



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



**“USO DE PLASMA FRÍO EN EL DISEÑO DE DISPOSITIVOS PARA LA
ESTERILIZACIÓN DE SUPERFICIES SIN ALTERAR SUS CARACTERÍSTICAS
FÍSICAS Y/O QUÍMICAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN FARMACIA

PRESENTA:

David Durán Martínez

CO-DIRECTORES DE TESIS

Dr. Jesús Rivera Islas

Dr. Oscar Torres Ángeles

CUERNAVACA, MORELOS OCTUBRE 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA
SECRETARÍA DE DOCENCIA
JEFATURA DE LA LICENCIATURA

Fecha: 22 de octubre de 2021
Asunto: VOTOS APROBATORIOS
Medio de Notificación: Electrónica
Folio: FF/D/SD/JLF/0140/2021

**DRA. DULCE MARIA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES
U.A.E.M
PRESENTE**

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado el trabajo de tesis "Uso de plasma frío en el diseño de dispositivos para la esterilización de superficies sin alterar sus características físicas y/o químicas." presentada por la pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia. C. David Duran Martínez, (20131000407), consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro VOTO APROBATORIO.

Jurado	Firma
Dra. Blanca Estela Duque Montaño	_____
Dra. María del Rosario Espinoza Mellado	_____
Dr. Cesar Millán Pacheco	_____
Dra. Nallelyt Segundo Arizmendi	_____
Dra. Jazmín Flores Monroy	_____

**ATENTAMENTE
"POR UNA HUMANIDAD CULTA"**

M.P.D. Reyna América Serrano López
Secretaria de Docencia

Cp Archivo
Cp. BEDM



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

REYNA AMERICA SERRANO LOPEZ | Fecha:2021-10-25 14:52:33 | Firmante
zJ/suOjRXawBEmmQwZLexKulfo751a0znDYeZL365d+wJIS8E5fJA5dfaFJBGICL4f5Xis2eLgaNMeBRNwMJf47YapPHaXKMIAnBB86F7/2PgWssn2gE4LwXVmPmwVqUShCay/
Ei4qFqo7Tjjo3+Lm3XD7aawxfJly5HapBBmE5M4etoBhkOWDgW+o2e5gR4fpvqoQwYow+AvCheIV2ps/b+1C+r2n0c9MLZDniHRT+TZaoV/LbGv7stikU3KNtZ5T1DI2INzeiqd8JmV
73qq2uW4MAajptocUnH7Q+QwifDhKZhhFipXe8TinP44V/DU3LS01AXi89ZIDA--

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



V55i8Pdm0

<https://efirma.uaem.mx/hoRepubl0/zNyI/NoahsVQhgPHuDHuB8Lvr6c01Xy>

UA
EM



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRONICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

▲ Sello electrónico

BLANCA ESTELA DUQUE MONTAÑO | Fecha: 2021-10-26 13:40:28 | Firmante

n+hnpDuZzb311mh4qTmXcymvQF+prLB05Ho5cDjXieIC8i3R2RxCuu3FYNgwYVW55GYGJ+b6kHEOm9nOHe6SCvzKbZheLe2YFNXazVvHw5oq6+NnrWwWYq+YpB2sAouOZUdAif8X9H10NKLOiVRYITvvdvCzNqVWhdxZcmLdyVEjUGCA2uvT3BGv3wN1nR2o1nIYYAC6k4eEzkaXIEpQ6EXr1dJmwbYFV8DpIGDpRIIYKIRk9mU7ZOp2+TONDHeNigBR4eX+lebCvHCKF3jzDjuZocXl4fsiABWwhO05TbVMjuZhuVotSSNwNUSizB8liuYRud20rG64toA==

MARÍA DEL ROSARIO EBINOZA MELLADO | Fecha: 2021-10-28 08:28:12 | Firmante

NarydyYZCMfYf+2YHBCX6ed9kaIhP08NiyVsdYh7KUworWGFqJJ9uRgV1lohWMEWlglx4EZpJHn8W4T4WuFqT2b6yvB4NHpv8Ax3dITRI39Yn077zQdOHaAcrlCGibOmpxUz0Cb9VIXZb585J+hvcBhYBdLia11X62PCBt+DC89naAgoJKu4HQX+FP1b5ZEhSuA0pChZ6euBHPvxyT1dxW4dShkKAtaFad5zAng6JA3koAn7KB2W1v82o75Mbjp0S2gKp mTqs+mbAUBGYMxV8vGHd399vk1zDjYz7X/J2+ot5jb4Hcmvkk7hEK7pKIBNHBUk3lw==

JAZMÍN FLORES MONROY | Fecha: 2021-10-28 14:22:17 | Firmante

rzUjb9Q5pgzGm0LOCCA36jv+oDOLrFXFnHBJ7n1CB0x9AU7L2OHCiUixEKolzo7vtsOdx7yQY1GCVI9jdYHyrbVgKsQKqe2sLUIWuhUixNcfKCSoxY4FL8wFX89Up4RHhndxE nB41So6WIDJR+sewku60TLUVBFEX2vnPldQ8gQtdIXa7FVx5yZ5PSXFCw1G+qKkOF1PYnALQn0Hw1VpVFRV63V022fytzDEIYR42kkioHjaTpMM8oJYmWLNtXPQsq51ZsV ne8ysut+cnqP8mMllar7yCX6wPldXgrS743p0ZNOFiz0CEXnyhz+EBrhdkXJ5Xz066lw==

NALLELYT SEGUNDO ARIZMENDI | Fecha: 2021-10-27 14:32:57 | Firmante

lILEUoCxlUhnSv+wwKhcoppwbylQYLLSLj6cMCcdNMEkq7UMK6g2vKpsjg7gpcLUyoS3OZY4ZuGNtMLZp2IZ2ISokRHh4I9T20lvOzAgGILJZRTI+nRC+VH00HpbE0YP1e3GhXOR 3NTvzTvnQUZPjqtmcWQILwBcnLQooe02mwV4my1fCHraZr5jnzOKcRFoGMfwhOgC4Xdjfgsn17AIX0z70JHDxv2w1cig7E1uPPF3YZzB77gPHY771pgjMvJvrc7Znw3NKffanOexF h6qTE9oq0IkBxI4SDJCiNIRuyNRx+BWgikwIOGRu+zZdWVv+DE2V75a5+FIepl6DjA==

CESAR MILLAN PACHECO | Fecha: 2021-10-28 10:38:52 | Firmante

uOaC995vOyoOgmW8B5J1NF4L3INySj9ZQ2H1MYu2P9ynNUQpLWXINPs/ikuph6loWPKTKD/5bJKHQGp1cbvpKYJDT4aasmGul8VTGwT0Lgl3dmx+92s/K1Au7y3kXvdMhZ SbF7GGH74ZZv4GqjkaA9HEQJdtsrpsQEiCuyw3k8vh5ihqlmVkkdFyUKQO+X7Kkd3VplXmW6Q8KYSIEQK435JrFaA51jWUvTOuGDmG2gedMFyaP5QN86R+Z20YHU5dL Sericjer14G6H40C4Q7ykv1sIFM81GeBOWEU+v5z93bgj3LlxlgJ1sezhUQFgmgez03hq==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



oeXZgic1z

<https://efirma.uaem.mx/hoReputio/KLKBPC6v96DodKG6UMK8L0DF7KZCYSI>





Agradecimientos

A Yalilee Martínez Pérez, a pesar del tiempo que tardo alcanzar esta meta. Tú estuviste cada paso del camino siempre recordándome que “el que quiere azul celeste, que le cueste”. Ahora este trabajo lo comparto contigo como un logro mutuo.

A Alfonso Martínez García. Tú eres el motivo por el cual decidí ingresar a la carrera y este trabajo es la culminación de varios años de esfuerzo y dedicación continua. Deseo que este trabajo te llene tanto de júbilo como a mí.

A Alejandra Durán Martínez por su apoyo incondicional y toda su tolerancia para todos esos días en los que el trabajo sacaba a flote lo peor de mi carácter y su determinación a ayudarme a tranquilizarme y retomar el camino.

Le agradezco a Patricia Sumano Arellano todas las horas de trabajo conjunto, las incontables revisiones ortográficas y de formato. Por siempre estar para mí cuando lo necesito y ser una persona tan importante en mi vida.

Agradezco a Mtra. Angélica Arellano Franco por todos los ánimos y horas de plática. Que en su momento me ayudaron a mantener los pies sobre la tierra.

Al Dr. Oscar Torres Ángeles y Dr. Jesús Rivera Islas. Ustedes consideraron que el proyecto es un área fresca que puede dar paso a procesos de expansión dentro de nuestra facultad y área de estudio.

Al Dr. Cesar Millán Pacheco por dirigirme hacia los doctores que pudieran ayudarme a realizar este proyecto.

A Rosa María Durán Huerta y José Luis Durán Huerta por el apoyo brindado tanto económico como emocional para poder alcanzar esta meta.

A Felipe y Anahí Rodríguez, ustedes fueron mis primeros amigos y en muchos aspectos me han ayudado a crecer y realizarme como estudiante y persona. Gracias por estar para mí siempre que fue necesario.

Por ultimo a Alberto Cayeros, por siempre tener palabras de aliento y consejos para no perder el ánimo y continuar trabajando hasta lograr lo propuesto.



DEDICATORIAS

A mi madre, Yalilee Martínez Pérez

A mi tío, Salomón Pérez Ocampo

*A una de las personas que más quiero
en el mundo, Patricia Sumano Arellano*



ÍNDICE:	PÁGINA
1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción.....	3
3.1. Origen del plasma.....	3
3.2. ¿Cómo se genera el plasma?.....	5
3.3. Sistemas para generar plasma frío.....	7
3.3.1. Barrera de descarga dieléctrica (DBD) y por corona.....	8
3.3.2. Jets de plasma a presión atmosférica y descargas de microondas (APPJ).....	9
3.3.3. Nuevas fuentes de plasma para tratamiento de superficies de gran tamaño.....	12
3.4. Tipos de gases utilizados.....	13
3.5. Comportamiento de las especies cargadas.....	15
3.6. Aplicaciones actuales.....	18
3.7. Justificación de la revisión bibliográfica.....	19
4. Propósito de la revisión.....	21
5. Objetivos.....	21
5.1. Objetivo general.....	21
5.2. Objetivo particular.....	21
6. Metodología.....	21
7. Antecedentes.....	22
7.1. Estructuras promotoras de resistencia.....	23
7.2. Biofilms.....	26
7.3. Biocidas.....	27
7.4. Mecanismos de la acción antimicrobiana de los biocidas.....	29
7.5. Mecanismos antimicrobianos del plasma frío.....	34
8. Discusión.....	36
9. Conclusión.....	40
Bibliografía.....	41



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
1	Interacción dipolar. Adaptado de (Ghezzi, 2008)	5
2	Arreglos corona y barrera de descarga dieléctrica (DBD). (a) Corona con flujo; (b) Barreras dieléctricas sobre electrodos; (c) Arreglo DBD para tratamiento de sustratos planos de gran área; (d) Arreglo DBD para tratamiento bilateral; y (e) Arreglos DBD de cuadrícula múltiple (espacios de 200 μm x 200 μm). Las flechas en (c), (d) y (e) indican la dirección del sustrato en movimiento. Modificada de (Bardos, 2010)	9
3	Fuente de plasma por microonda o radio frecuencia (RF). (a) Arreglo de onda simple rectangular; (b) Arreglo de onda para un jet de plasma; (c) Arreglo DBD para un jet de plasma de RF coaxial; y (d) Fuente de plasma híbrida con antena de onda de superficie con función de cátodo hueco con pulso de DC. Las flechas más largas en (b), (c) y (d) indican la dirección del sustrato en movimiento. Modificada de (Bardos, 2010)	11
4	Plasma generado por una fuente H-HEAD, con flujo de aire de 300 cm^3/min a través de la antena, sumergida en un contenedor de aluminio con agua. Modificada de (Bardos, 2010)	12
5	Fuente de plasma a partir de un cátodo hueco fusionado (FHC). (a) Arreglo esquematizado de un sistema de cátodo hueco integrado por RF. (b) Fuente FHC abierta rectangular de 120-mm-de longitud, con plasma de Neón, generado con 40 W. Modificada de (Bardos, 2010)	13
6	Imagen del brillo de una descarga normal en Helio, Argón, Hidrógeno, Nitrógeno y Aire para un electrodo de espacio de 400 μm y una corriente de 3.0mA. Regiones de brillo negativo (NG), espacio oscuro de Faraday (FDS), columna positiva (PC) y brillo del ánodo (AG). Modificada de (Staack, 2008)	18
7	Elementos genéticos movilizados a través de transferencia de genes intracelular e intercelular horizontal célula donante y recipiente. (A) Unidad de transposón que alberga al gen de resistencia traspasándolo de un cromosoma bacteriano a un plásmido. (B) Unidades de transposones entre plásmidos en la misma célula bacteriana. (C) Auto exsición de un casete de genes de un plásmido por un sitio-específico de recombinación. El casete de genes puede moverse entre integrones (representación de la clase 1 In/Tn) a través de un intermediario circular. (D) Elemento conjugable e integrable (ICE) de DNA donador (reversible), en una estructura circular, la cual es capaz de auto-transmitirse por conjugación. En una célula recipiente, el ICE se integra al cromosoma recipiente por recombinación de sitio-específico. (E) Transmisión de plásmidos por conjugación o movilización por otro plásmido. Elementos genéticos móviles que contienen genes de resistencia (como la clase	25



	dentro del plásmido puede permanecer en el plásmido o transposón sobre en cromosoma donante). Modificado de (Partridge, 2018)	
8	Tipos de acción antimicrobiana de un biocida (Extraída de Araujo, 2011)	31
9	Prueba de susceptibilidad contra bacterias nosocomiales A. Clorhexidina B. Yodo y C. Etanol. (Extraída de Al-Talib, 2019)	33
10	Factores que influyen la efectividad de un plasma frío para descontaminar (Adaptado de Niedźwiedź, 2019)	35
11	Mecanismos de inactivación microbiana con especies reactivas de plasma. (Basado en Bourke et al., 2017; Adaptado de Niedźwiedź, 2019)	35



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Contenido	Página
1	Gases científicos de alta pureza. Modificada de (Indura, 2015)	16
2	Mecanismos de interacción de varios biocidas de acuerdo a su blanco celular y acciones antimicrobianas. (Adaptado de Araujo. 2011)	30
3	Zonas de inhibición bacteriana a partir del uso de diferentes concentraciones de antisépticos. (Adaptada de Al-Talib, 2019)	34



Abreviaturas

°C	Grados Celsius
µm	Micrometro
1/p ²	Uno entre presión al cuadrado
AG	Brillo del ánodo
APPJ	Jets de plasma a presión atmosférica
Ar	Argón
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albumina de suero bovino
Ca ²⁺ +DPA	Calcio 2 ⁺ y ácido picolínico
CAP	Plasma atmosférico frío
CCA	Compuestos Cuaternarios de Amonio
cm ³ /min	Centímetro cubico por minuto
CMI	Concentraciones mínimas inhibitorias
CO ₂	Dióxido de carbono
CP	Plasma frío
Da	Dalton
DBD	Barrera de descarga dieléctrica
DC	Corriente directa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
e	Electrón
ER	Retículo endoplasmático
eV	Electrón voltio
FDS	Espacio oscuro de Faraday
FHC	Cátodo fusionado hueco
GHz	Giga Hertz
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
He	Helio
Heliox	Helio mezclado con oxigeno
H-HEAD	Descarga activada por un electrodo hibrido hueco



ICCD	Dispositivos acoplados de carga intensificada
ICE	Elementos conjugables e integrables
IN	Integrón
K	Kelvin
kT	Unidad de calor requerida para aumentar la entropía termodinámica
mA	Mili amperio
MDA	Malondialdehído
MHz	Mega Hertz
mm	Milímetros
N ₂	Nitrógeno diatómico
NG	Brillo negativo
ns	Nano segundo
O ₂	Oxígeno diatómico
PC	Columna positiva
PE-LD	Polietileno de baja densidad
PET	Polietilentereftalato
pH	Potencial de Hidrógeno
PVDC	Poli cloruro de vinilideno
RF	Radio frecuencia
RNA	Ácido ribonucleico
s/cm ²	segundo por centímetro cuadrado
SEM	Microscopia electrónica de barrido
T	Temperatura
Te	Temperatura de electrón
Telex	Temperatura de excitación electrónica
TEM	Microscopia electrónica de transición
Trot	Temperatura rotacional
Ttrans	Temperatura traslacional
Tvib	Temperatura vibracional
UV	Ultravioleta



V
W/cm²

Voltio
Watts por centímetro cuadrado



1. Resumen

La resistencia de los microorganismos a los desinfectantes usados (hipoclorito de sodio, Yodopovidona, etc.), se ha incrementado de forma exponencial durante el último siglo lo cual se ha vuelto un problema más difícil de controlar para el área médica e industrial. Biológicamente se ha demostrado que los organismos al vivir en ambientes hostiles para su desarrollo tienden a adaptarse para poder garantizar su supervivencia, lo cual es concordante con la creciente resistencia que existe hacia las sustancias desinfectantes. Estudios muestran que para los microorganismos es más fácil adaptarse a un estímulo químico que a uno físico. Esto se debe principalmente a que una modificación estructural conlleva a un cambio morfológico y realizarlo toma mucho tiempo y es un riesgo para la especie debido a que este proceso necesitaría una adaptación a su nueva forma y sus funciones.

Estos procesos de adaptación tienen que ver con los estímulos físicos principalmente los de índole energética. Tomando en cuenta dicho estímulo, recientemente se ha iniciado una nueva revolución tecnológica para el desarrollo de desinfectantes que no son químicos. Estos sistemas abordan calor húmedo, radiación, electricidad, presión con calor y plasma.

El enfoque principal de este trabajo radica en este último. El plasma es el cuarto estado de la materia, esta sustancia es altamente energética y tiene la versatilidad de poder funcionar tanto en calor como en frío, vacío y atmósfera y otras tantas variables. El primer sistema de plasma caliente data de 1954, al utilizar un diodo de wolframio en conjunto con flujo de gas debido al arco voltaico de esta herramienta se generaba plasma que alcanzaba temperaturas de hasta 20,000 °C. Sin embargo, el interés de esta revisión no radica en el calor sino en el frío. A partir del interés en la versatilidad de estos sistemas múltiples avances se han realizado en este campo debido a que se evidenció que, si se utilizaba un gas noble en lugar de oxígeno o gases a base de carbono, era posible crear plasma sin radiación de cuerpos negros, lo cual permite poder utilizarlo sobre cualquier superficie sin dañarla o deformarla. El motivo por el cual sucede esto es debido a la cantidad de electrones que tiene un gas noble y que al no tener electrones desapareados, estos no permiten la excitación del núcleo del átomo del gas, generando así plasma frío.

Para este trabajo se realizó una revisión comparativa entre un desinfectante y el uso de plasma frío como posible sustituto a estas sustancias. Debido a que es necesario evidenciar



si el plasma frío puede competir contra un sistema de esterilización química por todas las ventajas que tendría su aplicación de forma industrial y/o médica.

Palabras Clave

Argón, plasma atmosférico frío, desinfección, esterilización, plasma, resistencia.

2. Abstract

The resistance of microorganisms to the disinfectant substances (sodium hypochlorite, povidone-iodine, etc.), has increased exponentially during the last century and has turned to a problem difficult to control for the medical and industrial area. Biologically, it has been shown that organisms living in hostile environments for their development tend to adapt in order to guarantee their survival, which is consistent with the increasing resistance that exists towards disinfectant substances. Studies show that microorganisms are easier to adapt to a chemical stimulus than to a physical one. This is mainly due to the fact that a structural modification leads to a morphological change and to carry it out takes longer and is a risk for the species because this process would require an adaptation to its new shape and functions.

These adaptation processes have to do with physical stimuli, mainly those of an energetic nature. Taking this stimulus into account, a new technological revolution has recently begun for the development of non-chemical disinfectants. These systems deal with moist heat, radiation, electricity, pressure with heat, and plasma.

The main focus of this work lies on this last topic. Plasma is the fourth state of matter, this substance is highly energetic and has the versatility of being able to function in both heat and cold, vacuum and atmosphere, and many other variables. The first hot plasma system dates from 1954, when using a tungsten diode in conjunction with gas flow due to the voltaic arc of this tool, plasma that was generated reached temperatures of up to 20,000 °C. However, the interest of this review lies not in the heat but in the cold. Based on the interest of the versatility of these systems, multiple advances have been made in this field because it was evidenced that, if a noble gas was used instead of oxygen or carbon-based gases, it was possible to create plasma without black body radiation, which allows it to be used on any surface without damaging or deforming it. The reason why this happens is due to the amount of electrons that



a noble gas has and that by not having unpaired electrons, they do not allow the excitation of the nucleus of the gas atom, thus generating cold plasma.

For this work, a comparative review was carried out between a disinfectant and the use of cold plasma as a possible substitute for these substances. Because it is necessary to demonstrate whether cold plasma can compete against a chemical sterilization system for all the advantages that its application would have in an industrial and/or medical way.

3. Introducción

3.1. Origen del plasma

El plasma es un gas ionizado con propiedades únicas. Cuando un sólido es calentado lo suficiente para romper la matriz cristalina, usualmente se genera un líquido. Cuando un líquido es calentado lo suficiente para evaporarlo, se genera un gas. Finalmente cuando un gas se calienta lo suficiente para que los átomos colisionen entre si y puedan desplazar sus electrones en el proceso, se forma el plasma o “cuarto estado de la materia” (Goldston, 1995).

Se estima que más del 99.99% del universo se encuentra en un estado de plasma, por ejemplo: nebulas gaseosas, gas interestelar, estrellas (como lo es un sol), estos cuerpos tienen grandes superficies con temperaturas extremas que varían desde 2,000 hasta 22,000 K y consisten completamente de plasma. Nuestro planeta no es la excepción al estado de plasma. La atmósfera terrestre a una altura entre 90 y 500 Km donde se ubica la termosfera, la radiación cósmica y vientos solares continuamente se encuentran en contacto con dicha zona y consecuencia de lo mismo es que los componentes se vuelven especies cargadas eléctricamente que funcionan como una protección llamada ionosfera. La radiación ultravioleta solar es absorbida casi en su totalidad por la ionosfera, produciendo partículas eléctricamente cargadas (mayoritariamente electrones) las cuales son reflejadas y redirigidas a los polos, donde el resultado en el caso del hemisferio norte son las auroras boreales. Otro ejemplo es la formación de rayos durante una tormenta eléctrica la cual también es un estado de plasma (Perucca, 2010).

Utilizando de ejemplo las tormentas eléctricas, aunque el mecanismo de desarrollo de la formación del campo eléctrico en las nubes es desconocido, es sugerido que este fenómeno se



asocia con el congelamiento del agua. Se ha evidenciado que la ausencia de hielo durante la formación del campo energético reduce en gran medida la velocidad y disminuye la posibilidad de formar rayos. Cuando hay presencia de partículas de hielo que colisionan dentro de las nubes, se aumentan el crecimiento del campo eléctrico y su separación bajo la influencia de gravedad la cual probablemente contribuye al desarrollo de transferencia de carga energética, lo cual da como resultado las descargas energéticas de plasma conocidas como rayos. (Perucca, 2010)

El termino plasma fue utilizado por primera vez por Lewi Tonks e Irving Langmuir en 1929 para describir el conjunto de partículas cargadas. Posteriormente, la definición fue ampliada para definir un estado de la materia (“el cuarto estado de la materia”) en el cual un número significativo de átomos y/o moléculas son cargadas eléctricamente o ionizadas con la característica fundamental de exhibir un comportamiento colectivo debido a las interacciones cortas y largas de Coulomb. Un ejemplo para definir dichas ondas se basa en el ejemplo de la Figura 1 donde, “el campo eléctrico separa por inducción las cargas positiva y negativa de una esfera metálica. Así, debido al tamaño finito de las esferas, la distancia r entre cargas del mismo signo resulta ser menor que la distancia r' entre cargas de signo opuesto. En consecuencia, la fuerza repulsiva asociada a r domina sobre la fuerza atractiva asociada a r' dando como resultado una interacción que, bajo una aproximación razonable, contiene un término dominante de fuerza dipolar repulsiva que será menor que la repulsión coulombiana (que no está contrabalanceada por fuerzas atractivas)” (Ghezzi, 2008). Para alcanzar la terminología actual, Langmuir realizo una investigación física y química respecto a los filamentos de tungsteno en las bombillas de luz, con el objetivo de extender la vida útil de los mismos. A partir de esta investigación desarrollo la teoría de la funda de plasma, las capas limite que se forman entre plasma ionizado y superficies sólidas. De igual manera hallo que existen ciertas regiones en el tubo de descarga de plasma que exhiben variaciones periódicas en la densidad de electrones, lo cual da origen a las *ondas de Langmuir* (Perucca, 2010) (Tonks, 1929).

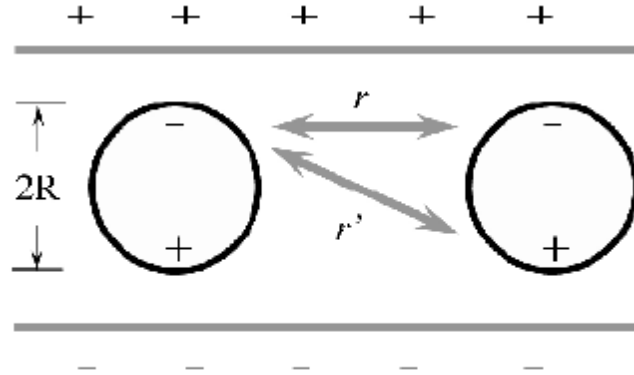


Figura 1. Interacción dipolar. Adaptado de (Ghezzi, 2008)

A partir del descubrimiento anterior el plasma es una herramienta que durante las últimas dos décadas ha modificado la manera en la que la industria puede llevar a cabo diferentes procesos a un menor costo, de manera segura y con una menor emisión de gases nocivos para el medio ambiente. Generalmente el uso de plasma en la industria (alimentaria, metalúrgica y médica) utiliza un principio de plasma caliente, el cual tiene como fundamento crear un campo de contención electromagnético que permite obtener un flujo laminar del gas ionizado (Laroussi, 2007).

3.2. Maneras de generar plasma

El plasma no se puede obtener simplemente calentando un contenedor de gas. El problema principal radica en que ningún contenedor puede alcanzar la temperatura que el plasma necesita para estar en su estado ionizado o el contenedor se vaporizaría y de igual manera se volvería plasma (Goldston, 1995).

En un laboratorio, una pequeña cantidad de gas puede calentarse e ionizarse haciendo correr corriente eléctrica a través del gas o irradiándolo con ondas de microondas. En ambos casos, la capacidad térmica del contenedor es tomada en cuenta para evitar que se derrita o ionice durante una prueba de pulso corto, también es posible realizar pulsos largos si el contenedor es enfriado continuamente (Goldston, 1995). Por lo tanto, el plasma puede generarse de forma mecánica (compresión cerrada a adiabática), térmica (fundidoras eléctricamente calentadas), química (reacciones exotérmicas), radiante (radiaciones de partículas como campos electromagnéticos de alta energía o rayos de electrones) y electromagnética (arcos voltaicos, descargas de corona,



corriente directa, frecuencia de radio, microondas, resonancia de descarga ciclotrónica de electrones) (Perucca, 2010).

De forma general, estos sistemas para generar plasma radican en dar energía a los electrones para desaparecerlos y que estos se encuentren en forma libre, siendo así como una colisión electrón-átomo libera más electrones, el proceso funciona como una cascada hasta alcanzar el grado de ionización deseado. En algunos casos, los electrones finalizan con mayor temperatura de la deseada a los iones, dado que los electrones acarrear la corriente eléctrica o absorben las ondas de radio (Goldston, 1995).

Dependiendo de la aplicación requerida, existe una gran cantidad de formas y condiciones para generar plasma. Una de las características más importantes es la presión del gas. A una temperatura específica del gas, la presión define la densidad total de partículas de dicho gas y consecuentemente la probabilidad y frecuencia de una colisión mutua entre las partículas del gas. A mayor presión del gas, mayor frecuencia de colisión y por ello una mayor probabilidad de que se alcance un estado de equilibrio energético. Si se toma el Helio como ejemplo, los primeros potenciales de ionización de los elementos que son sometidos a un tratamiento con plasma van desde varios eV hasta un máximo de 24.6 eV (donde el equivalente térmico energético de kT de 1eV corresponde a temperatura verdadera de T que es aproximadamente 11,600 K \approx 11,300 °C). En un equilibrio térmico, todas las partículas tienen la misma temperatura, incluyendo al gas neutro. Ejemplos claros son las partes centrales de un relámpago y el núcleo del sol, donde todos los átomos involucrados se encuentran a la misma temperatura. Sin embargo, el hombre ha diseñado sistemas de plasma térmicamente caliente, como antorchas de arco utilizadas en incineradores de desperdicio o plantas para soldar. El plasma térmico es práctico para procesos pirolíticos y aplicaciones metalúrgicas, química de alta temperatura, esprayado térmico, etc. (Bardos, 2010).

Una de las características más atractivas de los plasmas de presión atmosférica no térmicos es la capacidad de lograr una química mejorada de la fase gaseosa sin la necesidad de temperaturas elevadas del gas. Esta atractiva característica llevó recientemente a su uso extensivo en aplicaciones que requieren bajas temperaturas, como en el procesamiento de materiales y en aplicaciones biomédicas (Laroussi, 2007).

En un gran número de aplicaciones, particularmente aquellos donde el plasma debe interactuar con un substrato sólido sin dañarlo, la temperatura no debe exceder los 1000°C; para algunas



aplicaciones, el límite térmico es mucho menor, cercano a la temperatura ambiente. Bajo estas condiciones, se requiere un plasma “frío” que no se encuentra en equilibrio térmico. Un plasma que no se encuentra en equilibrio térmico puede ser generado a bajas presiones de gas donde las colisiones de partículas suceden en menor cantidad. Debido a que los sistemas de plasma de baja presión requieren bombas y sistemas de vacío que tienen un alto precio económico, se ha generado un creciente interés para remplazar los sistemas actuales con sistemas de plasma atmosférico frío (Bardos, 2010).

3.3. Sistemas para generar plasma frío

Existen diferentes fuentes para generar plasma atmosférico frío desde el desarrollo y diseño del primer reactor de barrera de descarga dieléctrica (DBD) construido en el siglo diecinueve por W. Von Siemens para producir ozono. Para ciertas aplicaciones es posible utilizar un sistema de plasma térmico en decadencia donde su temperatura es ≤ 500 °C. Sin embargo, fuentes de plasma térmico tienen una demanda energética y un consumo de gas considerablemente elevado lo cual descarta y compromete su eficiencia como sistema de plasma frío (Bardos, 2010).

Las observaciones con una cámara para dispositivos acoplados de carga intensificada (ICCD) con 100 ns para tiempo de exposición y 1000 tomas revelan las características de un sistema jet para plasma, ya sea con Argón o Helio. Lo que pudiese parecer un plasma homogéneo en realidad no lo es, asemeja más a una “pistola de plasma”, la cual sopla pequeñas “balas de plasma” fuera de la boquilla. Mientras que esta característica no limita la capacidad de tratar superficies, es de suma importancia para la elección del gas y el sistema de ionización. Los flujos laminares de gas son de suma importancia ya que a partir de ellos se logra el transporte de las especies activas por el jet de plasma a la superficie a tratar con una mezcla mínima de aire ambiental (Bardos, 2010).

Contrario a los plasmas de presión reducida disponibles en grandes volúmenes, los plasmas con caminos libres y entornos reducidos a presión atmosférica limitan el volumen e impacto del plasma. En las aplicaciones donde se tratan objetos tridimensionales, la decadencia y regiones de resplandor de un flujo de plasma deben emplearse con sistemas jet especial para alcanzar plasmas de largo alcance. Estos sistemas generalmente tienen grandes consumos de gas para prolongar las columnas de plasma y son típicamente utilizadas con Helio, lo cual los vuelve caros.



Una excepción son las fuentes híbridas de plasma, los tratamientos de grandes sustratos por sistemas jet de plasma requieren una cierta moción entre el jet y el sustrato. La fuente de plasma también puede ser diseñada como una matriz de chorro para alcanzar una función eficiente (Bardos, 2010).

Adicionalmente, a lo mencionado por Bardos (2010), Cao (2009) y Nie (2009) apuntan directamente que uno de los sistemas más prácticos para poder generar plasma frío es el sistema jet, el cual permite tener buen flujo de plasma sin ionizar los isotopos. No obstante, se menciona que este tipo de plasma es complicado de mantener y requiere de grandes flujos de gas que permitan mantener las columnas de plasma. Si estos puntos anteriormente mencionados son contemplados y cubiertos en el diseño a utilizar el sistema jet puede funcionar sin inconvenientes.

3.3.1. Barrera de descarga dieléctrica (DBD) y por corona

Las fuentes de barrera son las más populares de plasma atmosférico frío. Una barrera dieléctrica en uno o ambos electrodos puede suprimir y, en combinación con energía de alta frecuencia prevenir flujos erráticos. Existe un gran número de diseños, construcciones, formas de electrodos, y barreras dieléctricas utilizadas para diferentes aplicaciones. Algunos de estos sistemas se muestran en la Figura 2. Un simple arreglo corona (sin DBD) con transmisores se observa en el apartado a) de la Figura 2 para comparación con un arreglo DBD que se encuentra en el apartado b) de la Figura 2. Los sistemas DBD para sustratos planos móviles se muestran en el apartado c) de la Figura 2 y el apartado d) de esta misma imagen. El apartado e) de la Figura 2 es para tratamiento de grandes superficies, un arreglo múltiple DBD puede utilizarse con un par de electrodos en forma de cuadrícula recubiertos con una barrera de alúmina. En todos los sistemas DBD, las cargas acumuladas de las superficies sobre las barreras dieléctricas deben ser neutralizadas, por ejemplo, por un pulso de corriente directa bipolar tanto para un régimen estático o de flujo de un gas (Bardos, 2010).

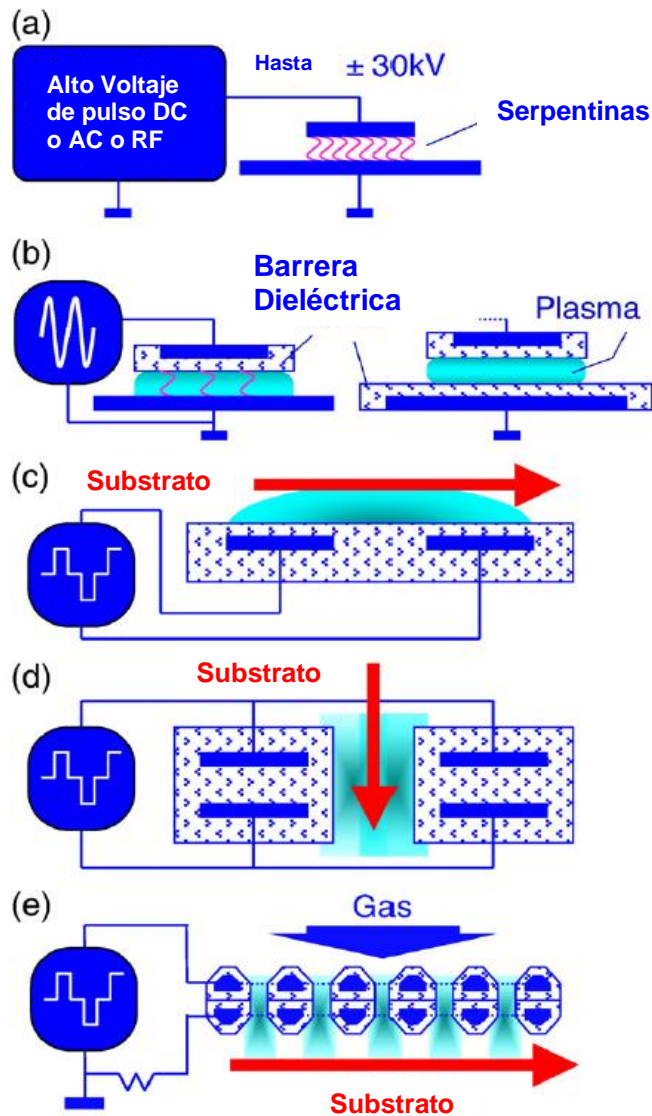


Figura 2. Arreglos corona y barrera de descarga dieléctrica (DBD). (a) Corona con flujo; (b) Barreras dieléctricas sobre electrodos; (c) Arreglo DBD para tratamiento de sustratos planos de gran área; (d) Arreglo DBD para tratamiento bilateral; y (e) Arreglos DBD de cuadrícula múltiple (espacios de 200 μm x 200 μm). Las flechas en (c), (d) y (e) indican la dirección del sustrato en movimiento. Modificada de (Bardos, 2010)

3.3.2. Jets de plasma a presión atmosférica y descargas de microondas (APPJ)

Los campos energéticos de alta frecuencia tienen un efecto estabilizador en el plasma y pueden generar plasma sin caudal en gases moleculares. Las energías por radio frecuencia (RF) (13.56



MHz y sus armónicos) y microondas (Los osciladores industriales típicamente operan entre 896MHz, 915MHz, 922MHz, 2.45GHz y 5.6GHz) son usadas comúnmente para generar jets y columnas de plasma sin equilibrio. Algunos de estos sistemas se muestran en la Figura 3 como esquemas. El apartado a) de la Figura 3 es un sistema simple por microondas con guía de ondas cónicas para incrementar el campo eléctrico en un reactor de cuarzo. Los sistemas más sofisticados utilizan transiciones de onda a coaxial para generar un jet de plasma (Figura 3. b). La principal desventaja de los sistemas con microondas es: Se requieren grandes cantidades de energía para generar plasma y el tamaño del reactor de plasma está limitado por las dimensiones de la guía de ondas. Sin embargo, el tamaño del plasma se puede agrandar utilizando diferentes resonadores con sistemas distribuidos de slots; por ejemplo, por fuera del reactor e irradiando la energía hacia el axis del reactor (Bardos, 2010).

La Figura 3c) muestra una fuente jet de plasma por radio frecuencia. Dichas fuentes se pueden acomodar con una barrera dieléctrica en una o ambas superficies de los electrodos. La frecuencia operativa de una fuente de plasma coaxial puede extenderse hasta el rango de microonda para suprimir el flujo y generar plasma luminoso en gases moleculares (Bardos, 2010).

La fuente híbrida de plasma en el apartado d) de la Figura 3 es la combinación de un generador con una antena de microondas con un cátodo hueco energizado con radio frecuencia, o un pulso DC eléctrico. A esta fuente se le conoce como Descarga activada por un electrodo híbrido hueco (H-HEAD). Este plasma de microondas se produce con ondas superficiales y la energía de las partículas puede controlarse en ambos casos por parámetros de microondas o un cátodo hueco. Esta fuente de plasma es capaz de producir de plasma de gran tamaño (hasta 18 cm) a flujos muy bajos de gas ($\leq 250 \text{ cm}^3/\text{min}$) y funciona tanto con gases monoatómicos como con gases moleculares. Resultados recientes demuestran la posibilidad de operar el sistema con una fuente de vapor de agua o inclusive sumergido en agua. El plasma generado por un sistema H-HEAD, con flujo de aire a través de la antena, sumergido en agua contenida en un recipiente de aluminio Figura 4. (Bardos, 2010).

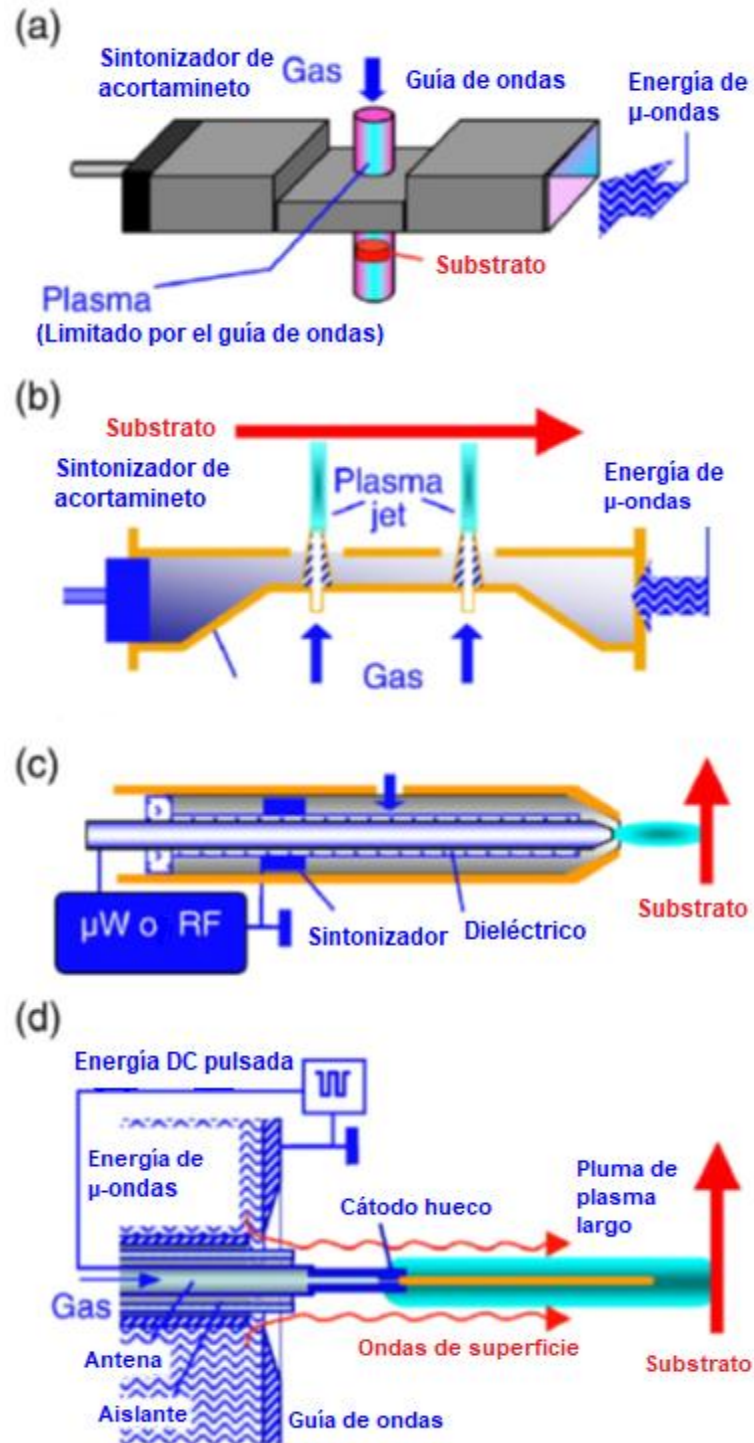


Figura 3. Fuente de plasma por microonda o radio frecuencia (RF). (a) Arreglo de onda simple rectangular; (b) Arreglo de onda para un jet de plasma; (c) Arreglo DBD para un jet de plasma de RF coaxial; y (d) Fuente de plasma híbrida con antena de onda de superficie con función de cátodo hueco con pulso de DC. Las flechas más largas en (b), (c) y (d) indican la dirección del sustrato en movimiento. Modificada de (Bardos, 2010)

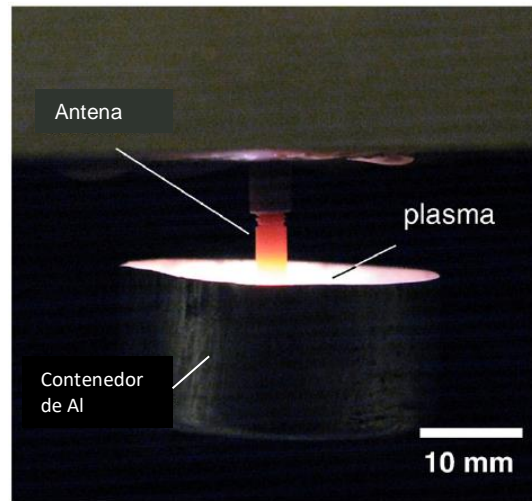


Figura 4. Plasma generado por una fuente H-HEAD, con flujo de aire de 300 cm³/min a través de la antena, sumergida en un contenedor de aluminio con agua. Modificada de (Bardos, 2010)

3.3.3. Nuevas fuentes de plasma para tratamiento de superficies de gran tamaño

Muchas fuentes productoras de plasma atmosférico frío están basadas en micro descargas. Las unidades pequeñas de plasma atmosférico son matrices multiplexadas, sistemas integrados en línea, o sistemas distribuidos por área. Un ejemplo son las matrices de RF con jets DBD. Los sistemas especiales para generación de plasmas de gran tamaño están basados en sistemas de varios cátodos huecos integrados para formar un sistema de cátodo fusionado hueco (FHC). La Figura 5 a) de manera esquematizada muestra un sistema FHC con una estructura abierta integrada y gas fluyendo. Muchos cátodos huecos, energizados por generadores de RF, o DC de pulso, se posicionan cerca el uno del otro para que los plasmas puedan interactuar de manera individual. Dicho arreglo permite un uso muy bajo de RF (≥ 0.2 W/cm² para Neón a una temperatura $\geq 100^{\circ}\text{C}$) y debido a las bajas tensiones de ruptura de RF puede mantenerse el plasma sobre toda la superficie del electrodo. El sistema FHC puede tener diferentes formas. La Figura 5 b) muestra como ejemplo un arreglo rectangular abierto operado a una RF de 40 W con plasma de Neón sobre un electrodo de área 115mm x 18mm (Bardo, 2010).

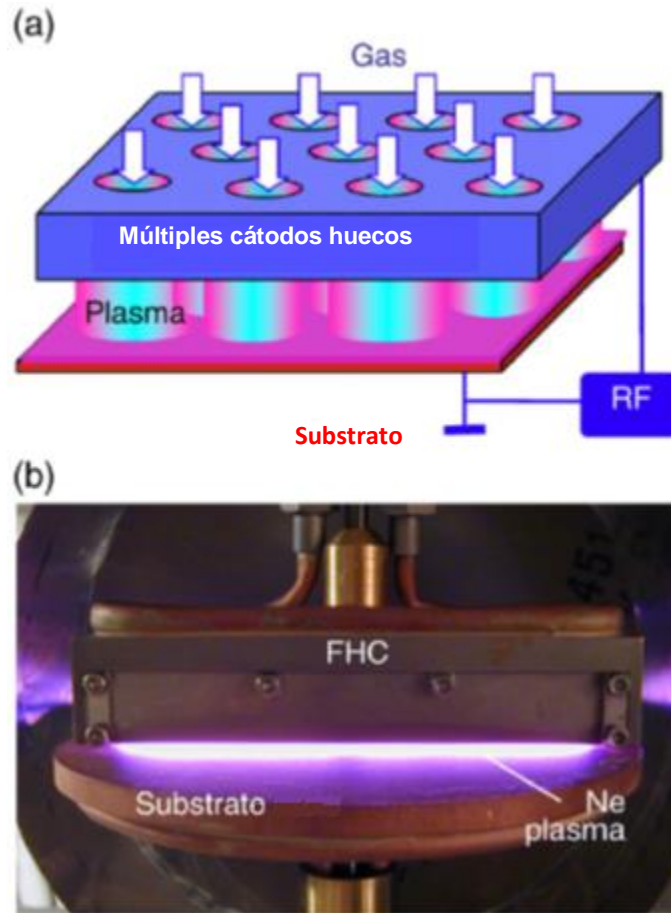


Figura 5. Fuente de plasma a partir de un cátodo hueco fusionado (FHC). (a) Arreglo esquematizado de un sistema de cátodo hueco integrado por RF. (b) Fuente FHC abierta rectangular de 120-mm-de longitud, con plasma de Neón, generado con 40 W. Modificada de (Bardos, 2010)

3.4. Tipos de gases utilizados

Argón

El argón es un gas inerte por lo que no reacciona con el material durante el proceso. Por su bajo potencial de ionización sirve perfectamente para encender el haz de plasma; sin embargo, el argón no se ha utilizado en solitario ya que presenta una conductividad térmica reducida y un bajo contenido calorífico (Indura, 2015).



Hidrógeno

En comparación con el argón, el hidrógeno presenta una buena conductividad térmica y además se disocia a altas temperaturas. Esto significa que absorbe mucha energía del arco eléctrico (como en la ionización) con lo que las capas exteriores se enfrían; este efecto contribuye a estrechar el arco generando una densidad energética mayor. Debido a procesos de recombinación, la energía absorbida vuelve a liberarse en el baño de fusión en forma de calor. Sin embargo, el hidrógeno no puede utilizarse en solitario ya que al contrario que el argón tiene un peso atómico muy bajo y por ello no es capaz de generar energía cinética suficiente (Indura, 2015).

Nitrógeno

El nitrógeno es un gas poco reactivo, es decir, sólo reacciona con el material a altas temperaturas y permanece inerte a temperaturas bajas. En cuanto a sus propiedades (conductividad térmica, entalpía y peso atómico) se sitúa entre el argón y el hidrógeno por lo que puede utilizarse en solitario y como gas secundario como plasmágeno (Indura, 2015).

Oxígeno

Por su conductividad térmica y peso atómico el oxígeno puede clasificarse junto al nitrógeno. El oxígeno es un gas plasmágeno que alcanza una energía cinética alta y por ende altas temperaturas, volviéndolo poco práctico para trabajo con materiales orgánicos (Indura, 2015).

Aire

Básicamente, el aire se compone de nitrógeno (aproximadamente 70%) y oxígeno (aproximadamente 21%), por lo que permite utilizar las propiedades de ambos gases, el aire es uno de los gases más baratos (Indura, 2015).

Mezclas de gases

A menudo se utilizan los gases anteriores formando mezclas gaseosas. Esto permite combinar dos o más gases; por ejemplo, aprovechando las buenas propiedades térmicas del hidrógeno junto con el elevado peso atómico del argón. Naturalmente, pueden utilizarse también otras combinaciones como mezclas de nitrógeno-hidrógeno o argón-nitrógeno-hidrógeno. Todas las



anteriores poseen la propiedad de alcanzar energías térmicas y cinéticas muy elevadas, volviéndolos poco prácticos para un uso biológico/biomédico (Indura, 2015).

En lo que refiere a la pureza (en porcentaje) de los gases que deben emplearse, así como la obtención de su máximo desempeño se ilustran en la tabla 1.

Tabla 1. Gases científicos de alta pureza. Modificada de (Indura, 2015).

Gas Plasmógeno	
Oxígeno	99.5%
Nitrógeno	99.9%
Hidrógeno	99.95%
Argón	99.9%

Sin embargo, el uso de plasmas calientes tiende a deformar materiales y principalmente se utiliza en procesos de estructuración y modelado de superficies. Si el objetivo fuese trabajar elementos biológicos, hacer uso de un elemento de alta temperatura volvería imposible emplear al mismo, ya que un gas ionizado tiene la misma capacidad de descomponer un material biológico. Por ello, un gran avance es el uso de gases ionizados fríos, que a partir de dicho uso es posible acceder a los beneficios de una herramienta de alto desempeño sin el impedimento de daño por quemaduras energéticas. Con esto último, se puede establecer que el gas que permite trabajar de mejor manera materiales biológicos es aquel que es inerte y no reacciona con los materiales a los cuales se aplica (Pankaj, 2007).

3.5. Comportamiento de las especies cargadas

Los plasmas fríos se caracterizan por una distribución de energía que no se encuentra en equilibrio entre diferentes rangos de libertad, diferentes estados de excitación y diferentes partículas. Se puede simplificar la distribución energética separando las temperaturas de los componentes como: temperatura del electrón (T_e), Temperatura de excitación electrónica ($T_{el\text{ex}}$), temperatura vibracional (T_{vib}), temperatura rotacional (T_{rot}) y temperatura traslacional (T_{trans}). En



plasmas fríos creados por un campo eléctrico externo, la relación es la siguiente $T_e > T_{el\text{ex}} > T_{vib} > T_{rot} = T_{trans}$. La naturaleza no equilibrada permite la creación de especies sin generación excesiva de calor la cual puede dañar los sustratos o causar una disociación excesiva. Así mismo, el proceso químico que ocurre en un plasma frío sobrepasa cualquier sistema que funcione a partir de la adición exclusiva de calor (Staack, 2008).

Las descargas luminosas mejor conocidas son las de los sistemas de baja presión no-térmicas. La descarga luminosa normal existe típicamente en el espacio entre electrodos paralelos a una corriente mayor que aquella del límite de ruptura de Townsend y mientras que las emisiones de electrones secundarios inducidos por iones en el cátodo sostienen la descarga. La relación en el aumento del campo eléctrico, densidad de corriente y caída de voltaje pueden utilizarse para predecir y estimar con precisión los parámetros de descarga. Con presión atmosférica la versión a escala de una descarga luminosa normal tiene dimensiones características en décimas hasta cientos de micrómetros y ha sido clasificada como micro plasma. Debido a una elevada temperatura y posible transición a un arco, los regímenes de operación estable se limitan a bajas cantidades energéticas y mezclas menos complejas de gases que sus contrapartes de baja presión. Por ello, la elevada temperatura del gas puede representar un problema para la aplicación de estos procesos de descarga (Staack, 2008).

La temperatura de un gas puede en gran medida ser determinada por un rango de transferencia energética de los electrones hacia el gas neutro, aunque, una cantidad notable de calentamiento también ocurre a partir del calentamiento de Joule (fenómeno por el que los electrones en movimiento de una corriente eléctrica impactan contra el material a través del cual están siendo conducidos. La energía cinética que tienen los electrones se convierte entonces en energía térmica, calentando el material por el que circulan) de los iones en la funda del cátodo. Generalmente la energía transferida por los electrones puede ser ineficiente debido a diferencias significativas entre las características energéticas y la diferencia de masas entre las partículas que interactúan. El mecanismo para mantener un sistema no equilibrado puede describirse de la siguiente manera: el campo eléctrico calienta los electrones hasta alcanzar un estado energético alto, los electrones lentamente ceden su energía al gas neutro y el gas neutro tiene la posibilidad de permanecer frío al abandonar el área de descarga o transfiriendo el calor a los electrodos o paredes del tubo de descarga. Cuando se escala una descarga con presión; la energía de la descarga permanece igual mientras que el área superficial en la que ocurre el enfriamiento escala a $1/p^2$ (uno entre presión al cuadrado). Siendo así, a presión atmosférica los requisitos de



enfriamiento son altos y el calentamiento puede sobrepasar al enfriamiento. Por esta razón mantener un plasma frío estable a presión atmosférica es una tarea complicada (Staack, 2008).

Una diferencia significativa se observa en la transferencia de energía entre electrones y átomos neutros y electrones y moléculas neutras. En gases atómicos el aumento en la temperatura del gas es el resultado principal de la transferencia de energía traslacional entre la colisión de electrones a átomos, llamada transferencia de energía $e-T$ (electrón- traslacional). En gases moleculares los electrones pueden transferir su energía a modos de energía intermedia adicional interna en la molécula como vibración y rotación. Dado que, la energía característica vibracional típica (0.2-0.5 eV) es comparable con temperaturas típicas de los electrones ($\sim 1\text{eV}$) la mayoría de la energía del electrón puede transferirse a variantes vibracionales, $e-V$, posteriormente transferirse a temperatura de gases, $V-T$ de relajación. Siendo que, el rango de transferencia de energía $e-V$ y $V-T$ son significativamente más rápidos que $e-T$, los gases moleculares tienen típicamente un rango de calentamiento mayor y son más susceptibles a termalización (Stack, 2008).

En la Figura 6 se muestran imágenes de una descarga utilizando Helio, Argón, Hidrógeno, Nitrógeno y Aire. En todas las descargas de los diferentes gases se utilizó una corriente de 3.0 mA y el espacio inter-electrodo fue de 400 μm . Todas las descargas de forma general son aparentemente similares en estructura a una descarga de baja presión y brillo normal. De forma visible es posible apreciar las regiones de brillo negativo (NG) la cual es una región luminosa estrecha que se produce en una descarga eléctrica en un gas a baja presión y que a menudo es la segunda región del cátodo, espacio oscuro de Faraday (FDS) el cual es un espacio oscuro de baja intensidad de luz entre la columna positiva y el brillo negativo del cátodo en un tubo de vacío, columna positiva (PC) que es la región en una descarga eléctrica que se extiende desde el ánodo hasta el espacio oscuro de Faraday y brillo del ánodo (AG) que es la región luminosa entre la columna positiva y el espacio oscuro del ánodo en un tubo de vacío. Las diferencias obvias radican en el color aparente de las descargas y la variación en la dimensión relativa y brillo de las regiones. La región de brillo negativo en el helio es la más grande mientras que en el Hidrógeno es la más chica, indicando menores y mayores densidades de corriente respectivamente. La longitud del espacio oscuro de Faraday varía entre gases, es difícil discernir en la imagen del Helio, y en el caso de la descarga de Hidrógeno es la más larga. La columna positiva para la mayoría de las descargas es similar en diámetro con excepción del Helio que tiene una columna positiva más ancha pero menos intensa. El estriado de la columna positiva es

visible en las imágenes de la Figura 6 para Helio y en menor cantidad para Argón. La región luminosa del ánodo es visible en el caso Helio e Hidrógeno pero no es tan distinguible en el caso de Nitrógeno, Argón y Aire (Staack, 2008).

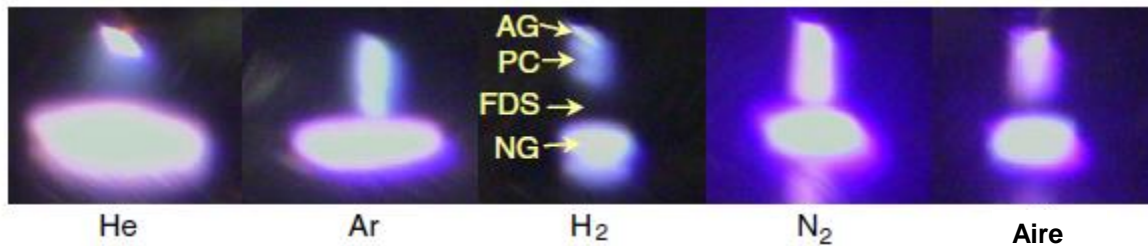


Figura 6. Imagen del brillo de una descarga normal en Helio, Argón, Hidrogeno, Nitrógeno y Aire para un electrodo de espacio de 400 μm y una corriente de 3.0mA. Regiones de brillo negativo (NG), espacio oscuro de Faraday (FDS), columna positiva (PC) y brillo del ánodo (AG). Modificada de (Staack, 2008)

3.6. Aplicaciones actuales

En lo que refiere a las aplicaciones de un gas ionizado estos se han utilizado no solo en procesos metalúrgicos, también han abierto la posibilidad a procesos verdes en el almacenamiento de alimentos. Uno de los principales lineamientos para dicho almacenamiento es una carga mínima de microorganismos, ya que en esta rama el control de calidad es clave. A partir del uso de gases de bajo peso molecular es posible llevar a cabo un proceso de esterilización sin deformación de empaques secundarios a base de PET/PVDC/PE-LD. Un tratamiento sinérgico se encuentra reportado en el uso de plasma frío y luz UV para la inactivación de *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* en tratamientos de un segundo para daño de DNA a células vegetales y endosporas de *Bacillus atrophaeus*. Todo lo antes mencionado sin daño a los alimentos o a los materiales plásticos que fueron expuestos ha dicho tratamiento. Dentro del mismo sistema, se hace mención del uso de O₂ a 13.56 MHz el cual tuvo una capacidad germicida sobre *Pseudomonas aeruginosa*; sin embargo, este gas en su estado ionizado tiene la capacidad de deformar materiales dependiendo del ángulo utilizado para las exposiciones (Pankaj, 2007).



Otra prometedora aplicación para los sistemas CAP radica en la odontología a partir del proceso de desinfección. Esto se debe a que los sistemas CAP tienen una gran capacidad para la inactivación de los biofilms. El uso de un sistema de este tipo ofrece un método menos destructivo para el llenado de cavidades formadas por caries y a su vez debido a que un sistema CAP opera a temperatura ambiente, este no causaría dolor o destrucción de tejido (Olesiak y Stępnia, 2012, Hoffmann, 2013).

Estos sistemas también permiten tener una alternativa en la rama de oncología. Fridman *et al*/en 2008 demostró que a partir de un sistema DBD de electrodo libre es posible tratar un melanoma (Friedman, 2008). Los sistemas CAP tienen la capacidad de inducir apoptosis o necrosis dependiendo de la dosis de tratamiento. La apoptosis se desarrolla a partir de bajas dosis durante varias horas de aplicación y la necrosis se desarrolla con dosis más altas en periodos de tiempo similar. De forma similar es posible inducir apoptosis en células de cáncer de mama a partir de un sistema CAP alimentado con Heliox (Sun, 2010).

Klinger en su investigación veterinaria de 2020 demuestra que una exposición directa de plasma frío sobre tejido necrosado de una serpiente *Python regius* infectada con *Stenotrophomonas maltophilia*, la cual es una bacteria Gram negativa que es capaz de causar septicemia en reptiles y es multirresistente a antibióticos. Debido a que, la mayoría de los antibióticos generan hepatotoxicidad en los reptiles, el uso de plasma frío resultó ser una alternativa segura, (una dosis de 15s/cm² tres veces a la semana durante 2 semanas). La serpiente tuvo una rehabilitación total en la que inclusive se formó tejido nuevo y sano. Aunque se desconoce cuál es la actividad específica del plasma frío sobre los microorganismos, el gas noble ionizado fue capaz de inactivar a una bacteria multirresistente.

3.7. Justificación de la revisión bibliográfica

La resistencia de los microorganismos en torno a los antibióticos y desinfectantes es una problemática que no solo afecta a la industria alimenticia o médica. Dicha resistencia es algo ya común inclusive en las líneas de producción de la industria farmacéutica a pesar de todos los puntos críticos que se tienen para evitar estas contaminaciones. La razón principal de este problema se debe a que si un microorganismo puede sobreponerse a una barrera como el



“desinfectante” puede poner en riesgo lotes de medicamentos, en especial cuando se habla de medicamentos estériles (parenterales) (Pankaj, 2014).

En el 2020 Patini reportó que no es posible decretar que el uso de antibióticos es el principal motivo causal de la resistencia microbiana. Sin embargo si existe una relación entre la posología de las moléculas y el tratamiento que un experto prescribe, sin importar sexo y edad. La resistencia microbiana se da de forma natural al momento de iniciar una terapia y de acuerdo con esta misma investigación, la mayor resistencia se alcanzaba a la mitad del tratamiento. Lo cual indica que durante este periodo la transmisión de plásmidos de resistencia incrementa exponencial e inevitablemente se pierde la acción terapéutica del fármaco. Cuando la infección cede y el paciente se recupera la carga microbiana es mínima y se entiende que todo microorganismo que sobrevive a una terapia de esta índole puede abandonar el cuerpo y transmitir sus plásmidos de resistencia a una nueva generación de microorganismo.

Araujo en investigación de 2011 indica que las bacterias no solo tienen la capacidad de sobreponerse a los antibióticos, sino que también pueden desarrollar mecanismos de defensa frente a sustancias desinfectantes. Este modelo de adaptación aplica a hongos, bacterias, producción de esporas y virus. Sin importar, la industria de la que se trate los protocolos preventivos de sanidad que se tengan, los microorganismos siempre podrán desarrollar biofilms y esto repercute en la calidad, producción y seguridad del producto. Por ello es relevante hallar una solución adicional a los protocolos de sanidad industrial que sea independiente a los métodos químicos y enzimáticos.

Adicional a la problemática de resistencia a desinfectantes se apunta a que, la resistencia es meramente un gen que se desarrolla bajo condiciones especiales. El desarrollo de estos mecanismos de resistencia aún es desconocido, pero existe una pequeña cantidad que se ha logrado elucidar y hacen referencia a genes *qac* en las bombas de salida las cuales son proteínas transmembranales. Estos mecanismos principalmente se encargan de expulsar sustancias como antibióticos y desinfectantes que ingresen al microorganismo y pudieran dañarlo. Se ha demostrado así mismo que los plásmidos que codifican genéticamente para el funcionamiento de estas bombas entre organismos son fácilmente transferibles entre ellos y por ende el resultado es una resistencia independiente al gradiente de concentración de los desinfectantes (Mc Carlie, 2020).



4. Propósito de la revisión

Debido al aumento de la resistencia de los microorganismos, los desinfectantes y esterilizantes podrían estar cayendo en obsolescencia, por lo tanto es importante realizar una comparación bibliohemerográfica del rendimiento para el control microbiológico de las sustancias actualmente utilizadas y la nueva tecnología de plasma frío como posible sustituto.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

- Establecer una comparación teórica sobre el rendimiento para el control microbiológico de los desinfectantes y esterilizantes actuales frente a un sistema CAP como posible sustituto mediante una revisión bibliohemerográfica y digital.

5.2. Objetivo particular

- Analizar los mecanismos de resistencia de los microorganismos.
- Documentar ampliamente los mecanismos desinfectantes de los sistemas CAP.

6. Metodología

- Se identificó un problema de gran interés en el cual se puedan evidenciar alternativas que pudiesen dar una solución a dicho problema.
- Se identificó como problema la resistencia a sustancia desinfectantes por parte de microorganismos y como solución se investigó respecto a una tecnología nueva denominada Plasma Atmosférico Frío.
- Se estableció un estudio retrospectivo de un lapso de tiempo de 120 años.
- Se instauró como monto máximo el empleo de 100 referencias bibliográficas.
- Se utilizaron Google Scholar, Elsevier Science, Science Direct, Springer Link y NCBI como motores de búsqueda.
- Se llevó a cabo una revisión a través de artículos de investigación y libros de texto actuales.



- Los criterios de inclusión fueron: Sistemas CAP, resistencia microbiana, resistencia microbiana a desinfectantes, estudios de resistencia microbiana a desinfectantes, empleo de métodos sinérgicos de desinfección con sistemas CAP y tratamientos desinfectantes con sistemas CAP.
- Los criterios de exclusión fueron: tratamientos médicos no relacionados a microorganismos con sistemas CAP, tecnología a base de plasma que no fuese CAP o de aplicación desinfectante/esterilizante y estudios biotecnológicos de modificación de microorganismos para control microbiológico.
- Una vez localizada la información necesaria, se realizó un estudio de contraste entre acciones de sustancias desinfectantes y acciones desinfectantes de sistemas CAP para poder establecer una comparativa de efectividad.
- A partir del contraste realizado se procedió a discutir y concluir los datos obtenidos.

7. Antecedentes

El uso de desinfectantes no es una práctica reciente, formas de desinfectar superficies es la práctica de milenios. Sin embargo, el auge de las sustancias desinfectantes químicas tiene aproximadamente un siglo. Rideal (1903) proporciona información relevante respecto a esa época y que no todas las sustancias utilizadas eran seguras. Una de las principales dificultades de la época se debía a enfermedades zoonóticas (infecciones agudas) causadas por gérmenes y que el uso rutinario de dichas sustancias debía llevarse a cabo bajo supervisión de un oficial de salud.

En 1986 Hoff en su artículo “Resistencia Microbiana a Desinfectantes: Mecanismos y significados” menciona un experimento realizado por Haas y Morrison (1981) donde se describe a una cepa de *Escherichia coli* que era sometida a hipoclorito de sodio demostraba generar resistencia basado en un factor crucial. Dicho factor se basa en el gradiente de concentración por exposición y que toda célula que pudiese sobrevivir y reproducirse daría vida a un linaje resistente a hipoclorito de sodio, aunque se desconoce si el mecanismo de supervivencia se encuentra relacionado con control de bombas de membrana y/o reparación de ácidos nucleicos.



Otra cuestión relevante en este proceso remite a Rose y Payment donde se presenta la situación de que durante un tratamiento de agua para el control de microorganismos no solo basta con una desinfección. Es importante llevar a cabo el proceso físico de coagulación, floculación, sedimentación y filtración debido a que esto no solo permite retirar partículas donde residen los microorganismos siendo esto un proceso físico para eliminación de microorganismos.

Mc Donnell (1999) establece a mayor detalle que la resistencia a desinfectantes en el caso de las bacterias puede darse de forma natural, por mutaciones o por transposones. Así mismo se indica que para que un desinfectante pueda cumplir con su función bactericida este debe poder estar en contacto con la membrana del microorganismo y atravesarla. Dicha problemática radica en el hecho de que un microorganismo con resistencia a estas sustancias puede tolerar, degradar y evitar las sustancias desinfectantes.

En la actualidad los microorganismos han demostrado desarrollar resistencia a diferentes familias de antibióticos y productos antisépticos (Araujo, 2011) (Mc Carlie, 2019).

En el caso de los antibióticos, Annunziato profundiza en los mecanismos que tienen las bacterias para sobreponerse a los antibióticos. Donde un antibiótico puede ser degradado por enzimas especializadas desarrolladas por la bacteria para poder inactivar a un antibiótico. Algunos de los mecanismos de resistencia son: I) bombas de flujo modificadas para expulsar dichas sustancias de la bacteria y evitar así que la bacteria muera. II) modificaciones a los poros de la membrana bacteriana que disminuyen la probabilidad de ingreso de un antibiótico a la bacteria y III) la modificación del sitio diana de acoplamiento del antibiótico, el cual en gran medida deja sin función a dicha sustancia.

7.1. Estructuras promotoras de resistencia

Los hallazgos de Mc Carlie conducen a un problema de gran magnitud, radica en la resistencia a antibióticos, aunado a la limitada capacidad de producción de nuevos antibióticos, lo cual fuerza a los investigadores a desarrollar nuevas alternativas de control del crecimiento bacteriano. La comprensión de la transferencia de los genes de resistencia a desinfectantes podría permitir que dicha transferibilidad fuese limitada, por ende, salvaguardando la eficacia de los desinfectantes



utilizados. Un ejemplo es la conjugación de plásmidos de *Escherichia coli* y *Staphylococcus* spp codificantes para resistencia a desinfectantes, donde en ambos casos se comprende que son los genes *qac* los responsables de la transmisión del plásmido encargado de la modificación de funcionamiento en las bombas de flujo.

Partridge señala que, en el caso de elementos móviles genéticos, si un microorganismo pretende sobreponerse al reto de un tratamiento químico antimicrobiano es necesario adquirir determinantes preexistentes de resistencia del árbol genético bacteriano. El análisis molecular confirma que las cepas multirresistentes utilizan ese sistema de selección y adquisición lo cual permite que el linaje celular pueda amplificar su respuesta selectiva ante la presión de las sustancias desinfectantes. Algunos de estos elementos pueden desplazarse dentro o entre moléculas de DNA incluyendo transposones, secuencias de inserción, integrones y casetes de genes. Mientras que otros elementos integrativos, conjugados y plásmidos son capaces de desplazarse entre bacterias. Dicho movimiento permite la rápida evolución de la resistencia antimicrobiana.

En lo que refiere a transposones y secuencias de inserción podemos abordarlos como una secuencia de DNA móvil asociada a genes de resistencia y adaptación. Son capaces de trasladarse de manera aleatoria en nuevas posiciones dentro del mismo DNA o nuevos DNA, con lo cual pueden transportar la resistencia a nuevas ubicaciones. En el caso de las secuencias de inserción estas acarrean uno o más genes de transposasas y conforman un transposón cuando una o más copias de la misma secuencia flanquean uno o más genes. Esta región entera se desplaza como una sola unidad y estas secuencias pueden influenciar la expresión de genes pasajeros al incluir a un promotor preferente en el río arriba o trasladándose en el upstream de un gen esencial en un cromosoma. (Partridge, 2018)

Delihis en 2011 y Partridge en 2018 exponen que los casetes de genes son pequeños segmentos de DNA, frecuentemente se encuentran insertados en un integrón o una estructura circular libre. Estos casetes generalmente consisten en uno o más genes, regularmente careciendo de un sitio de recombinación y promotor. En el caso de los integrones (IN) Gillings *et al* con su trabajo en 2009 complementa que, estos pueden identificarse por componentes como un gen *intl*, un promotor y un sitio recombinante *attI*. Los IN permiten el movimiento de los genes de resistencia entre sitios definidos y se somete a recombinación sitio-específico. Este tipo de elementos genéticos móviles son comúnmente hallados en múltiples copias de a lo largo del

genoma y de esta manera facilitan una recombinación homóloga. Gnanadhas *et al.* (2013) indica que las matrices de los casetes se forman cuando varios casetes de genes se han insertado en el mismo integrón. Las matrices de casetes pueden conferir resistencia a una bacteria contra desinfectantes y antibióticos, dependiendo de que genes pasajeros tengan. Esto último puede conferir una co-resistencia a ambas sustancias y se encuentra documentado como “cepas muy resistentes”. Este punto se apoya con los trabajos de Templeton *et al.* (2009), Khan *et al.* (2016), Zhou *et al.* (2017) y Kim *et al.* (2018). En la Figura 7 se resumen los elementos genéticos movilizados intracelular e intercelular horizontal.

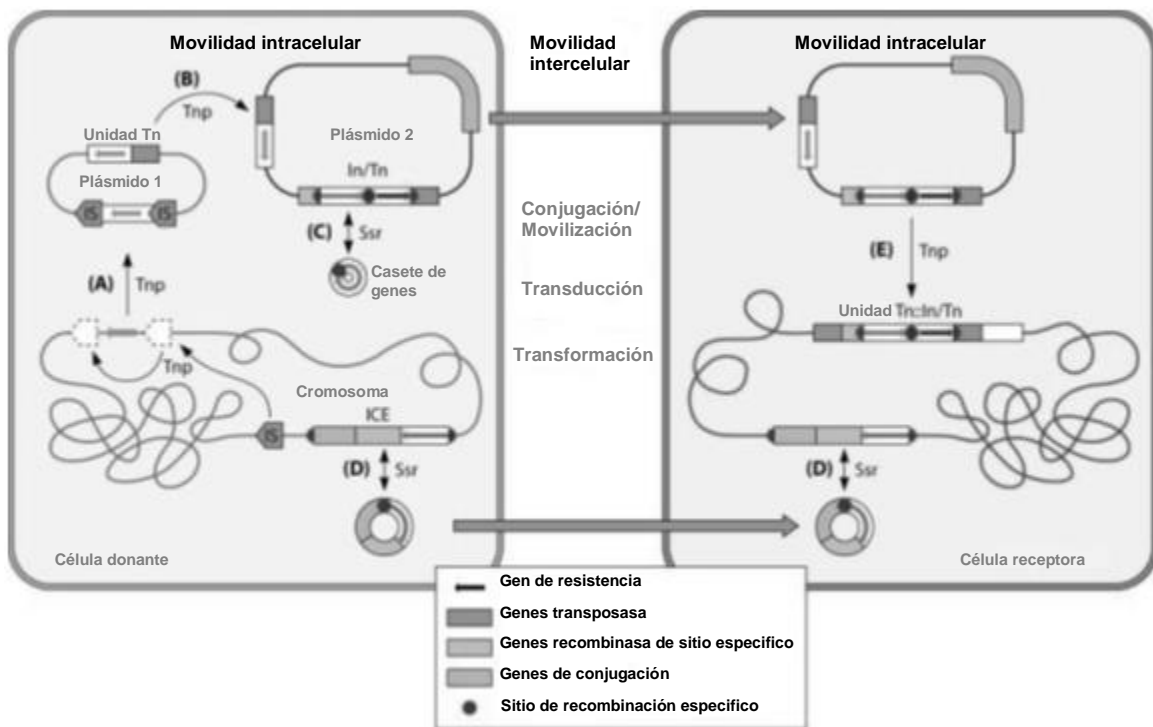


Figura 7. Elementos genéticos movilizados a través de transferencia de genes intracelular e intercelular horizontal célula donante y receptora. (A) Unidad de transposón que alberga al gen de resistencia traspasándolo de un cromosoma bacteriano a un plásmido. (B) Unidades de transposones entre plásmidos en la misma célula bacteriana. (C) Auto escisión de un casete de genes de un plásmido por un sitio-específico de recombinación. El casete de genes puede moverse entre integrones (representación de la clase 1 In/Tn) a través de un intermediario circular. (D) Elemento conjugable e integrable (ICE) de DNA donador (reversible), en una estructura circular, la cual es capaz de auto-transmitirse por conjugación. En una célula receptora, el ICE se integra al cromosoma receptor por recombinación de sitio-específico. (E) Transmisión de plásmidos por conjugación o movilización por otro plásmido. Elementos genéticos móviles que contienen genes de resistencia (como la clase dentro del plásmido puede permanecer en el plásmido o transposón sobre en cromosoma donante). Modificado de (Partridge, 2018)



7.2. Biofilms

Los biofilms o biopelículas son comunidades de microorganismos que crecen adheridos a una superficie inerte. Dichos grupos pueden consistir de una mono cultura de diferentes especies o una mezcla de fenotipos de una dada especie (McDonell, 1999).

En todas las industrias, especialmente la alimenticia, la proliferación de microorganismos es muy común aun cuando los productores lleven a cabo todos los planes de contingencia. Por lo tanto, la contaminación es normalmente causada por la formación de biofilms debido a la carencia o ineficiencia de un plan de limpieza. Las moléculas orgánicas son capaces de depositarse en todo tipo de superficies y agua utilizada para producción provee de buenas condiciones para el desarrollo y crecimiento microbiológico. Así mismo, las características físicas del substrato influyen el apego inicial. Es más, las plantas industriales tienen líneas de producción intrínsecas con puntos críticos donde se espera la acumulación de microorganismos. Dichos puntos son: juntas, líneas terminales, puntos de conexión, válvulas, esquinas, cuarteaduras o zanjas son parte de todos estos puntos críticos. (Simões, 2010) (MacDonald, 2000)

Los biofilms pueden aparecer en cualquier tipo de industria resultando en serios costos de operaciones de mantenimiento y la reducción de la eficacia operativa de los intercambiadores de calor, incremento de la presión operativa de las plantas desalinizadoras, causando bloqueos en el sistema de tubos distribuidores de agua, incrementando el consumo energético y acelerando la corrosión de superficies metálicas requiriendo remplazo de las partes dañadas (Shi, 2009) (Kumar, 1998). También, los biofilms pueden ser un problema de la salud pública ya que los depósitos biológicos pueden ser un reservorio de organismos causantes de deterioro y/o patógenos. Algunos microorganismos que pueden encontrarse frecuentemente en un biofilm del área de procesamiento de alimentos son: *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli*. (Shi, 2009)

Normalmente los biofilms se diferencian de acuerdo con sus condiciones ambientales en las cuales se forman, por ejemplo: temperatura, pH, tipo de nutrientes disponibles y tipo de bacteria. Por ejemplo, la industria de lácteos comúnmente tiene biofilms conformados por *Pseudomona fluorescens*, *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. Para la



industria camaronera comúnmente pueden encontrarse como colonizadores de los biofilms a *P. fluorescens* y *P. putida*; en el caso de la industria de pescado, los biofilms se componen principalmente de la familia *Enterobacteriaceae* y *Serratia liquefaciens*. De esta manera se puede cotejar la hipótesis de que el sustrato modifica al tipo de microorganismos que pueden hallarse en un biofilm. (Simões, 2005) (Sharma, 2001)

Muchos microorganismos viven en el medio ambiente como biofilms en lugar de organismos de vida libre. El biofilm se definió como las células adheridas a una superficie sólida y rodeadas por una matriz extracelular producida por ellas (Czapka, 2018). Estas poblaciones presentan una mayor resistencia a factores externos adversos (antibióticos, temperatura y pH); por lo tanto, plantean un serio desafío tanto en sector salud como en la industria alimentaria (Maciejewska, 2016). Hay numerosos informes que demuestran la sensibilidad de los biofilms a plasma frío; sin embargo, el tiempo necesario para la inactivación completa de las mismas es más largo que para las células planctónicas. Se menciona que es viable reducir hasta <5 log la presencia de células planctónicas con una exposición de 15 segundos mientras que un biofilm puede tardar hasta 5 minutos. (Mai-Prochnow, 2014; Flynn, 2015)

7.3. Biocidas

El estándar europeo del 24 de abril de 1998 (CE/8/98), define a los productos biocidas como una sustancia activa o preparación que contiene una o más sustancias activas que son presentadas a un usuario en su forma final y cuya función es la de destruir, frenar crecimiento, volver inocuo, evitar o controlar a toda costa la acción de un organismo patógeno a través de un proceso químico o biológico. (Araujo P, 2011)

El uso de los biocidas en el control de los biofilms es muy aceptado y común. Aunque los biocidas son utilizados para la reducción en cantidad de microorganismos, su uso de forma simple no necesariamente reduce la velocidad de formación de un biofilm. Cloete expone en su investigación de 1998, que es esencial utilizar la cantidad correcta del biocida, con la frecuencia correcta. La aplicación incorrecta genera gastos innecesarios y altos además de dirigir a resultados desagradables. Los métodos actuales incluyen la aplicación de compuestos químicos como alcoholes, aldehídos, anilidas, biguanidas, bis-fenoles, diamidinas, agentes liberadores de



halógenos, halo fenoles, ácido peracético, derivados de metales pesados, peróxidos, fenoles y cresoles, compuestos cuaternarios de amonio (CCAs), agentes liberadores de cloro y ozono. (Simões, 2010); (MacDonald, 2000)

Cada cepa bacteriana reacciona de distinta manera a cada compuesto químico, ya sea por características fenotípicas o debido a mecanismos de resistencia. Por lo tanto, es fundamental que cuando se seleccionen uno o más biocidas, debe realizarse una evaluación para la eficacia en la erradicación de los microorganismos dominantes presentes. Únicamente cuando se tiene información acerca de la naturaleza de la población microbiana a tratar es posible determinar la relación entre la concentración mínima inhibitoria y el periodo de contacto de un biocida a un contaminante dado. (Brözel, 2000)

Dentro de los mecanismos de acción de los biocidas se puede caracterizar a las sustancias en 4 categorías: oxidantes, agentes electrofílicos, biocidas catiónicos de membrana y ácidos débiles.

Tabla 2. Mecanismos de interacción de varios biocidas de acuerdo a su blanco celular y acciones antimicrobianas. (Información extraída y adaptada de Araujo, 2011)

Blancos celulares	Acción antimicrobiana	Mecanismos de interacción	Ejemplos
Reacciones químicas			
Enzimas unidas a membrana y citoplasma conteniendo tiol. Ej. deshidrogenasa	Inhibición metabólica	Oxidación de los grupos tiol	Isotiazolinona Organomercurio Sales de metales pesados Hipoclorito
Biomoléculas (proteínas, RNA, DNA) con amino, imino, amida, carboxilo y grupo tiol (nucleofílico)	Inhibición del metabolismo celular y replicación. Posible daño a la pared celular	Reacciones generales de alquilación	Glutaraldehído Formaldehído Cloroacetamida
Grupos amino en proteínas	Inhibición metabólica; lisis	Halogenación	Hipoclorito Agentes liberadores de cloro
Grupos tiol de enzimas y proteínas	Inhibición metabólica	Oxidación de radicales libres (ej. Radicales hidroxilo)	Peróxido de Hidrógeno Ácido peracético
Integridad de la membrana externa mediada por cationes divalentes, principales regiones blanco de la pared celular de Gram negativas. Procesos enzimáticos que requieren iones metálicos	Liberación de contenido celular; Alta susceptibilidad a estrés; inhibición metabólica	Quelación de iones metálicos	EDTA Oxina
Intercalado entre pares de bases de DNA	Daño en la replicación	Intercalado	Aminoacridinas
Interacciones iónicas			



Integridad de la membrana citoplasmática; entorno de enzimas unidas a la membrana y función	Fuga de contenido; inhibición respiratoria; coagulación intracelular	Interacción electrostática con fosfolípidos	Compuestos cuaternarios de amonio Clorhexidina Polihexametileno Biguanidas
Interacciones físicas			
Gradiente de pH transmembrana; Integridad de la membrana	Fuga de contenido; disrupción del transporte, procesos de acoplamiento energético y respiratorio.	Penetración/partición hacia bicapa fosfolipídica; posible desplazamiento de fosfolípidos; ciclo molecular intramembrana	Fenoles Ácidos débiles Parabenos Tetraclorosalicilanilida Fenoxietanol 2-feniletanol
Integridad membranal	Fuga de contenido	Solución de fosfolípidos	Alcoholes alifáticos
Integridad de la membrana citoplasmática; entorno y función de la enzima unida a la membrana	Fuga de contenido, desacoplamiento de procesos energéticos; lisis	Solubilización de las proteínas de membrana	Surfactantes aniónico

Los oxidantes actúan vía reacción mediada por radicales donde se oxidan materiales orgánicos; los agentes electrofílicos reaccionan para inactivar enzimas; los biocidas catiónicos de membrana desestabilizan las membranas causando una lisis; finalmente los ácidos débiles interfieren con la habilidad de la membrana celular para mantener un balance en pH, resultando en la acidificación del interior celular y un efecto en una amplia distribución del metabolismo. (Ferreira, 2010). En la tabla 2 se resumen los biocidas más usados y su mecanismo de acción.

7.4. Mecanismos de la acción antimicrobiana de los biocidas

Un acercamiento clásico para determinar el mecanismo de acción de un biocida establece la correlación entre la concentración mínima inhibitoria y los cambios resultantes bioquímicos y fisiológicos en un organismo (Denyer, 1998). Un efecto antimicrobiano se define como una interacción entre una sustancia activa y un objetivo específico en la célula microbiana. En un enfoque objetivo el contacto con un ingrediente activo con una variedad de estructuras celulares (pared celular, membrana citoplasmática, enzimas de membrana, citoplasma y material genético). Experimentos realizados para comparar diferentes cepas revelo que las bacterias Gram negativas, que tienen una protección suplementaria de la pared celular, son más resistentes a los efectos de los bactericidas que las bacterias Gram positivas (Sykes, 1982) (Dahl, 1989). Los biocidas pasan a través de la pared celular por poros. Esta penetración de acuerdo Paulus es dependiente del tamaño, carga y propiedades lipofílicas de las moléculas. Si una



sustancia es soluble en agua y su peso molecular es de alrededor de 600 Da, existe una gran probabilidad de que atraviese el canal formado por el poro. También es posible que el biocida penetre la pared celular después de desestabilizarla y desintegrarla. Finalmente, el biocida alcanza la membrana citoplasmática como principal sitio de acción. Dependiendo del espectro de acción, estas sustancias pueden ser designadas como bioestáticos (si su acción es simplemente inhibir el crecimiento de los microorganismos o su multiplicación) o biocidas (si son capaces de eliminar microorganismos). (Araujo, 2011)

El proceso de transporte del biocida a la superficie celular, absorción, difusión, penetración e interacción con el componente blanco de la célula no es instantáneo y la duración de este proceso puede ser diferente dependiendo del biocida. La diferencia radica en el modo de acción, así como la composición química y propiedades fisicoquímicas del agente biocida. (Araujo, 2011). En la Figura 8 se resumen los principales biocidas, así como sus blancos en los diferentes microorganismos.

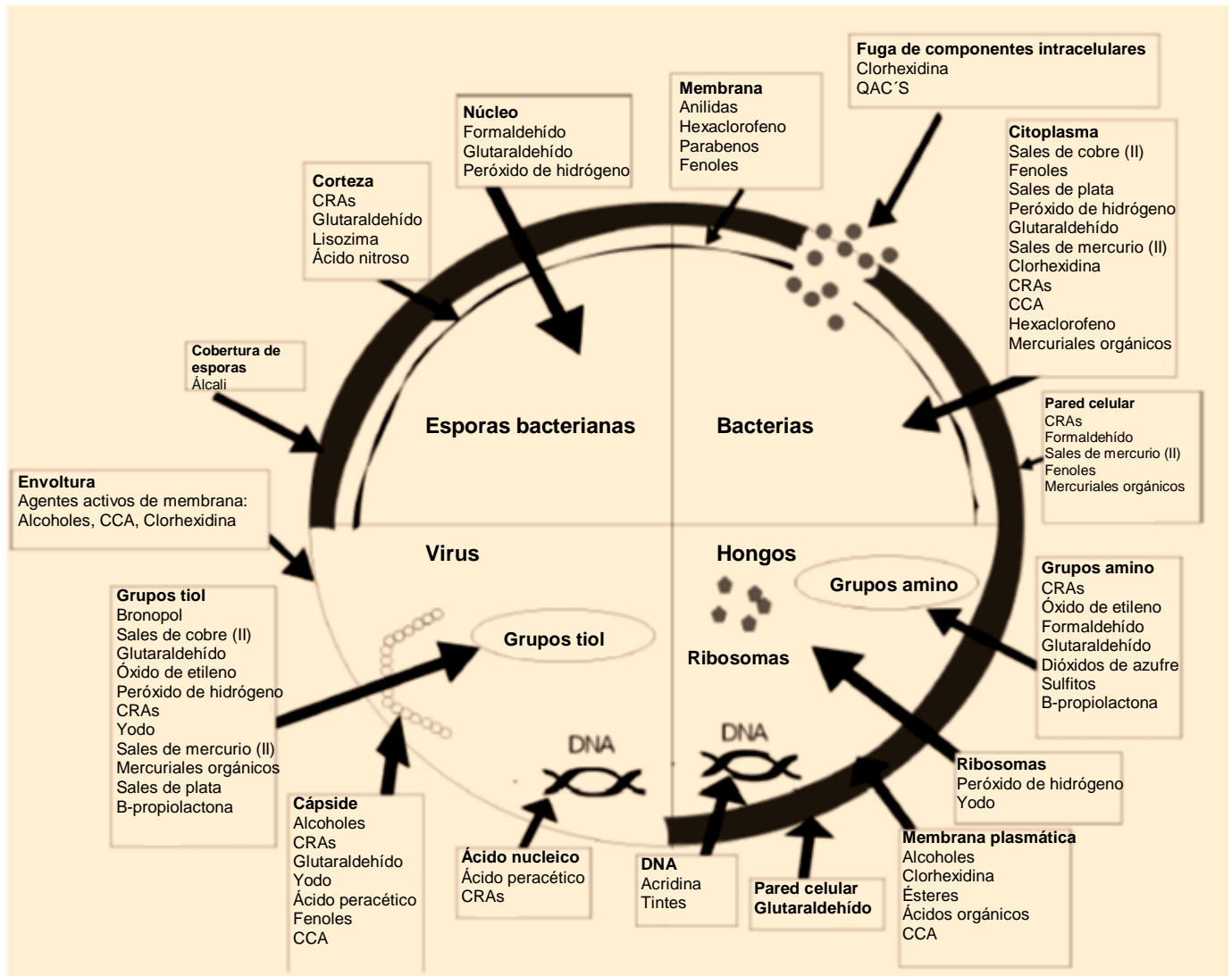


Figura 8. Tipos de acción antimicrobiana de un biocida (Extraída de Araujo, 2011).

Para evidenciar la capacidad antimicrobiana de un biocida Al-Talib realizo un experimento de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) con distintas sustancias biocidas como un control positivo con diferentes antibióticos (Vancomicina, Polimixina e Imipenem). Dicho trabajo fue realizado exclusivamente contra bacterias de infecciones nosocomiales (*MRSA*, *A. baumannii*, *E. coli*, *Klebsiella spp.* y *P. aeruginosa*) a diferentes concentraciones de biocidas (clorhexidina, H_2O_2 , yodo povidona, etanol y dettol). Acorde a los datos presentados en la tabla 3, Al-Talib indica que si existe una diferencia entre la eficacia de un biocida y el tipo de microorganismo



contra el que se utiliza. Los datos reportados en la tabla 3 bajo las distintas concentraciones pertenecen a la medición en milímetros del origen de cada pozo. Cabe destacar que, en este mismo estudio, se remarcan los polos de la CMI entre H₂O₂ y etanol ya que mientras el peróxido mostro resultados muy eficientes el etanol no tuvo acción contra ninguno de los microorganismos listados. En la Figura 9 se muestra evidencia fotográfica de algunos de los biocidas y su actividad inhibitoria sobre distintos microorganismos.

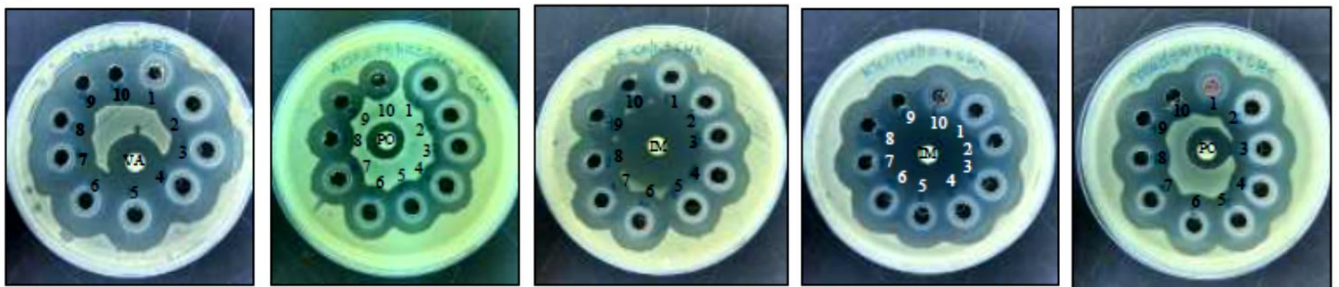
Tabla 3. Zonas de inhibición bacteriana a partir del uso de diferentes concentraciones de antisépticos. (Adaptada de Al-Talib, 2019)

Antiséptico/Bacteria	Concentración de antiséptico (%)										Control positivo	
	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10		
Clorhexidina	<i>MRSA</i>	25	24	23	23	22	22	22	21	21	20	20 ^a
	<i>A. baumannii</i>	20	18	17	17	17	16	16	16	15	14	15 ^b
	<i>E. coli</i>	26	22	20	20	18	18	18	17	17	16	30 ^c
	<i>Klebsiella spp.</i>	24	24	22	22	21	20	20	18	17	16	30 ^c
	<i>P. aeruginosa</i>	22	21	21	21	20	19	19	18	18	17	16 ^b
H ₂ O ₂	<i>MRSA</i>	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	20 ^a
	<i>A. baumannii</i>	30	30	29	29	28	28	27	27	22	20	15 ^b
	<i>E. coli</i>	38	38	38	38	38	36	25	23	20	18	30 ^c
	<i>Klebsiella spp.</i>	34	34	33	33	32	32	31	31	30	30	30 ^c
	<i>P. aeruginosa</i>	30	30	28	28	26	26	25	24	20	18	15 ^b
Yodo	<i>MRSA</i>	30	28	26	25	24	24	23	22	18	17	20 ^a
	<i>A. baumannii</i>	21	21	20	20	19	18	15	14	12	10	15 ^b
	<i>E. coli</i>	35	33	31	26	12	10	8	0	0	0	31 ^c
	<i>Klebsiella spp.</i>	24	22	22	20	20	12	10	8	8	0	30 ^c
	<i>P. aeruginosa</i>	13	12	12	11	10	9	8	7	0	0	15 ^b
Etanol	<i>MRSA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20 ^a
	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14 ^b
	<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30 ^c
	<i>Klebsiella spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30 ^c
	<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14 ^b

	<i>MRSA</i>	30	29	28	27	26	25	24	23	22	21	20 ^a
	<i>A. baumannii</i>	34	32	24	24	23	22	22	20	20	20	16 ^b
Dettol	<i>E. coli</i>	20	18	18	16	16	14	14	14	14	12	30 ^c
	<i>Klebsiella</i> spp.	20	18	18	16	15	14	14	14	13	12	30 ^c
	<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15 ^b

a: Vancomicina, b: Polimixina y c: Imipenem.

(A)



Clorhexidina / *MRSA*

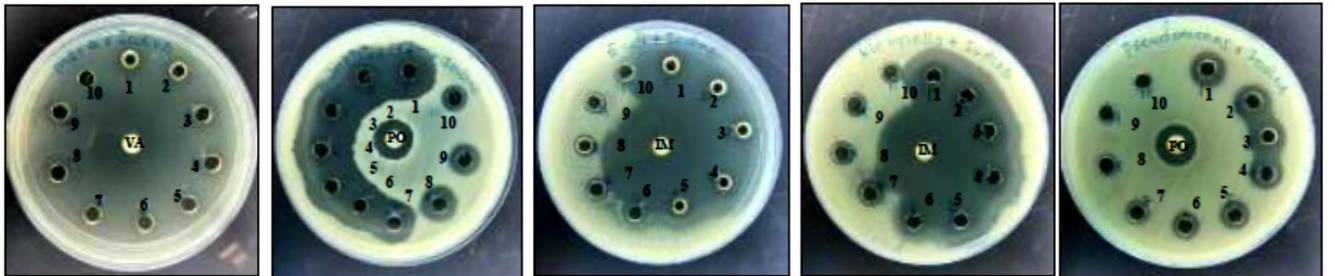
Clorhexidina / *A. baumannii*

Clorhexidina / *E. coli*

Clorhexidina / *Klebsiella* spp.

Clorhexidina / *P. aeruginosa*

(B)



Yodo / *MRSA*

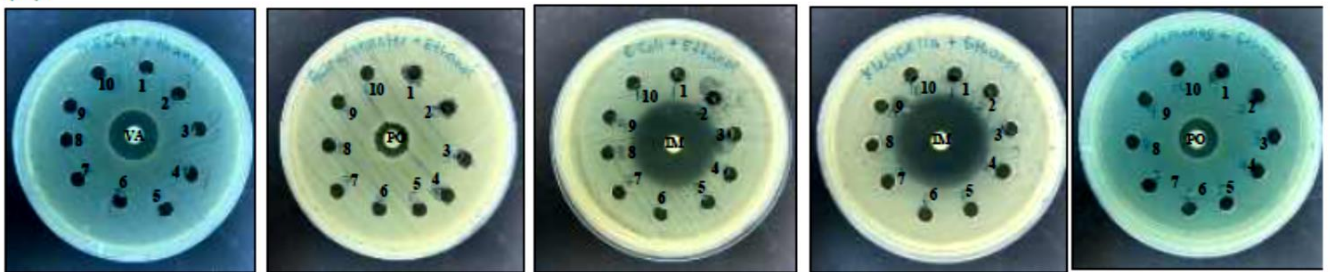
Yodo / *A. baumannii*

Yodo / *E. coli*

Yodo / *Klebsiella* spp.

Yodo / *P. aeruginosa*

(C)



Etanol / *MRSA*

Etanol / *A. baumannii*

Etanol / *E. coli*

Etanol / *Klebsiella* spp.

Etanol / *P. aeruginosa*

Figura 9. Prueba de susceptibilidad contra bacterias nosocomiales A. Clorhexidina B. Yodo y C. Etanol. (Extraída de Al-Talib, 2019)



7.5. Mecanismos antimicrobianos del plasma frío

El mecanismo por el cual los sistemas CAP (plasma atmosférico frío) pueden esterilizar aun no es del todo conocido. De acuerdo con Liao se han realizado múltiples experimentos donde el resultado es la inactivación de microorganismos e inclusive virus, pero la relación que existe en este proceso no ha sido explorada a profundidad. Bourke apunta a que se atribuye gran parte de la actividad esterilizante a electrones de alta energía, partículas y átomos ionizados y radiación ultravioleta que cuando entran en contacto con material biológico los compuestos derivados de oxígeno y nitrógeno se encuentran en un estado de alta reactividad y los efectos de estas partículas principalmente actúan en la oxidación de la membrana lipídica y proteínas, lo cual da como resultado final la disrupción de la membrana celular (Afshari & Hosseini, 2014). Liao y Wiktor mencionan que las partículas cargadas por el plasma se acumulan al exterior de la membrana, desintegrándola. La discontinuidad en las estructuras superficiales celulares también puede deberse a una electroporación, donde dicho fenómeno involucra el incremento en número de los poros ya existentes más la creación de nuevos poros por el pulso del campo eléctrico.

En relación a la radiación ultravioleta Liao en su trabajo de 2017 y Beggs en 2002 exponen que esta energía tiene la capacidad de degradar DNA y de esta manera cumplir con la función de inactivación microbiana. Los fotones presentes en el plasma tiene la facultad de alterar ácidos nucleicos, que a su vez dan origen a la formación de dímeros de nitrógeno que incapacitan la replicación del DNA. Bayliss con su investigación en 2012, añade que las contribuciones de cada mecanismo y su efectividad en la inactivación biológica varían y depende de los parámetros del proceso de generación del plasma, factores ambientales y el tipo y propiedades del microorganismo. En la Figura 10 se describe la eficacia del plasma frío y en la Figura 11 los mecanismos de inactivación microbiana con especies reactivas de plasma.

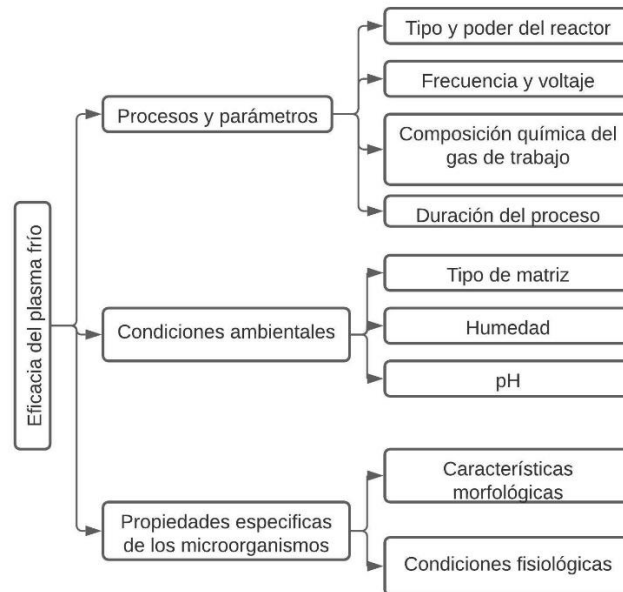


Figura 10. Factores que influyen la efectividad de un plasma frío para descontaminar (Adaptado de Niedźwiedź, 2019)

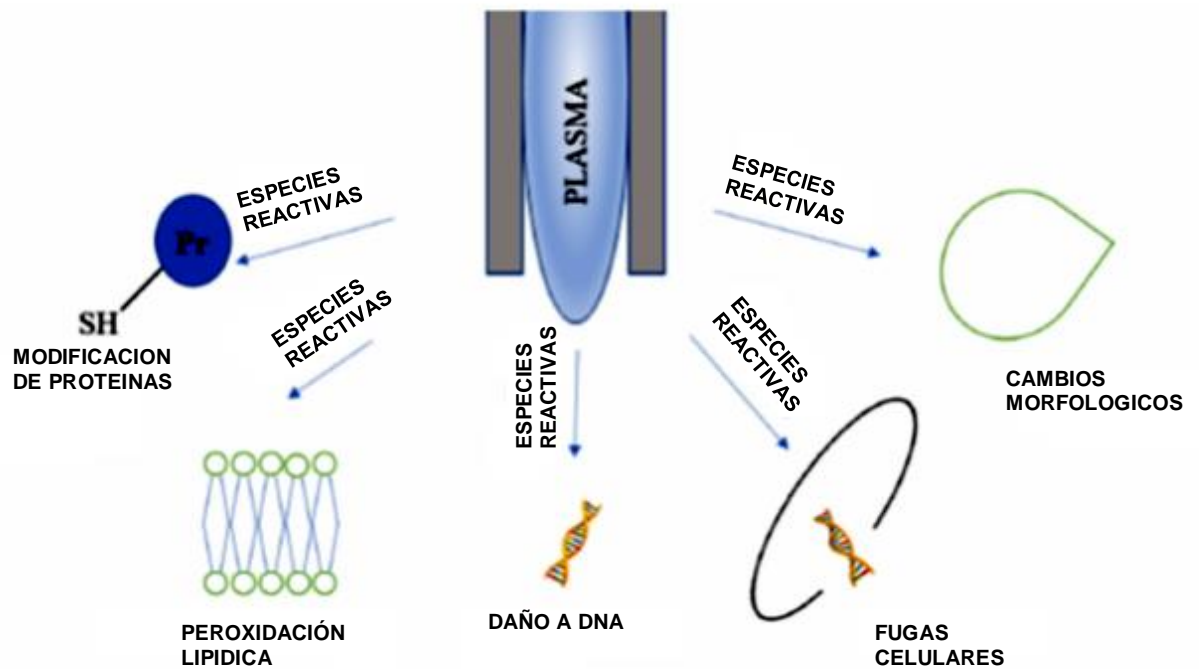




Figura 11. Mecanismos de inactivación microbiana con especies reactivas de plasma. (Basado en Bourke, 2017; Adaptado de Niedźwiedź, 2019)

8. Discusión

Los microorganismos son un objetivo clave en la investigación de la eficiencia plasmática, ya que la susceptibilidad al proceso de esterilización puede variar entre microorganismos, incluso dentro de especies y cepas. Depende en gran medida de la estructura de las membranas celulares y de la fase de crecimiento microbiano. (Liao, 2017)

Todavía se desconoce el mecanismo exacto de inactivación de las células bacterianas por plasma frío, aunque el problema se ha estudiado ampliamente. La permeabilización de la membrana o pared celulares que conduce a la fuga de componentes intracelulares, es decir, potasio, ácidos nucleicos y proteínas entre otros, se considera uno de los mecanismos de inactivación de este grupo de microorganismos. Además, la inactivación de bacterias se produce a través del daño oxidativo a las proteínas intracelulares y el DNA relacionado con el efecto de los compuestos plasmáticos (Mai-Prochnow, 2014).

Otro fenómeno inducido por la actividad del plasma es el cambio del potencial de membrana celular. Esto conduce a alteraciones en la función de la fuerza protomotriz (forma de transformar energía oxidativa en otros tipos de energía) y, en consecuencia, la síntesis anormal de ATP y el deterioro del metabolismo celular y la división (Brun, 2018). Los cambios en la integridad de la membrana pueden tener un efecto directo en el DNA, principalmente a través de la interrupción de las interacciones con las proteínas de membrana y la formación de poros en la membrana celular por la cual los ácidos nucleicos pueden ser liberados de la célula. (Coutinho, 2018)

La liberación de DNA inducida por plasma es posible después de la fragmentación previa del DNA, y la eficacia de este proceso depende de la conformación del ácido nucleico. En comparación con el DNA lineal, su forma circular súper enrollada se considera la forma resistente de los ácidos nucleicos (Moreau, 2008; Alkawareek, 2014). En general, se cree que el efecto plasmático en el DNA es el resultado de la actividad de compuestos reactivos y fotones UV que se generan simultáneamente con la interacción de plasma y aire atmosférico. En la célula, se



pueden formar las reticulaciones de proteínas de DNA, que conducen a la formación de daños difíciles de reparar. Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno producidas por el plasma oxidan las proteínas por la generación de grupos hidroperóxidos en su estructura, que pueden formar fuertes cruces intermoleculares con los ácidos nucleicos. (Niedźwiedź, 2019)

En el experimento llevado a cabo por Guo, las células de *E. coli* después del tratamiento con la corriente plasmática con aire y 1% de Helio fueron sometidas a dos versiones de un ensayo de cometa (con y sin proteinasa K) para evaluar la formación de reticulaciones en el DNA de la bacteria analizada. En la imagen de DNA fluorescente de las células tratadas con el plasma, los investigadores observaron "colas" cortas que indicaban los fragmentos dañados sin tratamiento proteico, y colas mucho más largas después del tratamiento con proteinasa. Esto sugirió la presencia de enlaces cruzados de DNA y proteínas, que fueron destruidos por la enzima que digiere las proteínas. Luego, las proteínas se separaron por ultracentrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio, tratada con una nucleasa, y su análisis reveló una mayor concentración y diversidad de las proteínas que en las muestras que no fueron tratadas con el plasma. Esta puede ser otra prueba que respalda la hipótesis de que el daño inducido por plasma a los ácidos nucleicos es el resultado de la unión covalente proteína-DNA.

Ahora, si se desea disponer de un sistema confiable que puede equipararse a las sustancias utilizadas actualmente como desinfectantes, también debe considerarse destrucción de esporas y biofilms. A través de la adaptación evolutiva, las esporas bacterianas han adquirido la posibilidad de sobrevivir en condiciones ambientales adversas. Se caracterizan por resistencia a desinfectantes, esterilizadores químicos, procesos de secado e inactivación térmica. La principal causa de una resistencia tan alta de las esporas es su estructura, que difiere sustancialmente de la de las formas vegetativas de las bacterias. Las esporas se componen de capas externas impermeables que crean una barrera específica para los factores externos. Además, se caracterizan por un bajo contenido de agua, que representa aproximadamente el 15% de toda la célula. (Olesiak y Stępnik, 2012)

Hasta la fecha no se ha aclarado el mecanismo preciso del efecto plasmático sobre las esporas. Algunos investigadores sugieren que las esporas se inactivan principalmente a través de interacciones entre los compuestos plasmáticos reactivos y las estructuras de esporas externas (Hong, 2009). Los cambios morfológicos en endosporas de *B. subtilis* inducidos por varios factores relacionados con tratamiento de plasma frío fueron presentados por Deng en imágenes



de microscopía electrónica de barrido (SEM). Se observaron modificaciones de tamaño en las esporas, la fuga del contenido de citoplasma y la interrupción final de la membrana. Estos resultados sugieren que la oxidación por especies reactivas de oxígeno es el principal factor que contribuye a la reducción del número de células *B. subtilis* viables, mientras que, en el campo eléctrico, los fotones UV y las partículas cargadas juegan un papel menor en este proceso. Otros investigadores demostraron que la inactivación de las endosporas fue causada principalmente por daños en sus capas externas que resultaron en fugas de ácido dipicolínico e hidratación del núcleo (Tseng, 2012). Los estudios recientes realizados por Connor en 2017 también han hecho hincapié en el impacto de las condiciones ambientales en la eficiencia plasmática. Los estudios sobre la resistencia de las esporas de *Clostridium difficile* al plasma se llevaron a cabo en tres ambientes diferentes (las esporas suspendidas en agua y esporas secas con o sin 0.03% BSA). La mayor reducción en el número de esporas en el menor tiempo se observó en un ambiente seco. Por el contrario, la materia orgánica y el ambiente húmedo ampliaron el tiempo de la inactivación de esporas por plasma. (Klampf, 2014)

Dobrynin en su investigación de 2010 sugirió que las especies reactivas de oxígeno que penetran en el interior celular podrían causar oxidación de proteínas implicadas en la germinación o inactivar receptores de germinación ubicados en la membrana interna de esporas. A su vez, Wang *et al* en 2011 compararon la cinética de la germinación de las esporas *B. subtilis* tratadas con plasma frío y esporas no tratadas. Llevaron a cabo los experimentos en un ambiente enriquecido con germinantes nutritivo (L-valina) y germinantes no nutritivo (dodecilamina, Ca²⁺+DPA). Sus resultados indicaron los posibles efectos de inactivación del plasma en los receptores de germinación, pero la germinación inducida por L-valina se inhibió.

Ahora es posible comprender que las bacterias pueden ser inactivadas a partir de plasma frío siempre tomando en cuenta que los parámetros de exposición dependen de si son Gram negativas o positivas y si se encuentran en forma de espora. Sin embargo, para considerar al plasma frío como equiparable o sustituto a las sustancias desinfectantes se debe considerar a hongos y levaduras.

Nishime *et al* realizó un estudio sobre la eficacia del plasma generado por las descargas de DBD con adición de helio contra varios microorganismos. Los investigadores estudiaron las bacterias *Enterococcus faecalis* (Gram-positiva) y *P. aeruginosa* (Gram-negativa), así como las levaduras *Candida albicans*. Informaron de un efecto inactivante del plasma en todos los microorganismos



investigados. Sin embargo, en comparación con las células bacterianas, *C. albicans* exhibió mayor resistencia, lo que puede explicarse principalmente por las diferencias en su estructura celular. A su vez, las investigaciones llevadas a cabo por Colonna *et al* se centraron en el efecto del plasma generado con aire seco y una mezcla de gas (65% O₂, 30% CO₂, 5% N₂) en células de *Saccharomyces cerevisiae* a una densidad diferente de suspensión celular y duración de la exposición. Los resultados confirmaron una correlación entre la eficacia de la esterilización y los parámetros del proceso. Para las muestras con mayor densidad celular, se requirió un temporizador más largo de exposición de la suspensión al plasma para una degradación celular completa. Además, el efecto de reducción monitoreado en varios puntos de tiempo indicaba una mayor eficiencia de una corriente de plasma con una mezcla de gas (Ryu, 2013). Así mismo, se encontró que el tratamiento de *S. cerevisiae* con plasma de argón condujo a la ubiquitinación proteica y la formación de los agregados proteicos insolubles en el citoplasma de levadura. Estos investigadores también subrayaron el potencial de la generación inducida por CP de estrés a retículo endoplasmático (ER), que es característico de las células eucariotas. Esto fue confirmado por un aumento en la actividad de la proteína de retículo endoplasmática de transmembrana Ire1p inducida por la acumulación de proteínas desplegadas en ER (Itooka, 2018).

Por último, las enfermedades vegetales causadas por patógenos fúngicos plantean una grave crisis, la tecnología de plasma frío puede convertirse en un método alternativo de protección vegetal, ya sea inactivando células fúngicas o mejorando la resistencia de los huéspedes infectados (Dasan, 2017a; 2018). Las investigaciones que confirmaron la susceptibilidad de este grupo microbiano a la actividad CP (plasma frío) han sido llevadas a cabo por muchos investigadores (Suhem, 2013; Sohbatzadeh, 2016; Nikmaram, 2018). Algunos de ellos sugirieron que la inactivación de células fúngicas utilizando CP implica principalmente la producción de compuestos reactivos que parecen tener su efecto destructivo en la pared celular y la membrana interna de hongos (Ye, 2012; Lu, 2014; Dasan, 2016; 2017a). En su estudio, Ye *et al.* (2012) evaluó el efecto del plasma (gas de trabajo: aire) generado por las descargas corona en hongo *Penicillium expansum*, es decir, uno de los patógenos más importantes causando el deterioro de la fruta almacenada. Las imágenes del SEM revelaron la interrupción de las estructuras externas de *P. expansum*, que resultó en fugas citoplasmáticas. A su vez, un análisis de las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) indicó las alteraciones inducidas por plasma en la célula, es decir, un mayor volumen del protoplasma, estiramiento de vacuolas y desintegración de la membrana, lo que contribuyó a la lisis celular.



Además de su impacto en estructuras externas y orgánulos intracelulares, los compuestos reactivos presentes en el plasma y la radiación UV generada causan daños a los ácidos nucleicos y oxidación de proteínas y lípidos. Lu (2014) en su trabajo investigó el efecto del CP en *Cladosporium fulvum* mediante la determinación de la concentración de malondialdehído (MDA), es decir, el producto básico de la peroxidación lipídica. Los hallazgos reportados confirmaron la hipótesis de que la actividad de esterilizar agentes en células fúngicas desencadena el proceso de peroxidación. (Deng, 2006)

De esta manera y a partir de la información recabada, es posible establecer la comparativa de origen. Un sistema CAP como se muestra en la Figura 10 puede desempeñar todas las funciones de un biocida, desde daño a la estructura de los microorganismos hasta daño directo de material genético. Aunado a los efectos desinfectantes y esterilizantes del sistema CAP, es necesario abordar que los tiempos de exposición son menores que los de un biocida. Nishime en su experimento muestra que los tiempos de inhibición van hasta los 180 segundos con sistemas CAP mientras que la investigación de Köhler registra lapsos de tiempo que van hasta los 15 minutos para ciertas poblaciones de microorganismos con un biocida. La evidencia es contundente respecto a eficacia, seguridad y costo/beneficio. Sin mencionar que independientemente a que una sustancia (plasma frío) pueda realizar todas las funciones de los biocidas, un inconveniente de los biocidas químicos es que para alcanzar efectos múltiples sería necesario mezclar dichas sustancias. Para poder realizar dicho proceso debe revisarse la compatibilidad de los agentes, su estabilidad y principalmente el hecho de que mezclarlos no modifique su efectividad frente a los microorganismos.

9. Conclusión

El plasma frío sin lugar a dudas es tecnología nueva a la cual aún no ha sido posible cuantificarle todos sus atributos y beneficios. Sin embargo, fue posible establecer una comparativa pertinente entre sustancias desinfectantes/esterilizantes y un sistema CAP. Así mismo, fue posible analizar los mecanismos de resistencia de los microorganismos y documentar los mecanismos desinfectantes de los sistemas CAP. El desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos a sustancias desinfectantes es un problema mundial el cual avanza



rápidamente. Es por ello que la aplicación y desarrollo de sistemas de plasma frío podría ser una alternativa segura y eficiente que puede aplicarse en múltiples campos para dar seguridad, limpieza y control microbiológico sin el inconveniente de perder efectividad a largo plazo debido a la evolución de los microorganismos.

Bibliografía

1. Afshari, R., & Hosseini, H. (2013). Non-thermal plasma as a new food preservation method, its present and future prospect. *Archives of Advances in Biosciences*, 5(1). <https://doi.org/10.22037/jps.v5i1.5348>.
2. Alkawareek, M. Y., Alshraideh, N. H., Higginbotham, S., Flynn, P. B., Algwari, Q. T., Gorman, S. P., Gilmore, B. F. (2014). Plasmid DNA Damage Following Exposure to Atmospheric Pressure Nonthermal Plasma: Kinetics and Influence of Oxygen Admixture. *Plasma Medicine*, 4(1-4), 211–219. doi:10.1615/plasmamed.2015011977
3. Al-Talib, H., Alkhateeb, A., Ruzuki, A. S. A., Zulkifli, N. F., Hamizi, S., Muhammad, N. S., & Abd Karim, A. F. (2019). Effectiveness of commonly used antiseptics on bacteria causing nosocomial infections in tertiary hospital in Malaysia. *African Journal of Microbiology Research*, 13(10), 188-194. <https://doi.org/10.5897/AJMR2019.9058>
4. Annunziato. (2019). Strategies to Overcome Antimicrobial Resistance (AMR) Making Use of Non-Essential Target Inhibitors: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 5844. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20235844>
5. Araújo, P., Lemos, M., Mergulhão, F., Melo, L., & Simões, M. (2011). Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 3, 826-834. <http://doi.org/10.1.1.471.6617>
6. Bárdos, L., & Baránková, H. (2010). Cold atmospheric plasma: Sources, processes, and applications. *Thin Solid Films*, 518(23), 6705–6713. doi:10.1016/j.tsf.2010.07.044
7. Beggs, C. B. (2002). A quantitative method for evaluating the photoreactivation of ultraviolet damaged microorganisms. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(6), 431–437. doi:10.1039/b202801h
8. Bourke, P., Ziuzina, D., Han, L., Cullen, P. J., & Gilmore, B. F. (2017). Microbiological interactions with cold plasma. *Journal of Applied Microbiology*, 123(2), 308–324. doi:10.1111/jam.13429
9. Brözel, V. S., & Cloete, T. E. (1991). Resistance of bacteria from cooling waters to bactericides. *Journal of Industrial Microbiology*, 8(4), 273–276. doi: 10.1007/bf01576066.
10. Brun, P., Bernabè, G., Marchiori, C., Scarpa, M., Zuin, M., Cavazzana, R.,... Martines, E. (2018). Antibacterial efficacy and mechanisms of action of low power atmospheric pressure cold plasma: membrane permeability, biofilm penetration and antimicrobial sensitization. *Journal of Applied Microbiology*, 125(2), 398–408. doi:10.1111/jam.13780



11. Cao, Z., Walsh, J. L., & Kong, M. G. (2009). Atmospheric plasma jet array in parallel electric and gas flow fields for three-dimensional surface treatment. *Applied Physics Letters*, 94(2), 021501. doi:10.1063/1.3069276
12. Cloete, T. E., Jacobs, L., & Brözel, V. S. (1998). The chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodegradation*, 9(1), 23–37. doi: 10.1023/a: 1008216209206.
13. Colonna, W., Wan, Z., Pankaj, S. K., & Keener, K. M. (2017). High-Voltage Atmospheric Cold Plasma Treatment of Yeast for Spoilage Prevention. *Plasma Medicine*, 7(2), 97–107. doi:10.1615/plasmamed.2017019201
14. Connor, M., Flynn, P. B., Fairley, D. J., Marks, N., Manesiotis, P., Graham, W. G., McGrath, J. W. (2017). Evolutionary clade affects resistance of *Clostridium difficile* spores to Cold Atmospheric Plasma. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/srep41814
15. Coutinho, N. M., Silveira, M. R., Rocha, R. S., Moraes, J., Ferreira, M. V. S., Pimentel, T. C.,... Cruz, A. G. (2018). Cold plasma processing of milk and dairy products. *Trends in Food Science & Technology*, 74, 56–68. doi:10.1016/j.tifs.2018.02.008
16. Dahl, T. A., Midden, W. R., & Hartman, P. E. (1989). Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *Journal of Bacteriology*, 171(4), 2188–2194. doi:10.1128/jb.171.4.2188-2194.1989
17. Dasan, B. G., Boyaci, I. H., & Mutlu, M. (2017). Nonthermal plasma treatment of *Aspergillus* spp. spores on hazelnuts in an atmospheric pressure fluidized bed plasma system: Impact of process parameters and surveillance of the residual viability of spores. *Journal of Food Engineering*, 196, 139–149. doi:10.1016/j.jfoodeng.2016.09.02
18. Dasan, B. G., Mutlu, M., & Boyaci, I. H. (2016). Decontamination of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* spores on hazelnuts via atmospheric pressure fluidized bed plasma reactor. *International Journal of Food Microbiology*, 216, 50–59. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09
19. Dasan, B. G., Onal-Ulusoy, B., Pawlat, J., Diatczyk, J., Sen, Y., & Mutlu, M. (2016). A New and Simple Approach for Decontamination of Food Contact Surfaces with Gliding Arc Discharge Atmospheric Non-Thermal Plasma. *Food and Bioprocess Technology*, 10(4), 650–661. doi:10.1007/s11947-016-1847-2
20. Delihhas, N. (2011). Impact of Small Repeat Sequences on Bacterial Genome Evolution. *Genome Biology and Evolution*, 3, 959–973. doi:10.1093/gbe/evr077
21. Deng, X., Shi, J., & Kong, M. G. (2006). Physical Mechanisms of Inactivation of *Bacillus subtilis* Spores Using Cold Atmospheric Plasmas. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 34(4), 1310–1316. doi:10.1109/tps.2006.877739
22. Denyer, S. P., & Stewart, G. S. A. B. (1998). Mechanisms of action of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41(3-4), 261–268. doi:10.1016/s0964-8305(98)00023-7
23. Dobrynin, D., Fridman, G., Mukhin, Y. V., Wynosky-Dolfi, M. A., Rieger, J., Rest, R. F., ... Fridman, A. (2010). Cold Plasma Inactivation of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* (Anthrax) Spores. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 38(8), 1878–1884. doi:10.1109/tps.2010.2041938



24. Ferreira, C., Pereira, A. M., Pereira, M. C., Melo, L. F., & Simoes, M. (2011). Physiological changes induced by the quaternary ammonium compound benzyltrimethylammonium chloride on *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(5), 1036–1043. doi:10.1093/jac/dkr028
25. Fridman, G., Shereshevsky, A., Jost, M. M., Brooks, A. D., Fridman, A., Gutsol, A., Friedman, G. (2007). Floating Electrode Dielectric Barrier Discharge Plasma in Air Promoting Apoptotic Behavior in Melanoma Skin Cancer Cell Lines. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 27(2), 163–176. doi:10.1007/s11090-007-9048-4
26. Gagnon, C., & Lajeunesse, A. (2012). Low removal of acidic and hydrophilic pharmaceutical products by various types of municipal wastewater treatment plants. *Journal of Xenobiotics*, 2(1), 3. doi:10.4081/xeno.2012.e3
27. Ghezzi, F., Grieve, R., Sanjinés, D., & Zheng, X. H... (2008). MODELO DE INTERACCIONES ELÉCTRICAS EN UN SISTEMA CONFINADO DE ESFERAS CARGADAS. *Revista Boliviana de Física*, 14(14), 50-57. Recuperado en 22 de octubre de 2021, de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1562-38232008000100004&lng=es&tlng=es.
28. Gillings, M. R., Xuejun, D., Hardwick, S. A., Holley, M. P., & Stokes, H. W. (2008). Gene cassettes encoding resistance to quaternary ammonium compounds: a role in the origin of clinical class 1 integrons? *The ISME Journal*, 3(2), 209–215. doi:10.1038/ismej.2008.98
29. Gnanadhas, D. P., Marathe, S. A., & Chakravorty, D. (2012). Biocides – resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 22(2), 191–206. doi:10.1517/13543784.2013.748035
30. Goldston, R. J., & Rutherford, P. H. (1995). *Introduction to plasma physics*. Bristol, UK: Institute of Physics Pub, 510 p.
31. Guo, L., Zhao, Y., Liu, D., Liu, Z., Chen, C., Xu, R., Kong, M. G. (2018). Cold atmospheric-pressure plasma induces DNA–protein crosslinks through protein oxidation. *Free Radical Research*, 52(7), 783–798. doi:10.1080/10715762.2018.1471476
32. Haas, C. N., & Morrison, E. C. (1981). Repeated exposure of *Escherichia coli* to free chlorine: Production of strains possessing altered sensitivity. *Water, Air, and Soil Pollution*, 16(2), 233–242. doi:10.1007/bf01046857
33. Hoff, J. C., & Akin, E. W. (1986). Microbial resistance to disinfectants: mechanisms and significance. *Environmental Health Perspectives*, 69, 7–13. doi:10.1289/ehp.86697
34. Hoffmann, C., Berganza, C., & Zhang, J. (2013). Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. *Medical Gas Research*, 3(1), 21. doi:10.1186/2045-9912-3-21
35. Hong, Y. F., Kang, J. G., Lee, H. Y., Uhm, H. S., Moon, E., & Park, Y. H. (2009). Sterilization effect of atmospheric plasma on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* endospores. *Letters in Applied Microbiology*, 48(1), 33–37. doi:10.1111/j.1472-765x.2008.02480.x
36. Indura Grupo Air Products. (2015). *Manual de Gases*. indura.net. <http://www.indura.net/content/storage/ec/biblioteca/115c34ca0e684d41b098c9fbbc861cac.pdf>
37. INFRA S.A. de C.V. (2006). *Manual de seguridad Infra*. http://www.infrasur.com.mx/uploads/manuales/gases/manual_seguridad/manualgases02.pdf.



38. Itooka, K., Takahashi, K., Kimata, Y., & Izawa, S. (2018). Cold atmospheric pressure plasma causes protein denaturation and endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(5), 2279–2288. doi:10.1007/s00253-018-8758-2
39. Kelly-Wintenberg, K., Hodge, A., Montie, T. C., Deleanu, L., Sherman, D., Reece Roth, J., Wadsworth, L. (1999). Use of a one atmosphere uniform glow discharge plasma to kill a broad spectrum of microorganisms. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 17(4), 1539–1544. doi:10.1116/1.581849
40. Khan, S., Beattie, T. K., & Knapp, C. W. (2016). Relationship between antibiotic- and disinfectant-resistance profiles in bacteria harvested from tap water. *Chemosphere*, 152, 132–141. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.02
41. Kim, M., Weigand, M. R., Oh, S., Hatt, J. K., Krishnan, R., Tezel, U., Konstantinidis, K. T. (2018). Widely Used Benzalkonium Chloride Disinfectants Can Promote Antibiotic Resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(17). doi:10.1128/aem.01201-18
42. Kim, S. J., Chung, T. H., Bae, S. H., & Leem, S. H. (2010). Induction of apoptosis in human breast cancer cells by a pulsed atmospheric pressure plasma jet. *Applied Physics Letters*, 97(2), 023702. doi:10.1063/1.3462293
43. Klämpfl, T. G., Isbary, G., Shimizu, T., Li, Y.-F., Zimmermann, J. L., Stolz, W., Schmidt, H.-U. (2012). Cold Atmospheric Air Plasma Sterilization against Spores and Other Microorganisms of Clinical Interest. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5077–5082. doi:10.1128/aem.00583-12
44. Klämpfl, T. G., Shimizu, T., Koch, S., Balden, M., Gemein, S., Li, Y.-F., Schmidt, H.-U. (2014). Decontamination of Nosocomial Bacteria Including *Clostridium difficile* Spores on Dry Inanimate Surface by Cold Atmospheric Plasma. *Plasma Processes and Polymers*, 11(10), 974–984. doi:10.1002/ppap.201400080
45. Klinger, C., Bauer, T., Mueller, R., & Dengler, B., (2018). Erfolgreiche Behandlung einer nekrotisierenden, multiresistenten bakteriellen Pyodermie bei einem Python mittels Kaltplasmatherapie. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere / Heimtiere*, 46(01), 43–48. doi:10.15654/tpk-170190
46. Köhler, A. T., Rodloff, A. C., Labahn, M., Reinhardt, M., Truyen, U., & Speck, S. (2018). Efficacy of sodium hypochlorite against multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Journal of Hospital Infection*. doi:10.1016/j.jhin.2018.07.017
47. Kumar, C. G., & Anand, S., (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1-2), 9–27. doi:10.1016/s0168-1605(98)00060-9
48. Laroussi, M., & Akan, T. (2007). Arc-Free Atmospheric Pressure Cold Plasma Jets: A Review. *Plasma Processes and Polymers*, 4(9), 777–788. doi:10.1002/ppap.200700066
49. Liao, X., Liu, D., Xiang, Q., Ahn, J., Chen, S., Ye, X., & Ding, T. (2017). Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review. *Food Control*, 75, 83–91. doi:10.1016/j.foodcont.2016.12.02
50. Lu, Q., Liu, D., Song, Y., Zhou, R., & Niu, J. (2014). Inactivation of the Tomato Pathogen *Cladosporium fulvum* by an Atmospheric-Pressure Cold Plasma Jet. *Plasma Processes and Polymers*, 11(11), 1028–1036. doi:10.1002/ppap.201400070
51. Mai-Prochnow, A., Clauson, M., Hong, J., & Murphy, A. B. (2016). Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep38610



52. MacDonald, R., Santa, M., & Brozel, V. S. (2000). The response of a bacterial biofilm community in a simulated industrial cooling water system to treatment with an anionic dispersant. *Journal of Applied Microbiology*, 89(2), 225–235. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.01099.x
53. Mc Carlie, S., Boucher, C. E., & Bragg, R. R. (2019). Molecular basis of bacterial disinfectant resistance. *Drug Resistance Updates*, 100672. doi:10.1016/j.drug.2019.100672
54. McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147–179. doi:10.1128/cmr.12.1.147
55. Mendis, D. A., Rosenberg, M., & Azam, F. (2000). A note on the possible electrostatic disruption of bacteria. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 28(4), 1304–1306. doi:10.1109/27.893321
56. Moreau, M., Orange, N., & Feuilleley, M. G. J. (2008). Non-thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination. *Biotechnology Advances*, 26(6), 610–617. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.08.001
57. Nie, Q., Cao, Z., Ren, C. S., Wang, D. Z., & Kong, M. G. (2009). A two-dimensional cold atmospheric plasma jet array for uniform treatment of large-area surfaces for plasma medicine. *New Journal of Physics*, 11(11), 115015. doi:10.1088/1367-2630/11/11/115015
58. Niedźwiedz I, Waśko A, Pawłat J, Polak-Berecka M. The State of Research on Antimicrobial Activity of Cold Plasma. *Pol J Microbiol*. 2019; 68(2):153-164. doi: 10.33073/pjm-2019-028.
59. Nikmaram, H., Rezaei Kanavi, M., Ghoranneviss, M., Balagholi, S., Ahmadi, H., Roshandel, D., & Amini, M. (2018). Cold atmospheric pressure plasma jet for the treatment of *Aspergillus keratitis*. *Clinical Plasma Medicine*, 9, 14–18. doi:10.1016/j.cpme.2017.12.075
60. Nishime, T. M. C., Borges, A. C., Koga-Ito, C. Y., Machida, M., Hein, L. R. O., & Kostov, K. G. (2017). Non-thermal atmospheric pressure plasma jet applied to inactivation of different microorganisms. *Surface and Coatings Technology*, 312, 19–24. doi:10.1016/j.surfcoat.2016.07.076
61. Olesiak, P., & Stępnia, L. (2012). Skuteczność wybranych związków dezynfekcyjnych wobec przetrwalników *Bacillus*. *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, 15, 41-50.
62. Pankaj, S. K., Bueno-Ferrer, C., Misra, N. N., Milosavljević, V., O'Donnell, C. P., Bourke, P., ... Cullen, P. J. (2014). Applications of cold plasma technology in food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 35(1), 5–17. doi:10.1016/j.tifs.2013.10.009
63. Patini, R., Mangino, G., Martellacci, L., Quaranta, G., Masucci, L., & Gallenzi, P. (2020). The Effect of Different Antibiotic Regimens on Bacterial Resistance: A Systematic Review. *Antibiotics*, 9(1), 22. doi:10.3390/antibiotics9010022
64. Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4). doi:10.1128/cmr.00088-17
65. Paulus, W. (Ed.). (2005). *Directory of microbicides for the protection of materials: a handbook*. Springer Science & Business Media. 787 p.
66. Payment, P. I. E. R. E., Trudel, M., & Plante, R. (1985). Elimination of viruses and indicator bacteria at each step of treatment during preparation of drinking water at seven water treatment plants. *Applied and environmental microbiology*, 49(6), 1418-1428. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.49.6.1418-1428.1985>
67. Perucca, M. (2010). Introduction to Plasma and Plasma Technology. *Plasma Technology for Hyperfunctional Surfaces*, 1–32. doi:10.1002/9783527630455.ch1



68. Rideal, S., & Ainslie Walker, J. T. (1903). Standardisation of Disinfectants. *Journal of the Sanitary Institute*, 24(3), 424–441. doi:10.1177/146642400302400320
69. Rose, J. B., Gerba, C. P., Singh, S. N., Toranzos, G. A., & Keswick, B. (1986). Isolating Viruses From Finished Water. *Journal - American Water Works Association*, 78(1), 56–61. doi:10.1002/j.1551-8833.1986.tb05679.x
70. Ryu, Y.-H., Kim, Y.-H., Lee, J.-Y., Shim, G.-B., Uhm, H.-S., Park, G., & Choi, E. H. (2013). Effects of Background Fluid on the Efficiency of Inactivating Yeast with Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma. *PLoS ONE*, 8(6), e66231. doi:10.1371/journal.pone.0066231
71. Sykes, R. B., Bonner, D. P., Bush, K., & Georgopadakou, N. H. (1982). Azthreonam (SQ 26,776), a synthetic monobactam specifically active against aerobic gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 21(1), 85–92. doi:10.1128/aac.21.1.85
72. Sharma, M., & Anand, S., (2002). Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. *Food Control*, 13(6-7), 469–477. doi:10.1016/s0956-7135(01)00068-8
73. Shi, X., & Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 407–413. doi:10.1016/j.tifs.2009.01.054
74. Simões, M., Pereira, M., & Vieira, M. (2005). Validation of respirometry as a short-term method to assess the efficacy of biocides. *Biofouling*, 21(1), 9–17. doi:10.1080/08927010500066982
75. Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 573–583. doi:10.1016/j.lwt.2009.12.008
76. Sohbatzadeh, F., Mirzanejhad, S., Shokri, H., & Nikpour, M. (2016). Inactivation of *Aspergillus flavus* spores in a sealed package by cold plasma streamers. *Journal of Theoretical and Applied Physics*, 10(2), 99–106. doi:10.1007/s40094-016-0206-z
77. Staack, D., Farouk, B., Gutsol, A., & Fridman, A. (2008). DC normal glow discharges in atmospheric pressure atomic and molecular gases. *Plasma Sources Science and Technology*, 17(2), 025013. doi:10.1088/0963-0252/17/2/025013
78. Stoffels, E., Sakiyama, Y., & Graves, D. B. (2008). Cold Atmospheric Plasma: Charged Species and Their Interactions With Cells and Tissues. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 36(4), 1441–1457. doi:10.1109/tps.2008.2001084
79. Suhem, K., Matan, N., Nisoa, M., & Matan, N. (2013). Inhibition of *Aspergillus flavus* on agar media and brown rice cereal bars using cold atmospheric plasma treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 161(2), 107–111. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.002
80. Templeton, M. R., Oddy, F., Leung, W., & Rogers, M. (2009). Chlorine and UV disinfection of ampicillin-resistant and trimethoprim-resistant *Escherichia coli*. A paper submitted to the *Journal of Environmental Engineering and Science*. *Canadian Journal of Civil Engineering*, 36(5), 889–894. doi:10.1139/l09-040
81. Teschke, M., Kedzierski, J., Finantu-Dinu, E. G., Korzec, D., & Engemann, J. (2005). High-speed photographs of a dielectric barrier atmospheric pressure plasma jet. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 33(2), 310–311. doi:10.1109/tps.2005.845377
82. Tonks, L., & Langmuir, I. (1929). A General Theory of the Plasma of an Arc. *Physical Review*, 34(6), 876–922. doi:10.1103/physrev.34.876



83. Tseng, S., Abramzon, N., Jackson, J. O., & Lin, W.-J. (2011). Gas discharge plasmas are effective in inactivating *Bacillus* and *Clostridium* spores. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(6), 2563–2570. doi:10.1007/s00253-011-3661-0
84. Wang, G., Zhang, P., Setlow, P., & Li, Y. (2011). Kinetics of Germination of Wet-Heat-Treated Individual Spores of *Bacillus* Species, Monitored by Raman Spectroscopy and Differential Interference Contrast Microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3368–3379. doi:10.1128/aem.00046-11
85. Wiktor, A., Sledz, M., Nowacka, M., & Witrowa-Rajchert, D. (2013). Możliwości zastosowania niskotemperaturowej plazmy w technologii żywności. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 20(5).
86. Ye, S., Song, X., Liang, J.-L., Zheng, S., & Lin, Y. (2012). Disinfection of airborne spores of *Penicillium expansum* in cold storage using continuous direct current corona discharge. *Biosystems Engineering*, 113(2), 112–119. doi:10.1016/j.biosystemseng.2012.06.013
87. Zhou, Q., Tang, M., Zhang, J., Zhang, X., Tang, X., Chen, D., & Gao, Y. (2017). Is the Potential Interconnection between Antibiotic Susceptibility and Disinfectant Resistance a Threat to Food Safety?. *Agricultural Science & Technology*, 18(6), 1033.