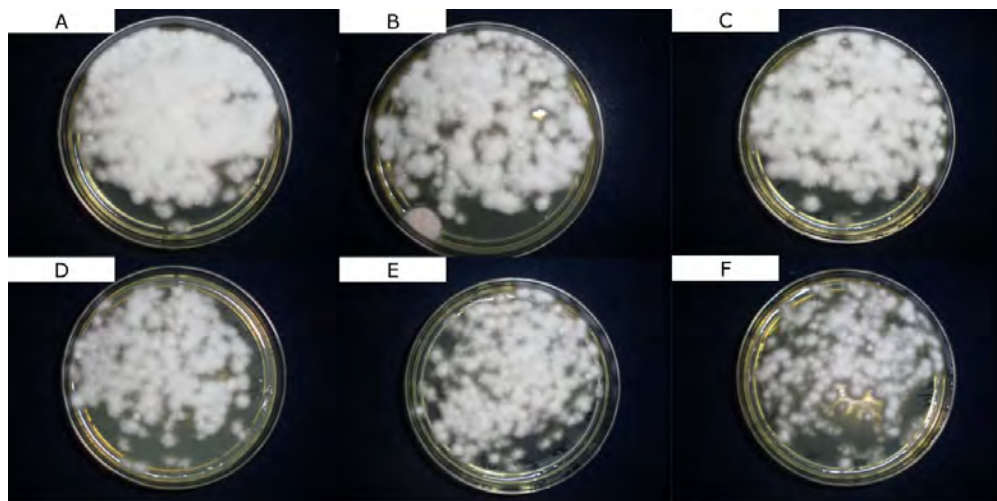


Figura 30 Colonias de Controles, 30 min de incubación. A) Op2 sin tratamiento de TFD. B) Control MB. C) Control de Luz a 3 J/cm^2 con 2 radiaciones. D) Control de Luz a 3 J/cm^2 con 3 radiaciones. E) Control de Luz a 20 J/cm^2 con 2 radiaciones. F) Control de Luz a 20 J/cm^2 con 3 radiaciones.

En la Figura 30 se muestran las comparaciones de las UFC en los controles de luz, que fueron puestos a incubar por 30 min, de la segunda aplicación de la TFD con láser.

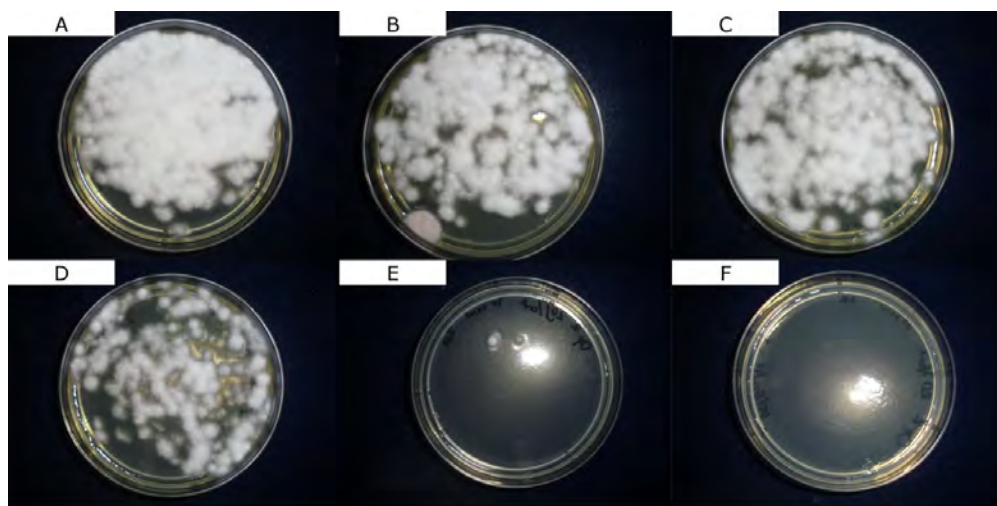


Figura 31 Colonias de Tratamientos con MB $40\mu\text{M}$ y 30 min de incubación. A) Op2 sin tratamiento de TFD. B) Control MB. C) Tratamiento a 2 J/cm^2 con 2 radiaciones. D) Tratamiento a 2 J/cm^2 con 3 radiaciones. E) Tratamiento a 20 J/cm^2 con 2 radiaciones. F) Tratamiento a 20 J/cm^2 con 3 radiaciones.

Tratamiento a 2 J/cm^2 con 3 radiaciones. E) Tratamiento a 20 J/cm^2 con 2 radiaciones. F) Tratamiento a 20 J/cm^2 con 3 radiaciones.

En la Figura 31 se muestran las comparaciones de las UFC de los tratamientos puestos a incubar por 30 min, de la segunda aplicación de la TFD con láser. Se puede observar que entre 2 y 3 radiaciones no existe una gran ventaja, como ya se comentó.

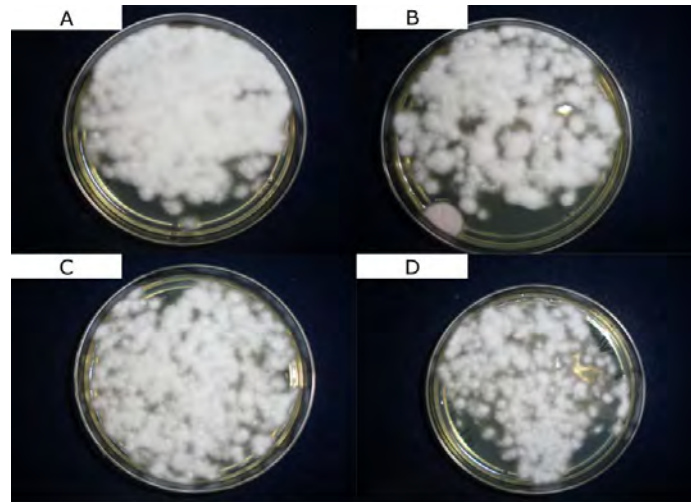


Figura 32 Colonias de Controles, 60 min en incubación. A) Op2 sin tratamiento de TFD. B) Control MB. C) Control de Luz a 3 J/cm^2 con 2 radiaciones. D) Control de Luz a 20 J/cm^2 con 2 radiaciones.

En la Figura 32 se muestran las comparaciones de las UFC en los controles de luz, que fueron puestos a incubar por 60 min, de la segunda aplicación de la TFD con láser.

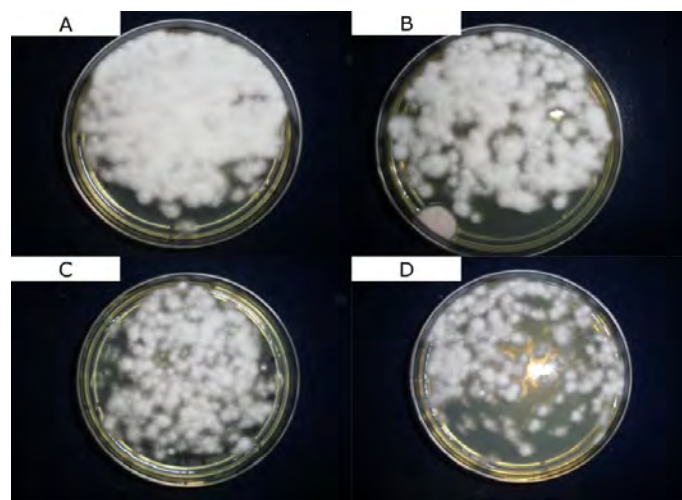


Figura 33 Colonias de Tratamientos con MB $40 \mu\text{M}$ a 60 min en incubación. A) Op2 sin tratamiento de TFD. B) Control MB. C) Tratamiento a 3 J/cm^2 con 2 radiaciones. D) Tratamiento a 20 J/cm^2 con 2 radiaciones.

En la Figura 33 se muestran las comparaciones de las UFC de los tratamientos puestos a incubar por 60 min, de la segunda aplicación de la TFD con láser. Aumentar el tiempo de incubación no mostró una mejora en la terapia, al menos en este caso en particular.

4.3 Resultados de la Tercera Aplicación con Láser

Como ya se mencionó en el capítulo anterior en el de esta aplicación, se quiso verificar si una dosis de luz de 10 J/cm² con repetición de radiaciones podía llegar a tener un efecto similar al que presentan los tratamientos de 20 J/cm² con menor número de radiaciones. El conteo de colonias que se realizó a las placas dio lo siguiente:

Tabla 4 Conteo de UFC de la tercera aplicación.

Conteo de UFC (Op 2)						
Dosis de luz Incubación	10 J/cm ² 30 min			10 J/cm ² 60 min		
Repeticiones	1	2	3	1	2	3
Control de Luz		205	160		306	
		217	173		285	
TFD		26	0		32	
		37	2		22	
Control MB	296					
	287					
Control Hongo	175					
	189					

Como se aprecia en la Tabla 4, en esta sesión de la aplicación de la TFD a 10 J/cm² con 3 radiaciones, tiene un efecto similar al que presenta la de los tratamientos a 20 J/cm² con 2 radiaciones, siendo esto una posible ventaja a considerar ya que menor tiempo de radiación comprende un menor consumo de energía y no solo eso, se busca realizar la TFD con el mínimo requerimiento tanto de fotosensibilizador como de dosis de luz, pensando en ser lo menos invasivo posibles para futuras aplicaciones en pacientes. Así mismo los tratamientos con 60 min de incubación no presentaron una ventaja significativa con esta dosis de luz, lo mismo que paso en la anterior sesión, por lo que se consideró no volver a realizar otra sesión aumentando el tiempo de incubación.

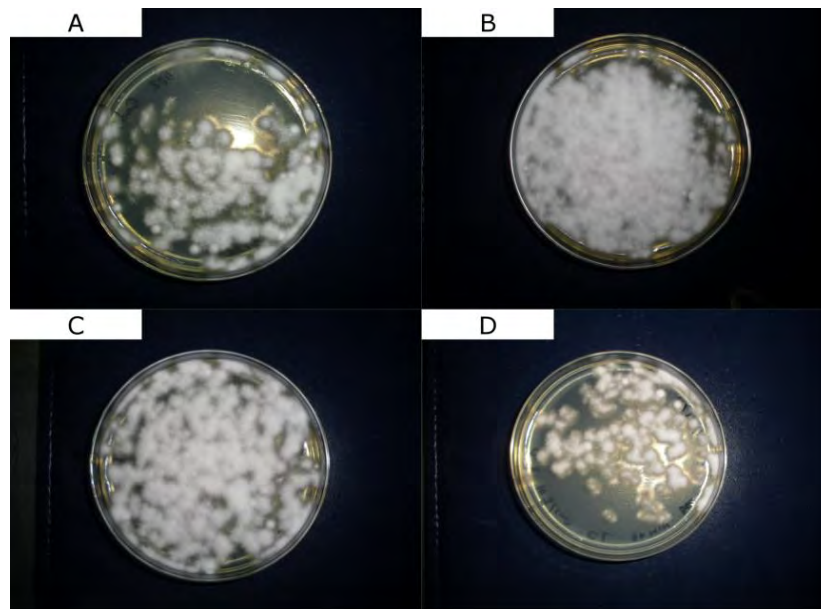


Figura 34 Colonias de Controles a 30 min de incubación. A) Op2 sin tratamiento de TFD. B) Control MB. C) Control de Luz a 10 J/cm^2 con 2 radiaciones. D) Control de Luz a 10 J/cm^2 con 3 radiaciones.

En la Figura 34 se observan las comparaciones de las UFC en los controles de luz, que fueron puestos a incubar por 30 min, de la tercera aplicación de la TFD con láser.

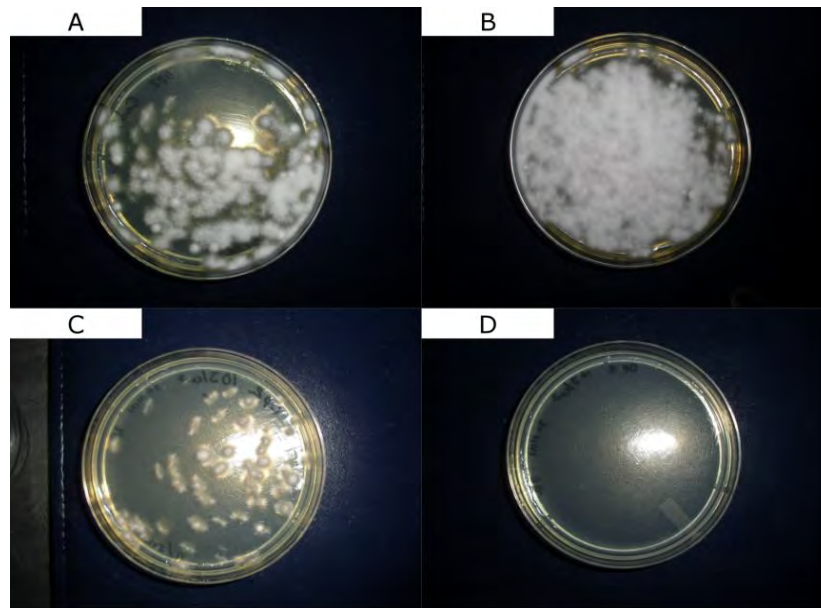


Figura 35 Colonias de Tratamiento con MB $40 \mu\text{M}$ a 30 min de incubación. A) Op2 sin tratamiento de TFD. B) Control MB. C) Tratamiento a 10 J/cm^2 con 2 radiaciones. D) Tratamiento a 10 J/cm^2 con 3 radiaciones.

En la Figura 35 se muestran las comparaciones de las UFC de los tratamientos puestos a incubar por 30 min, de la tercera aplicación de la TFD con láser. Como se puede observar el tratamiento de 10 J/cm² con 3 radiaciones no muestra ninguna UFC.

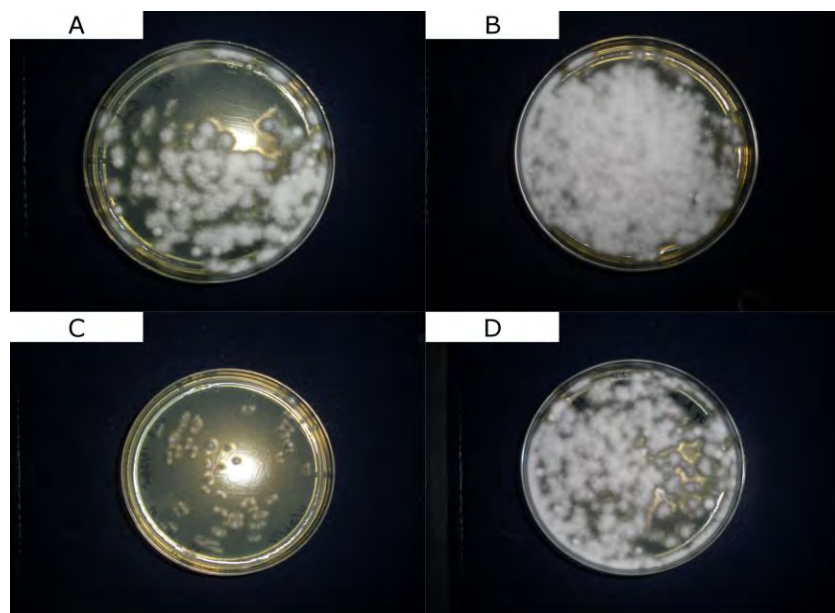


Figura 36 Colonias de Control y Tratamiento con MB 40 μ M a 60 min de incubación. A) Op2 sin tratamiento de TFD. B) Control MB. C) Tratamiento a 10 J/cm² con 2 radiaciones. D) Control de luz a 10 J/cm² con 2 radiaciones.

Se muestra en la Figura 36 la comparación entre las UFC existentes de los controles de luz y los tratamientos con 60 min de incubación. No se mostró ningún beneficio en aumentar el tiempo de incubación.

4.4 Resultados Primera Aplicación con LED

Una vez que se realizó el conteo de colonias de la primera aplicación de la TFD con el dispositivo LED como fuente de luz, los resultados que se esperaban obtener tenían que ser similares a los de la primera y segunda sesión, esto para que se asegurara que el cambio de fuente de luz fuese posible. El conteo arrojó lo siguiente:

Conteo de Colonias (Op 2)				
Dosis de luz	20 J/cm ²		5 J/cm ²	
Repeticiones	2	3	2	3
Control de Luz	1900	1428	1500	836
TFD	11	49	1046	14
Control de Hongo	2196			

En esta sesión igual se contó con una cantidad grande de colonias en el Control de Hongo para representar el total del crecimiento de este, lo que permite ver con claridad el efecto antifúngico de la terapia con estas dos dosis de luz. Los tratamientos a 20 J/cm² con 2 y 3 repeticiones llegan a alcanzar el 99% de inhibición de crecimiento de las colonias asemejándose a los tratamientos realizados con láser, así mismo los tratamientos a 5 J/cm². Las imágenes comparativas entre los controles y los tratamientos son las siguientes:

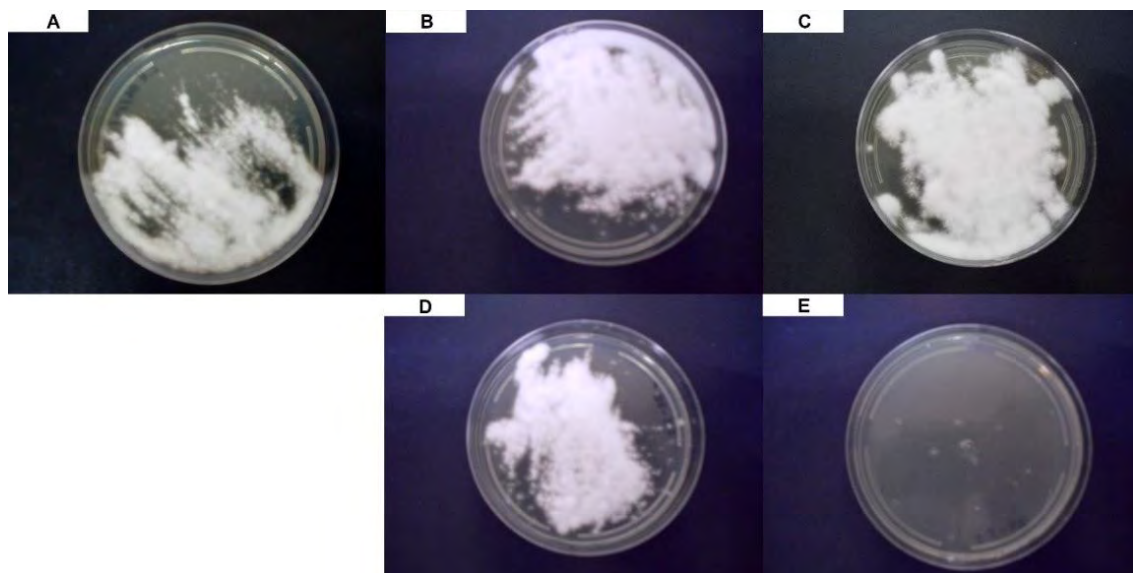


Figura 37 Colonias de controles y tratamientos con MB 40µM. A) Op2 sin tratamiento de TFD. B) Control de Luz a 5 J/cm² con 2 radiaciones. C) Control de Luz a 5 J/cm² con 3 radiaciones. D) Tratamiento a 5 J/cm² con 2 radiaciones. E) Tratamiento a 5 J/cm² con 3 radiaciones.

En la Figura 37 se muestran las comparaciones de las UFC de la primera aplicación de TFD con LED, tanto de control de luz y de tratamiento de 5 J/cm² en donde se puede apreciar que el tratamiento con 3 radiaciones fue el que presentó menor UFC.

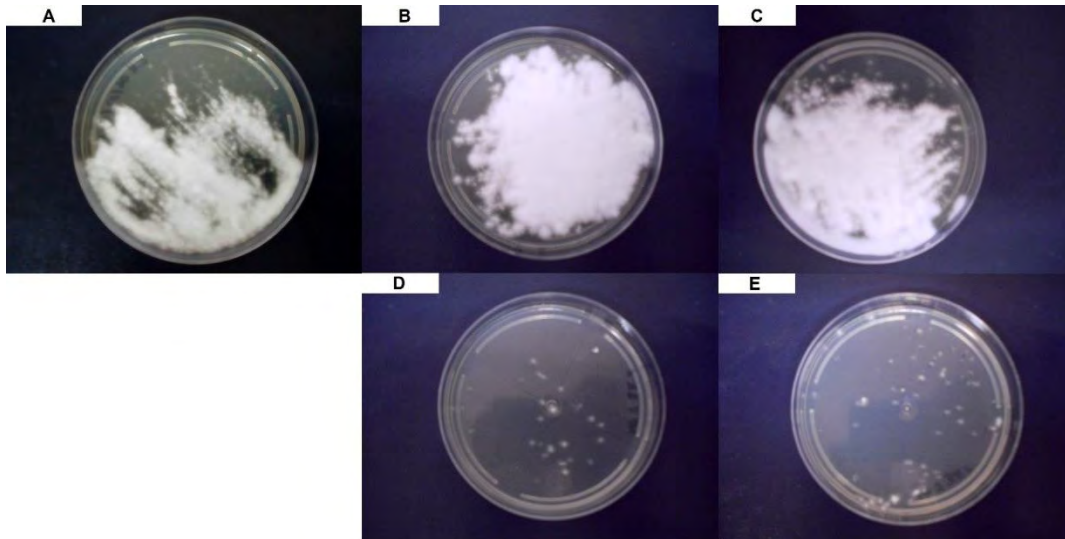


Figura 38 Colonias de controles y tratamientos a 20 J/cm². A) Op2 sin Tratamiento de TFD. B) Control de Luz a 20 J/cm² con 2 radiaciones. C) Control de Luz a 20 J/cm² con 3 radiaciones. D) Tratamiento a 20 J/cm² con 2 radiaciones. E) Tratamiento a 20 J/cm² con 3 radiaciones.

Se pueden observar en la Figura 38 las comparaciones de las UFC de la primera aplicación de TFD con LED, tanto de control de luz y de tratamiento de 20 J/cm² en donde se aprecia que con 2 radiaciones se alcanza una cantidad baja de UFC similar al que se alcanza con 3 radiaciones.

Capítulo 5: Conclusiones

A lo largo de la presente investigación sobre el diseño de un dispositivo LED para la aplicación de la terapia fotodinámica en la cepa de hongo *T. Mentagrophytes* con una metodología de optimización, se ha llegado a lo siguiente:

- La menor cantidad de UFC que se contó fue radiando las muestras 2 veces con una dosis de luz de 20 J/cm^2 y usando una solución de azul de metileno (MB) a $40 \mu\text{M}$ como fotosensibilizador.
- El cambio de fuente de luz láser por una de luz LED no afecta de manera negativa a la TFD, dando por entendido que no es necesario que la luz sea coherente, mientras su longitud de onda no varié mucho ($\pm 5 \text{ nm}$) para que esta pueda formar Oxígenos Reactivos (ROS) con el fotosensibilizador.
- El uso de LEDs de alta potencia disminuye el tiempo de exposición de la superficie radiada al tener una potencia luminosa mayor, en comparación del Láser He-Ne con el que se contaba. Así mismo aumento el número de muestras que se podían radiar al mismo tiempo, pasando de una con el láser a 12 con el dispositivo LED.
- Las principales ventajas de utilizar el dispositivo LED para la aplicación de la TFD en lugar de un láser fueron: su bajo costo, su portabilidad y su manipulación.

Glosario

Aerobio: es aquel que se utiliza para caracterizar a todos los eventos, fenómenos o elementos que se vinculan con el aire.

Agua Destilada: Es aquella a la que se le han eliminado las impurezas e iones mediante destilación.

Apoptosis: Es una vía de destrucción o muerte celular programada o provocada por el mismo organismo, con el fin de controlar su desarrollo y crecimiento.

Asa: Es un instrumento de laboratorio que consta de una base que puede estar hecha de platino, acero, aluminio y un filamento que puede ser de nicromo, tungsteno o platino que termina o en un arito de 5 mm o en punta.

Autoclave: Aparato para esterilizar por vapor que consiste en un recipiente cilíndrico, de paredes resistentes; metálico, y con cierre hermético.

Azul de Metileno: Compuesto químico heterocíclico aromático.

Cámara de Neubauer: Es un instrumento utilizado en medicina y biología para realizar el recuento de esporas y células en un medio líquido, que puede ser; un cultivo celular, sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, etc.

Cepa: Conjunto de organismos de la misma especie, colonia o cultivo, que tienen las mismas propiedades.

Colonias: Término utilizado ampliamente como un grupo de seres vivos organizados bajo bases cooperativas.

Diodo Láser: Es un dispositivo semiconductor similar al led pero que bajo las condiciones adecuadas emite luz láser.

Esporas: en biología designa un cuerpo microscópico unicelular o pluricelular que se forma con fines de dispersión y supervivencia por largo tiempo en condiciones adversas.

Fotosensibilizador: Agente que tiene una respuesta exagerada a la luz. Este reacciona de manera distinta con diferentes longitudes de onda.

Fúngico.- Del hongo o relacionado con él.

Hongos Dermatofitos: Son hongos filamentosos que afectan a la epidermis y anejos cutáneos. La principal característica de ellos es que invaden las capas superficiales queratinizadas de la piel, pelos y uñas.

Irrradiación.- Emisión de radiaciones luminosas, térmicas, magnéticas o de otro tipo.

Laser.- Del inglés light amplification by stimulated emission of radiation, amplificación de luz por emisión estimulada de radiación.

LED: Un led (del acrónimo inglés LED, light-emitting diode: 'diodo emisor de luz') es un componente opto-electrónico pasivo y, más concretamente, un diodo que emite luz.

Medio de Cultivo: Un medio de cultivo es una técnica de laboratorio que consta de un gel o una solución que contiene los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, microorganismos, células, tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas.

Necrosis: Es el patrón morfológico de la muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido en un organismo vivo, provocada por un agente nocivo que causa una lesión tan grave que no se puede reparar o curar.

Organelos: Diferentes estructuras contenidas en el citoplasma de las células, principalmente las eucariotas, que tienen una forma determinada.

PH: Coeficiente que indica el grado de acidez o basicidad de una solución acuosa.

Pipeta: Tubo de vidrio, generalmente graduado y más ancho por la parte central, usado en los laboratorios para transvasar pequeñas porciones de líquido

Solución PBS: Es una solución tampón o buffer empleada en la investigación biológica, bioquímica y de inmunología diagnóstica. Es una solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio.

Bibliografía

- Alexandro, B. (2000). *Micología Médica Básica*. México: Méndez-editores.
- Alonso Fernandez, B., Borrego Varillas, R., Hernandez Garcia, C., Perez Hernandez, J., & Romero Vázquez, C. (2010). *El Láser, la luz de nuestros tiempos*. Lluçmajor: Globalia.
- Aránguiz, P., Contreras, A., Troncoso, R., Marambio, P., Toro, B., Sanhueza, C., . . . Lavandero, S. (2006). Autofagia del cardiomiocito: ¿Un nuevo mecanismo de adaptación al estrés o de muerte celular? *Revista Chilena de Cardiología*, 331.
- ARBOLEDA, A., & et. al. (2014). Assessment of Rose Bengal Versus Riboflavin Photodynamic Therapy for Inhibition of Fungal Keratitis Isolates. *American journal of ophthalmology*, 64-70.
- Becton, Dickinson and Company. (Octubre de 2015). *BBL Sabouraud Dextrose Agar with Chloramphenicol*. Recuperado el 28 de Noviembre de 2016, de <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22894>
- Cabrales Gómez, R. C. (2004). Luminiscencia en polímeros semiconductores. *Ingenierías*, 7(23), 12-26.
- Choi, M. J. (2012). Antifungal effects of a 1444-nm neodymium:Yttrium–aluminum–garnet laser on onychomycosis: a pilot study. *Journal of Dermatological Treatment*, 1-4.
- da Silva, A. P., & et. al. (2015). Development and comparison of two devices for treatment of onychomycosis by photodynamic therapy. *Jurnal of biomedical optics*, 20(6).
- De Toro, G. (2006). Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. *VIII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica*, (págs. 1-6). Tecomu, Chile.
- Doménech, A., & García Valdés, E. (s.f.). *Universitat de les Illes Balears*. Recuperado el 28 de Noviembre de 2016, de <http://www.uib.cat/depart/dba/microbiologia/seminarios/1%20Medios%20de%20cultivo.pdf>
- Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D., Korbelik, M., . . . Peng, Q. (1998). Photodynamic Therapy. *Journal of the National Cancer Institute*.
- Espinosa Taxis, A. P., Vázquez Cruz, C., Sánchez Alonso, M., Pérez Munive, M., & Larriba Calle, G. (2015). *Temas Selectos de Microbiología Médica y Molecular*. Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Gonzales Arias, A. (2008). ¿Qué es la luz? *Latin-American Journal of Physics Education*, 2(1), 10.

- GREANPEACE. (2008). LED: Diodos Emisores de Luz Información de la Tecnología. *Iluminación Eficiente: primer paso hacia una [r]evolución energética*, 2-3.
- Hecht, E. (2000). *Óptica*. Madrid: Addison Wesley Iberoamericana.
- Herrero Martín, G. (Octubre de 2008). Mecanismos Moleculares de Inducción de Autofagia por TRAIL en Celulas Epiteliales de Mama y su Relacion con Apoptosis y Transformación Oncogénica. *Tesis Doctoral*. Granada, España: Editorial de la Universidad de Granada.
- Jordán, J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM*, 100.
- Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2013). *Robbins. Patología humana*. Barcelona: Elsevier.
- Laserlab Europe. (2015). *Learn about Lasers*. Recuperado el 7 de Abril de 2017, de sitio web de Laserlab Europe: <https://www.laserlab-europe.eu/events-1/light2015/light-links/learn-about-lasers>
- Lizarbe Iracheta, M. A. (2007). EL SUICIDIO Y LA MUERTE CELULAR. *VIII Programa de Promoción de la Cultura Científica y Tecnológica*, 2-3.
- Lopez Chicón, P., Gulías, Ó., 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, 765-770.
- Manzano-Gayosso, P. (2015). Unidad de Micología. *Departamento de Microbiología y Parasitología, UNAM*.
- Molpeceres Criado, J. L. (2010). *Fundamentos Fisicos Documentacion*. Recuperado el 13 de Abril de 2017, de Fundamentos Fisicos de la Tecnologia Laser: http://geiic.com/files/aplicacionlaser/fundamentos_fisicos_tecn_laser.pdf
- Moreno Arias, G. A., Eng Luna, A., Alvarado Delgadillo, A., & Camps-Fresneda, A. (2007). Terapia fotodinámica. *Med Cutan Iber Lat Am*, 35(6), 255-268.
- Pereira Lyon, J., Moreira, L. M., Moraes, P. C., Santos, F. V., & Resende, M. A. (2011). Photodynamic therapy for pathogenic fungi. *mycoses*, 265-271.
- Redmound, R. W., & Gamlin, J. N. (1999). A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochemistry and Photobiology*, 70, 391-475.
- Rodríguez Martín, J. M. (2001). Dosificación en Electroterapia. *Fisioterapia en el primer nivel asistencial: atencion a la mujer*, 2-11.
- Spezia-Mazzocco, T. (2016). In vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy with methylene blue in two different genera of dermatophyte fungi. *ReserchGate*.
- Stanley Electric Co., Ltd. (2008). *Basic Structure of LEDs*. Yokohama.

- Teijo, M. J. (14 de Agosto de 2012). *Mecanismos de muerte y supervivencia celular por terapia fotodinámica basada en ácido 5-aminolevúlico*. Obtenido de Biblioteca Digital FCEN_UBA: http://digital.bl.fcen.uba.ar/gsd1-282/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=tesis&d=Tesis_5324_Teijo
- Torres Hurtado, S. A. (mayo de 2011). *CLASIFICACIÓN DE LOS LÁSERES*. Recuperado el 13 de Abril de 2017, de sitio web de INAOE: http://www-optica.inaoep.mx/investigadores/carlost/pdfs/Susana_Alejandra_Torres_Hurtado.pdf
- Uri Flores, A. G. (2014). LESION Y MUERTE CELULAR. *Revista de Actualización Clínica*, 43, 2271.
- Yurkanis Bruice, P. (2008). *Química Orgánica*. México: Pearson Educación.