

METODO PARA INDUCIR LISIS OSMÓTICA EN PARÁSITOS Y MICROORGANISMOS PATÓGENOS CON SOLUCIÓN ELECTROLIZADA DE SUPEROXIDACIÓN DE PH NEUTRO

5

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con una metodología para inducir lisis osmótica en parásitos y otros microorganismos patógenos que involucra soluciones
10 electrolizadas de superoxidación con pH neutro, ricas en especies activas de cloro y oxígeno que se identifica como cloro libre disponible (CLD), con alto potencial oxidante y elevada capacidad de capturar electrones, por lo que se identifican como microbicidas efectivos por inducir lisis osmótica en microorganismos patógenos como los parásitos, sin que éstos puedan desarrollar un mecanismo de resistencia; adicionalmente se
15 presenta una metodología para descontaminar alimentos y/o bebidas contaminadas con microorganismos patógenos, especialmente con quistes, ooquistes y/o huevos de parásitos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20

Los microorganismos patógenos son agentes microscópicos responsables de causar enfermedades en organismos superiores. Entre ellos se encuentran los virus, bacterias, hongos y parásitos, los cuales pueden inducir desde una infección o malestar simple, hasta la muerte. Su composición estructural varía dependiendo de su grado de
25 complejidad.

Los virus son las estructuras más simples y pequeñas; están conformados principalmente de proteínas, material genético ADN o ARN y en algunos casos por lípidos. Su estructura externa se denomina cápside y se compone de proteínas denominadas capsómeros. Adicionalmente se pueden encontrar virus cuya cápside viral
30 está recubierta por una envoltura viral, compuesta por una bicapa lipídica y lipoproteínas.

Las bacterias se clasifican principalmente en gram positivas y gram negativas. Están revestidas de una membrana citoplasmática compuesta principalmente por fosfolípidos, proteínas, lipoproteínas, lipopolisacáridos y polímeros de polialcoholes.

- 5 Adicionalmente, las bacterias gram positivas incluyen una pared celular, que recubre a la membrana citoplasmática, compuesta por un peptidoglicano denominado mureína. Las bacterias gram negativas no tienen pared celular, aunque también contienen mureína en su espacio periplasmático, el cual divide a sus membranas interior y exterior. Algunas bacterias forman esporas en su fase vegetativa, la cual es disparada
- 10 en condiciones de estrés y diseñada para aumentar su supervivencia. Un componente importante en la esporulación de múltiples bacterias es el ácido dipicolínico. Las esporas están formadas por diversas capas, de las cuales, la más externa se denomina exosporio y está formada por glicoproteínas.

- Los hongos patógenos son estructuras mucho más complejas y evolucionadas
- 15 que las bacterias e incluyen a los mohos, levaduras e hifas. Su estructura es compleja y poco conocida aunque pertenezca a los eucariontes. Su envoltura está compuesta por cápsula, pared y membrana plasmática. Las cuales están principalmente formadas por polisacáridos, proteínas, enzimas, glucoproteínas, glucolípidos, esteroides y fosfolípidos.

- Los parásitos son organismos muy evolucionados y son particularmente
- 20 importantes los que se instalan en el sistema digestivo por ser los principales responsables de infecciones gastrointestinales, como los protozoos, helmintos y nemátodos. Por ejemplo giardia, entamoeba, cyclospora, cryptosporidium, trypanosoma, ascaris, trichuris, enterobius, trichinella, etc.

- En el caso particular de la Giardia, *Giardia duodenalis* (sinónimos: *Giardia*
- 25 *intestinalis*, *Giardia lamblia*) es el protozoario parásito causante de la giardiasis, una parasitosis de gran importancia epidemiológica desde el punto de vista clínico por su alta prevalencia en humanos, fundamentalmente entre la población infantil, así como en el ámbito veterinario ya que causa infección en animales de compañía (perros, gatos), domésticos (ganado) y silvestres. La giardiasis tiene una distribución mundial; cada año
- 30 se registran 280 millones de casos y hay cerca de 200 millones de personas con infecciones sintomáticas y en América Latina, se registran 500,000 nuevos casos por

año. Se puede desarrollar tanto de forma endémica en regiones en vías de desarrollo o de forma epidémica en regiones industrializadas. La infección se adquiere por la ingestión de la fase infectante del quiste que al ser eliminado en la materia fecal contamina agua y alimentos. El quiste es altamente infeccioso y se ha observado que 10 quistes maduros son capaces de originar una giardiosis sintomática. La transmisión es fundamentalmente fecal-oral directa, por contacto con personas o animales infectados por *Giardia* o por vía indirecta por el consumo de aguas o alimentos contaminados con quistes. Por lo tanto, la dispersión de este tipo de forma parasitaria es crucial en la diseminación de la enfermedad. Su principal composición externa son polisacáridos y en menor porcentaje, proteínas.

Otro tipo de parásitos que ocasionan graves problemas de salud pública son los nemátodos, especialmente los helmintos. De estos, *ascaris lumbricoides*, coloniza el intestino delgado de humanos y animales, ocasionando graves problemas de salud. La parasitosis se adquiere a partir de fuentes contaminadas con materia fecal que contenga huevos fecundados del parásito (transmisión fecal-oral) y una vez que se ha instalado en el huésped, representa una fuente de infección y diseminación de la enfermedad debido a que la producción diaria de huevos en las hembras llega hasta 200,000. El estado infectante de los huevos fecundados y expulsados en la materia fecal ocurre luego de 2 a 3 semanas de haber permanecido en suelo húmedo y cálido, lo que indica su enorme resistencia sobre múltiples condiciones ambientales. Esto se debe a su morfología; los huevos fecundados son ovalados y con cápsula gruesa formada por tres capas: vitelina o interna de naturaleza impermeable por ser lipóide, media conformada por glucógeno y externa albuminoidea recubierta por mamelones o mameloides.

Respecto a los microorganismos nocivos anteriormente descritos, adicionalmente se menciona que, además de su patogenicidad intrínseca, muchos secretan toxinas que son altamente nocivas para organismos superiores como plantas y animales, especialmente humanos y animales de crianza. Por lo tanto es indispensable encontrar alternativas que permitan erradicarlos sin darles oportunidad de desarrollar mecanismos de resistencia, bien conocidos actualmente para múltiples antibióticos, antivirales, antifúngicos y antiparasitarios.

Dentro de las sustancias empleadas para erradicar microorganismos se encuentran los microbiostáticos y los microbicidas; los primeros no producen la muerte al microbio aunque impiden su reproducción, lo que indirectamente lleva a su eliminación; los segundos inducen la muerte microbiana. Sus principales mecanismos de acción son, alteración de permeabilidad celular, mecanismos de respiración y nutrición, bloqueo o desregulación de actividad enzimática, inducción de coagulación de citoplasma o proteínas, desnaturalización de proteínas, alquilación de proteínas, alteración de los mecanismos de reproducción o división. En general todos estos los mecanismos, a excepción del primero, son susceptibles de ser contrarrestados por la inducción de resistencia en los patógenos, por lo que hasta la fecha, son muy pocas las sustancias que se consideran efectivos desinfectantes de alto nivel y que por consecuencia son también muy tóxicos para las células de organismos superiores. Como ejemplo se menciona el ozono y los compuestos peroxigenados como el ácido peracético y el peróxido de hidrógeno que producen oxidación de algunas estructuras microbianas internas y externas, el óxido de etileno que inhibe funciones enzimáticas y algunos aldehídos que principalmente producen alquilación y/o desnaturalización de proteínas.

Debido a lo anterior se puede afirmar que el mecanismo más efectivo para la eliminación de microorganismos patógenos sería la irrupción irreversible en las barreras que mantienen a dichos organismos como entidades aisladas de su entorno, ya que durante su proceso evolutivo las desarrollaron como principal defensa y mecanismo de supervivencia. Dichas barreras son: pared, membrana, cápsula, cápside, exosporio, capa, vesícula, envoltura o cubierta y, tal como se mencionó anteriormente, existen diversos tipos de compuestos estructurales que las conforman; por ejemplo, polisacáridos, disacáridos, monosacáridos, lipopolisacáridos, glucoproteínas, glucolípidos, anhídridos orgánicos, anhídridos ácidos, carbohidratos, lípidos, proteínas, fosfolípidos, peptidoglicanos, lipoproteínas, azúcares, mureína, nucleótidos, etc. Por lo tanto el mecanismo debería ser capaz de penetrar, disgregar, escindir o romper los enlaces químicos de todo este tipo de compuestos, que mantienen íntegras a las barreras externas de los patógenos.

El mecanismo conocido como lisis osmótica se basa en la alteración irreversible

u oxidación de las estructuras responsables de mantener la presión osmótica, por ejemplo, en entidades unicelulares. Para el caso de los microorganismos patógenos, las mencionadas barreras que los mantienen como entidades aisladas del entorno son también responsables de mantener su presión osmótica. Por lo tanto, en los

5 microorganismos patógenos, la lisis osmótica ocurriría si se expusieran a una sustancia capaz de depredar o secuestrar electrones de cualquiera de los compuestos estructurales que conforman a sus barreras externas, a modo de disgregarlas o escindir sus enlaces químicos, lo que llevaría a su muerte o eliminación. La situación ideal sería que la inducción de lisis osmótica sobre microorganismos patógenos fuera lo

10 suficientemente suave o segura como para ser considerada inocua sobre las células de los organismos superiores. Al respecto se menciona a las soluciones electrolizadas de superoxidación con pH neutro (SES) como candidatas ideales para dicho propósito.

Las soluciones electrolizadas de superoxidación se obtienen a partir de la electrólisis de disoluciones de salmuera con el objetivo de producir soluciones biocidas

15 con numerosos usos comerciales, desde esterilizar o desinfectar agua para beber y aparatos para preparación de alimentos, hasta sanitizar, esterilizar y desinfectar equipo médico. Estas soluciones a menudo son llamadas soluciones electroquímicamente activadas y su calidad germicida se debe a que presentan valores elevados de potencial de óxido-reducción (ORP) y concentración de especies activas de cloro y

20 oxígeno (CLD). Su pH, ORP, concentración de sales disueltas y CLD, varían según su aplicación, aunque en general, son germicidas efectivos contra una amplia gama de bacterias, hongos, virus, levaduras y esporas. Hoy en día se han podido desarrollar métodos y tecnología para producir soluciones electrolizadas de superoxidación de pH neutro (SES) con actividad antiséptica y desinfectante mejorada, puesto que inactivan

25 incluso, a ciertas variedades de parásitos; esto aunado a otras ventajas adicionales como: mayor caducidad, residualidad, inocuidad, muy baja o nula corrosividad (seguridad) y sustentabilidad (amigables con el ambiente).

Otro tipo de propiedades encontradas en las SES, sintetizadas a partir de los nuevos métodos y tecnología, son las de fungir como agente adyuvante en la

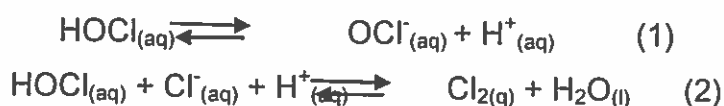
30 regeneración tisular, hemostático, anti-inflamatorio, anti-alérgico y analgésico.

En una celda electrolítica, la corriente puede ser pre-establecida con el fin de

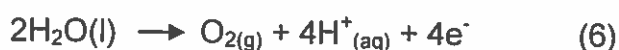
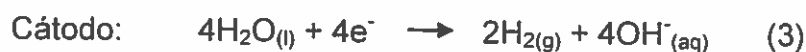
obtener SES que cumplan con las características anteriormente mencionadas. Sin embargo la elección de la corriente debe basarse no sólo en el tipo de celda utilizada, sino también el material de los electrodos y del equipo electrolítico en general, además en el tamaño de la celda y los electrodos, particularmente del ánodo. Una vez que se ha producido la solución electrolizada, debe ser ajustada y probada para todas las características esperadas y deseadas para corroborar su eficacia como antiséptico, sanitizante y desinfectante de alto nivel, aunado a ventajas adicionales como inocuidad, seguridad, residualidad, caducidad, sustentabilidad, adyuvante en la regeneración tisular, hemostático, anti-inflamatorio, anti-alérgico y analgésico.

El pH también es una variable importante en la inocuidad, biocompatibilidad y actividad microbica de las soluciones electrolizadas de superoxidación puesto que las especies que las conforman obedecen a equilibrios redox y ácido-base.

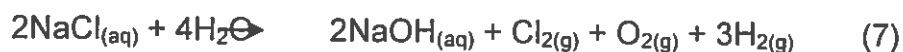
Las principales especies responsables de la actividad biocida son: HOCl, OCl⁻ y Cl_{2(g)}, las cuales varían su proporción, en las SES, en función del pH. Por ejemplo, a pH de 6.5, existe 95% de HOCl y 5% de OCl⁻, mientras que a pH de 7.5, dicha relación es 50/50. A pH de 7.0, 78% es HOCl y 22% es OCl⁻. Sólo a pH menor que 2.0 se empieza a general Cl_{2(g)} a partir de HOCl y OCl⁻. [Ecuaciones 1-2] Entre estas tres especies, el ácido hipocloroso (HOCl) tiene el mayor potencial oxidante y es el principal responsable de inducir bajo pH.



El proceso de electrólisis que da lugar a las soluciones electrolizadas de superoxidación involucra las siguientes reacciones:



Reacción Global:

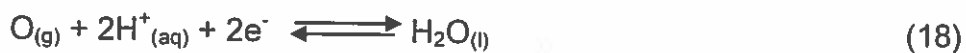
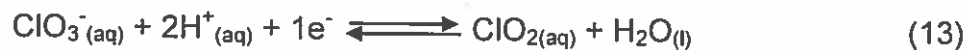


El cloro gaseoso liberado se disuelve en el medio acuoso y un porcentaje

reacciona produciendo ácido hipocloroso (HOCl), principal agente microbicida de la SES [Ecuación 2]. Dado que el HOCl se encuentra en medio acuoso, este se ioniza a su base conjugada, ión hipoclorito (OCl⁻), en una reacción de disociación reversible dependiente del pH y representada por la ecuación 1.

- 5 El pH final de la SES está entre 6.0-8.0 y su potencial de óxido-reducción (ORP) entre +200 y +1200 mV. Por lo tanto, aunadas a las reacciones químicas anteriormente descritas, también pueden desarrollarse otras que involucran al resto de las especies y sales totales disueltas.

10 Todas las especies formadas e intermedias participan de manera directa o indirecta en la concentración de cloro libre disponible (CLD) y por lo tanto en la efectividad de la SES, además de contribuir a su estabilidad, residualidad y caducidad. De la literatura en la materia, se sabe que las reacciones más representativas son:



25 Por lo tanto la cantidad de especies y sales totales disueltas, el ajuste meticuloso del pH y del potencial de óxido-reducción (ORP), es crucial para alcanzar los

parámetros de calidad deseados y especificados.

Es importante mencionar que como parte de los mecanismos de defensa de organismos superiores, las células fagocíticas de su sistema inmune producen especies reactivas de cloro y oxígeno, similares a las encontradas en las SES (como el HOCl) para eliminar infecciones. La reacción de formación del HOCl es catalizada por la enzima mieloperoxidasa, la cual reacciona con H_2O_2 formando un complejo enzima sustrato que oxida al ión cloruro (Cl^-) a HOCl. Todas las especies de cloro y oxígeno que produce el organismo, son oxidantes fuertes y eficientes contra microorganismos nocivos, sin embargo un desequilibrio entre su producción y la capacidad del sistema para detoxificarse desencadena efectos nocivos en células y tejidos sanos. Por lo tanto altas concentraciones de oxidantes fuertes, especialmente O_3 y HOCl, en la formulación de las soluciones electrolizadas de superoxidación, son dañinas para organismos superiores e incluso para materiales y superficies que son objeto de desinfección puesto que inducen daño por corrosión. Entonces debe existir un compromiso entre la concentración de sales totales disueltas, el CLD, ORP y pH, ya que un desequilibrio, principalmente entre la proporción $O_3/Cl_{2(g)}/HOCl/OCl^-$, podría comprometer la efectividad de las SES como antisépticos, sanitizantes y desinfectantes efectivos, e incluso inducir daño por corrosión, disminuir su inocuidad, caducidad, residualidad, seguridad y sustentabilidad. Esto último por la factibilidad de las SES con muy alto ORP, CLD y pH muy ácido, para formar especies tóxicas de cloro como los fulvenos clorados y las cloraminas al entrar en contacto con materia orgánica.

Por lo tanto una buena calidad en las soluciones electrolizadas de superoxidación, no sólo implica lograr el efecto germicida esperado y atribuido a valores muy altos de ORP y CLD, sino que dichos valores estén en intervalos óptimos para asegurar, además del efecto germicida, los demás beneficios anteriormente descritos.

La cantidad de cloro libre disponible de la SES debe estar en el intervalo de 1 a 49 ppm para conferirle propiedades bactericidas, virucidas, fungicidas y esporicidas, así como capacidad para inactivar a ciertos parásitos; esto aunado a inocuidad sobre estructuras de organismos superiores. El efecto microbicida se explica por el daño oxidante (lisis osmótica) que provoca, por ejemplo, sobre las estructuras o membranas externas (membrana, pared, cápside, exosporio, etc.) de todos los patógenos, aunque

se ha demostrado que una vez que ha ocurrido la lisis, también se afectan sus procesos de nutrición y respiración, la síntesis de algunas proteínas, el metabolismo celular, por ocurrencia de otros mecanismos oxidativos y líticos en su interior.

5 Evidencia científica corrobora que a dichas concentraciones, esta solución electrolizada de superoxidación no es tóxica cuando se aplica directamente sobre monocapas celulares de tejidos de mamíferos cultivadas *in vitro*, ni sobre las células de especies superiores luego de exposición cutánea, sobre mucosas, conjuntiva o membranas mesoteliales (pleura o peritoneo). Por el contrario, concentraciones superiores causan muerte celular inducida por lisis osmótica y apoptosis. Pruebas de
10 laboratorio demuestran una estabilidad para la SES de 18 meses a 2 años (vida útil) en condiciones adecuadas, que son: protegida de la luz y almacenada a temperatura ambiente. Sus propiedades físico-químicas permiten una producción, distribución y almacenamiento sin riesgos ni requisitos especiales, es decir que es efectiva, segura, inocua y sustentable.

15 Dadas las propiedades anteriormente descritas de la SES, se establece como un agente eficaz para erradicar parásitos y otros microorganismos patógenos, mediante mecanismos oxidantes o de lisis osmótica, lo cual es relevante porque elimina la posibilidad de que los microbios generen resistencia ante la SES.

20 Algunos documentos que conforman el estado de la técnica actual en el campo de aplicación de la presente invención, se citan a continuación:

El documento de patente de los Estados Unidos Mexicanos No. 319100 (Hojabr Alimi; 2014) describe el uso de soluciones de agua con potencial de oxidación-reducción como antisépticos y desinfectantes de superficies inanimadas. Describen
25 concentraciones desde 50 ppm hasta 200 ppm de especies de cloro libre, lo cual difiere de lo presentado en la presente solicitud, tanto en composición como en concentración, de 1 ppm a 48 ppm de especies activas de cloro y oxígeno. Tampoco hace referencia a erradicación de parásitos, ni refiere a sus soluciones como inductoras de lisis osmótica,
30 por lo que también difiere de lo presentado en esta invención.

El documento de patente de los Estados Unidos Mexicanos No. 317267 (Hojabr Alimi; 2014) describe el uso de soluciones de agua con potencial de oxidación-reducción para producir un medicamento para tratar una infección asociada con enfermedades periodontales. Sin embargo, describen concentraciones desde 50 ppm hasta 80 ppm de especies de cloro libre, lo cual difiere de lo presentado en la presente solicitud, tanto en concentración (1 ppm a 48 ppm) como en composición (especies activas de cloro y oxígeno). Además reclaman el uso de sus soluciones únicamente en colutorios y como medicamento *per se*. Tampoco hace referencia a erradicación de parásitos, ni refiere a sus soluciones como inductoras de lisis osmótica, por lo que también difiere de lo presentado en esta invención.

La solicitud de patente internacional N° 2007070861 A1 (Allen, R.C., Woodhead, S., Becquerelle, S.; 2007) detalla una formulación y un método para eliminar microorganismos patógenos, entre ellos parásitos, utilizando una mezcla de hipoclorito y peróxidos, lo que difiere a lo presentado con esta invención, adicional a que no los refiere como inductores de lisis osmótica.

La solicitud de patente de los Estados Unidos N° 20150080327 A1 (Paul, D.J., Gould, H.J; 2015) describe un método para matar células mediante lisis osmótica, aunque se refiere sólo a células cancerosas y utilizando un método combinado de fármacos y descargas eléctricas. Por lo tanto difiere totalmente de lo reclamado en el presente documento.

OBJETOS DE LA INVENCION

25

La presente invención tiene como objeto proveer una metodología para inducir lisis osmótica en microorganismos patógenos, dañando sus estructuras, capas o envolturas externas, como son membranas, paredes, cápsides, cápsulas, envolturas, exosporios, etc; dicha metodología incluye una solución electrolizada de superoxidación rica en especies activas de cloro y oxígeno (CLD), alto ORP, amigable con el ambiente y estable e inocua para organismos superiores.

30

La presente invención también tiene como objeto proveer una solución electrolizada de superoxidación rica en especies de CLD, alto ORP, amigable con el ambiente, estable e inocua para organismos superiores, que provoca daño oxidante, inicialmente depredando electrones de compuestos estructurales tipo disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, carbohidratos, lípidos, proteínas, peptidoglicanos, lipoproteínas, lipopolisacáridos, glicoproteínas, fosfolípidos, glucolípidos, glucoproteínas, polímeros de polialcoholes, polisacáridos ácidos, anhídridos ácidos, nucleótidos, azúcares, mureína, ácidos orgánicos, etc., presentes en las capas o envolturas externas de microorganismos patógenos.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una solución electrolizada de superoxidación que es útil en la eliminación de parásitos, tanto en su forma infectiva como invasiva.

Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar una metodología para eliminar microorganismos patógenos, especialmente parásitos, presentes en el agua o alimentos, utilizando la solución electrolizada de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una metodología para inducir lisis osmótica sobre microorganismos patógenos, dañando sus estructuras, capas o envolturas externas, como son membranas, paredes, cápsides, cápsulas, envolturas, exosporios, etc., causando daño oxidante al secuestrar electrones inicialmente de uno o más de sus compuestos estructurales tipo disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, lipopolisacáridos, glucoproteínas, glucolípidos, polisacáridos ácidos, anhídridos orgánicos, polímeros de polialcoholes, ácidos orgánicos, anhídridos ácidos, carbohidratos, lípidos, proteínas, glicoproteínas, fosfolípidos, peptidoglicanos, lipoproteínas, nucleótidos, azúcares, mureína, etc., utilizando una solución electrolizada de superoxidación con pH neutro, que es inocua para tejidos de organismos superiores,

rica en especies de cloro y oxígeno activo, alto ORP, estable y amigable con el ambiente.

La presente invención también se refiere a una solución electrolizada de superoxidación con pH neutro, que es inocua para tejidos de organismos superiores, rica en especies de cloro y oxígeno activo, alto ORP, estable y amigable con el ambiente que es un efectivo parasitocida.

La presente invención también alude a una metodología que incluye el uso de la solución electrolizada de la presente invención para la eliminación de un 50% a un 99.999% de microbios patógenos, principalmente parásitos, presentes en agua y alimentos de consumo humano o animal, o para ser utilizados en la industria agroalimentaria.

El pH de dicha solución se encuentra entre 6.5 a 7.5, su ORP entre 750 a 980 mV y su concentración de especies activas de cloro y oxígeno (CLD) entre 1-110 ppm o entre 1-49 ppm; dichos valores garantizan su efectividad como agente oxidante, depredador de electrones e inductor de lisis osmótica sobre microorganismos patógenos, especialmente parásitos. Dado que hasta el momento no se ha descrito algún mecanismo de resistencia contra la lisis osmótica, la metodología de la presente invención que involucra el uso de soluciones electrolizadas de superoxidación, se establece como eficaz en el campo de la asepsia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1A) es una fotografía del efecto citotóxico sobre células mesenquimales para Blanco, sin exposición, obtenidas de pulpa dental humana, luego de exponerlas durante 30 ó 60 segundos a los antisépticos: solución al 0.12% de clorhexidina o solución electrolizada de superoxidación con pH neutro.

La figura 1B) es una fotografía del efecto citotóxico sobre células mesenquimales

para células expuestas a la solución electrolizada de superoxidación durante 30 segundos.

La figura 1C) es una fotografía del efecto citotóxico sobre células mesenquimales para Células expuestas a la solución electrolizada de superoxidación durante 60 segundos.

La figura 1D) es una fotografía del efecto citotóxico sobre células mesenquimales para Células expuestas a solución al 0.12% de clorhexidina durante 30 segundos.

La figura 1E) es una fotografía del efecto citotóxico sobre células mesenquimales para Células expuestas a solución al 0.12% de clorhexidina durante 60 segundos.

La figura 2 es un gráfico que muestra el efecto citotóxico sobre células mesenquimales, obtenidas de pulpa dental humana, luego de exponerlas durante 30 ó 60 segundos a los antisépticos: solución al 0.12% de clorhexidina o solución electrolizada de superoxidación sin diluir.

La figura 3A) es una micrografía que muestra el efecto citotóxico sobre monocapa de células MDCK, luego de ser expuestas a una solución electrolizada de superoxidación de pH neutro con CLD de 50 ppm, y tratadas con azul de tripano.

La figura 3B) es una micrografía que muestra el efecto citotóxico sobre monocapa de células MDCK, luego de ser expuestas a una solución electrolizada de superoxidación de pH neutro con CLD menor a 60 ppm, y tratadas con azul de tripano.

La figura 3C) es una micrografía que muestra el efecto citotóxico (rojo) y apoptótico (verde) sobre monocapa de células MDCK, luego de ser expuestas a una solución electrolizada de superoxidación con pH neutro con CLD de 60 ppm, y tratadas con el kit de tinción de Anexina V.

La figura 4C) es una micrografía que muestra el efecto citotóxico (rojo) no

apoptótico sobre monocapa de células MDCK, luego de ser expuestas a una solución acuosa de NaOCl, con pH neutro y CLD de 60 ppm, y tratadas con el kit de tinción de Anexina V.

5 La figura 4 es una gráfica que muestra la efectividad germicida de soluciones electrolizadas de superoxidación de pH neutro y con diferentes concentraciones de CLD, frente a *E. coli* y *S. aureus*, a través del tiempo.

10 La figura 5A) es una micrografía de quistes de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, teñidos con FDA/IP.

La figura 5B) es una micrografía de quistes de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, teñidos con FDA/IP.

15 La figura 6A) es una micrografía de quistes de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, tratados con 0.106 mM (60 ppm) de SES y teñidos con FDA/IP.

La figura 6B) es una micrografía de quistes de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, tratados con 0.007 mM (3.7 ppm) de SES y teñidos con FDA/IP.

20

La figura 7A) es una micrografía de quistes de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, tratados con 0.106 mM (60 ppm) de NaOCl_(aq) y teñidos con FDA/IP.

25 La figura 7B) es una micrografía de quistes de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, tratados con 0.007 mM (3.7 ppm) de NaOCl_(aq) y teñidos con FDA/IP.

30 La figura 8A) es una micrografía de quistes de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, tratados con 0.106 mM (60 ppm) de SES y teñidos con FDA/IP.

La figura 8B) es una micrografía de quistes de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, tratados con 0.007 mM (3.7 ppm) de SES y teñidos con FDA/IP.

La figura 9A) es una micrografía de quistes de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, tratados con 0.106 mM (60 ppm) de NaOCl_(aq) y teñidos con FDA/IP.

La figura 9B) es una micrografía de quistes de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, tratados con 0.007 mM (3.7 ppm) de NaOCl_(aq) y teñidos con FDA/IP.

La figura 10A) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, teñidos y sin teñir con FDA/IP y determinada por citometría de flujo.

La figura 10B) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, teñidos y sin teñir con FDA/IP y determinada por citometría de flujo.

La figura 11A) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, tratados con 0.106 mM (60 ppm) de SES y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

La figura 11B) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, tratados con 0.055 mM (30 ppm) de SES y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

La figura 11C) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, tratados con 0.028 mM (15 ppm) de SES y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

La figura 12A) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa

WB, sensible a albendazol, tratados con 0.106 mM (60 ppm) de $\text{NaOCl}_{(\text{aq})}$ y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

La figura 12B) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, tratados con 0.055 mM (30 ppm) de $\text{NaOCl}_{(\text{aq})}$ y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

La figura 12C) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, tratados con 0.028 mM (15 ppm) de $\text{NaOCl}_{(\text{aq})}$ y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

La figura 13A) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, tratados con 0.106 mM (60 ppm) de SES y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

La figura 13B) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, tratados con 0.055 mM (30 ppm) de SES y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

La figura 13C) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, tratados con 0.028 mM (15 ppm) de SES y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

La figura 14A) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, tratados con 0.106 mM (60 ppm) de $\text{NaOCl}_{(\text{aq})}$ y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

La figura 14B) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, tratados con 0.055 mM (30 ppm) de $\text{NaOCl}_{(\text{aq})}$ y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

La figura 14C) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, tratados con 0.028 mM (15 ppm) de NaOCl_(aq) y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

5 La figura 15A) es una micrografía, por contraste de fases, de quistes de pacientes infectados con *G. duodenalis* tratados con agua bidestilada y sometidos a desenquistamiento *in vitro*.

10 La figura 15B) es una micrografía, por contraste de fases, de quistes de pacientes infectados con *G. duodenalis* tratados con 0.106 mM (60 ppm) de SES y sometidos a desenquistamiento *in vitro*.

15 La figura 15C) es una micrografía, por contraste de fases, de quistes de pacientes infectados con *G. duodenalis* tratados con 0.007 mM (3.7 ppm) de SES y sometidos a desenquistamiento *in vitro*.

La figura 16A) es una micrografía, de microscopía electrónica de barrido, de quistes de pacientes infectados con *G. duodenalis* tratados con agua bidestilada.

20 La figura 16B) es una micrografía, de microscopía electrónica de barrido, de quistes de pacientes infectados con *G. duodenalis* tratados con 0.106 mM (60 ppm) de SES.

25 La figura 16C) es una micrografía, de microscopía electrónica de barrido, de quistes de pacientes infectados con *G. duodenalis* tratados con 0.028 mM (15 ppm) de SES.

30 La figura 16D) es una micrografía, de microscopía electrónica de barrido, de quistes de pacientes infectados con *G. duodenalis* tratados con 0.007 mM (3.7 ppm) de SES.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El potencial oxidante de una sustancia se define como su capacidad para
 5 secuestrar electrones, en este caso particular nos referimos a la sustracción de
 electrones de enlaces químicos de compuestos estructurales como son disacáridos,
 oligosacáridos, polisacáridos, lipopolisacáridos, glucoproteínas, glucolípidos,
 polisacáridos ácidos, anhídridos orgánicos, polímeros de polialcoholes, ácidos
 orgánicos, anhídridos ácidos, carbohidratos, lípidos, proteínas, glicoproteínas,
 10 fosfolípidos, peptidoglicanos, lipoproteínas, nucleótidos, azúcares, mureína, etc.,
 encontrados en las estructuras, capas o envolturas externas de microorganismos
 patógenos, ya sean membranas, paredes, cápsides, cápsulas, envolturas, exosporios,
 vesículas, etc.

Ya que hasta el momento no se ha registrado que los microbios patógenos
 15 puedan desarrollar resistencia a la lisis osmótica, de haber una metodología para
 provocar este tipo de daño en dichos microorganismos sin representar un riesgo para
 las células de organismos superiores como los mamíferos, se colocaría como efectiva y
 sin precedentes en el ámbito de la antisepsia y desinfección. Por ejemplo, la
 metodología podría consistir en exponer a los microorganismos patógenos a una
 20 sustancia que posea alto potencial oxidante, como a una solución electrolizada de
 superoxidación.

En las soluciones electrolizadas de superoxidación, tanto el contenido como la
 naturaleza del CLD (especies activas de cloro y oxígeno) como su ORP (potencial de
 25 óxido-reducción), son indicadores importantes de su eficacia biocida, bioseguridad,
 inocuidad y de sus propiedades adicionales como agente hemostático, coadyuvante de
 regeneración tisular, analgésico, anti-alérgico y anti-inflamatorio. El CLD involucra
 especies activas de cloro y oxígeno, siendo las más abundantes el HOCl (ácido
 hipocloroso), OCl^- (anión hipoclorito) y $\text{Cl}_{2(g)}$ (cloro gaseoso disuelto), aunque también
 30 se detectan ClO_2 (dióxido de cloro), OCl_2^- (anión clorito), OCl_3^- (anión clorato), OCl_4^-
 (anión perclorato), Cl^- (anión cloruro), O_3 (ozono), $\text{O}_{2(g)}$ (oxígeno gaseoso disuelto), $\text{H}_{2(g)}$

(hidrógeno gaseoso disuelto), entre otros. Todos contribuyen como indicadores directos del CLD o como reservorio de éstos. El ORP, definido como la tendencia de una especie química (en este caso de la solución electrolizada) a capturar o donar electrones del medio, es una medida relativa (a un electrodo de referencia) de la capacidad oxidante o reductora de una sustancia. Mientras más alto y negativo sea el valor, la sustancia será un agente reductor y anti-oxidante más eficiente, mientras que a valores más altos y positivos, será un oxidante más poderoso y por ende un germicida efectivo. Por ejemplo, valores de ORP entre +650 y +890 mV son potenciales de desinfección eficaces para virus, hongos como *Aspergillus* y *Candida albicans*, algunos parásitos, así como para enterobacterias, bacilos y bacterias gram positivas y gram negativas, por ejemplo *E. coli*, *Salmonella spp*, *Listeria monocitogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella no typhi*, *Pasteurella multocida*, *Brucella sp.*, bacterias anaerobias, enterobacterias, *Bartonella henselae*, *Mycobacterium avium complex*, *Aspergillus*, *Candida albicans*. *Candida spp.*, bacilos gram negativos y *H. influenzae* y parásitos como *giardia lamblia*, *entamoeba histolytica*, *cryptosporidium parvum*, entre otros.

Como ya se mencionó, las principales especies responsables de la actividad biocida, dada su abundancia, son: HOCl , OCl^- y $\text{Cl}_{2(g)}$, las cuales varían su proporción, en las SES, en función del pH [Ecuaciones 1-2 *vide supra*]. Entre estas tres especies, el ácido hipocloroso (HOCl) tiene el mayor potencial oxidante y es el principal responsable de inducir bajo pH.

Avances recientes en la producción y síntesis electrolítica de soluciones electrolizadas de superoxidación, establecen que utilizando baja concentración del electrolito (por ejemplo 10 g/L de NaCl) y alta intensidad de corriente (medida de la corriente por unidad de área superficial del ánodo en contacto con el electrolito) se obtienen mejores resultados en cuanto a la concentración de especies activas, potencial de óxido reducción y caducidad. Además, un meticuloso cuidado en la fijación del pH, ofrece mayores ventajas sobre capacidad microbicida sin efectos tóxicos o dañinos para organismos superiores, superficies inanimadas y/o medio ambiente

(inocuidad, seguridad y sustentabilidad).

En particular, nos referimos a una solución electrolizada de superoxidación con concentración de especies activas de cloro y oxígeno (CLD) de entre 1 ppm a 110 ppm (preferentemente de entre 1 a 49 ppm), potencial de óxido-reducción (ORP) de entre 5 650 a 1000mV (preferentemente de entre 750 mV a 980 mV), así como pH en el intervalo de 6.5 a 7.5. Estos valores le confieren propiedades bactericidas, virucidas, fungicidas y esporicidas, así como capacidad para inactivar a ciertos parásitos; esto aunado a biocompatibilidad e inocuidad sobre estructuras de organismos superiores, así como propiedades adicionales como adyuvante de regeneración tisular, 10 hemostático, analgésico, anti-inflamatorio y anti-alérgico. Por lo tanto, dicha solución es útil como irrigante durante procedimientos médicos y/o quirúrgicos que lo requieran, como lo son procedimientos médicos ambulatorios o procedimientos quirúrgicos mayores.

15 La solución electrolizada con pH neutro de la presente invención también es útil para eliminar microorganismos nocivos y sus derivados, como las toxinas, presentes en alimentos y agua contaminados; ya sean para consumo humano, animal o para utilizarse en la industria agroalimentaria.

20 En particular la solución electrolizada que puede ser utilizada en la metodología de la presente invención es útil para erradicar parásitos, tanto en su fase invasiva como infectiva; por ejemplo, giardia, entamoeba, cyclospora, cryptosporidium, trypanosoma, ascaris, trichuris, enterobius, trichinella; así como sus quistes, ooquistes o huevos.

25 En una modalidad preferida, la solución electrolizada de superoxidación con pH neutro utilizada para erradicar microorganismos patógenos por lisis osmótica, especialmente como parasiticida, presenta pH entre 6.7 a 7.2, ORP entre 790 a 980 mV y de 1 a 60 ppm de especies activas de cloro y oxígeno; dichos valores garantizan su efectividad como agente oxidante, depredador de electrones e inductor de lisis osmótica 30 sobre microorganismos patógenos, especialmente parásitos, evitando que éstos desarrollen un mecanismo de resistencia.

La presente invención también alude a una metodología que incluye el uso de la solución electrolizada de la presente invención para la eliminación de un 50% a un 99.999% de microbios patógenos, principalmente parásitos, presentes en agua y alimentos de consumo humano, animal o para ser utilizados en la industria agroalimentaria.

La metodología consiste en poner en contacto agua o alimentos contaminados con microorganismos patógenos como virus, bacterias, hongos, esporas, levaduras, mohos y/o parásitos, especialmente con huevos, quistes y/u ooquistes de parásitos, con una cantidad efectiva de solución electrolizada de superoxidación de pH neutro. La cantidad efectiva se define como la cantidad necesaria y suficiente para inducir erradicación del agente patógeno y/o su actividad patógena, incluida la actividad resultante de alguna toxina secretada por el mismo; un experto en el arte podrá reconocer dicha cantidad. Por ejemplo, la solución electrolizada de superoxidación con pH neutro puede utilizarse sin diluir directamente sobre el alimento a descontaminar, o podría añadirse a una cantidad conocida de agua ya sea para desinfectarla o para utilizarla como desinfectante en dilución a algún alimento. Los alimentos y agua a tratar pueden ser para consumo humano, animal o para utilizarse solos o como materias primas en la industria agroalimentaria. Luego de aplicar la SES al alimento o bebida, no necesita retirarse o enjuagarse y su consumo es seguro.

En una modalidad preferida, la metodología para descontaminar alimentos o bebidas contaminadas con microorganismos patógenos, especialmente virus, bacterias, esporas, levaduras, hongos, hifas y mohos, consiste en aplicar solución electrolizada de superoxidación de pH neutro con CDL entre 3 y 100 ppm, ORP entre 790 y 850 mV y pH entre 6.8-7.2, durante 0.5 a 30 minutos, al alimento o bebida contaminados. La SES aplicada no necesita retirarse o enjuagarse y es seguro consumir el alimento o bebida tratados; además las propiedades organolépticas del alimento o bebida tratada no se deterioran. Ejemplos ilustrativos más no limitativos de formas de aplicar la SES a los alimentos o bebidas contaminadas o potencialmente contaminadas son: dilución, aspersión, rocío, inmersión, goteo, nebulización, etc.

En otra modalidad preferida, la metodología para descontaminar alimentos o bebidas contaminadas con parásitos, especialmente quistes y ooquistes de protozoos

y/o huevos o larvas de helmintos o nemátodos, consiste en aplicar solución electrolizada de superoxidación de pH neutro con CDL entre 3 y 60 ppm, ORP entre 790 y 850 mV y pH entre 6.8-7.2, durante 0.5 a 30 minutos, al alimento o bebida contaminados. La SES aplicada no necesita retirarse o enjuagarse y es seguro
5 consumir el alimento o bebida tratados; además las propiedades organolépticas del alimento o bebida tratada no se deterioran. Ejemplos ilustrativos más no limitativos de formas de aplicar la SES a los alimentos o bebidas contaminadas o potencialmente contaminadas son: dilución, aspersión, rocío, inmersión, goteo, nebulización, etc.

10 La solución electrolizada de superoxidación de la presente invención puede ser producida mediante métodos conocidos. Un ejemplo de preparación de la solución electrolizada de superoxidación es el descrito en la patente Mexicana No. 330845 que comprende las etapas de:

a) Preparar una solución electrolito de NaCl de entre 600 a 2000 ppm mezclando
15 agua purificada con una solución al 15% de NaCl;

b) bombear la solución electrolito hacia el lado aniónico y catiónico de una celda electrolítica, en donde dichos lados están separados por una membrana de intercambio iónico que a su vez está en contacto con una membrana neutra y ambas membranas son rodeadas por una malla, a una presión de entre 80 y 120 psi; y un flujo de entre 9 a
20 15 L/min;

c) aplicar una corriente de 400 amperes y un voltaje de entre 16 a 20 volts;

d) ajustar el pH neutro y ORP de la solución electrolizada de superoxidación, entre 200 y 1200 mV;

c) conducir la solución electrolizada de superoxidación a un tanque de
25 almacenamiento.

Dadas las propiedades anteriormente descritas de las soluciones electrolizadas de superoxidación se establecen como agentes parasitocidas y microbicidas eficientes por inducir su efecto por daño oxidante tipo lisis osmótica y para el que los
30 microorganismos patógenos no pueden o hasta el momento no han podido desarrollar resistencia.

La seguridad, inocuidad, biocompatibilidad, estabilidad, efectividad germicida, parasitocida y de inducción de lisis osmótica se discuten en los siguientes ejemplos:

Ejemplos de seguridad, inocuidad, biocompatibilidad, estabilidad, efectividad como germicida y para inviabilizar parásitos:

1) Seguridad, Inocuidad y Biocompatibilidad

Se llevaron a cabo experimentos para evaluar la citotoxicidad de la SES, luego de 30 ó 60 segundos de exposición, sobre células mesenquimales de pulpa dental humana (ATCC Hs68) y se compararon contra una solución de digluconato de clorhexidina al 0.12%. Se colocaron 50,000 células por pozo y se adicionó el agente antiséptico en conjunto con medio de cultivo. Se incubaron durante 24 horas y posteriormente se realizaron lavados y cambio de medio fresco a modo de eliminar el antiséptico. Para realizar el análisis morfológico se utilizó PBS mezclado con un inductor de auto-fluorescencia y formalina al 4% como fijador. Luego de 10 minutos de exposición, las células se lavaron con PBS para eliminar los restos del inductor. Las láminas se montaron en fluoroshield y se analizaron por microscopía confocal utilizando un microscopio Zeiss LSM 710 con luz de LASER lineal a 360 nm (excitación DAPI) y 514 nm (excitación auto-fluorescente del citoplasma inducida por el fijador). Tanto las muestras con tratamiento como los blancos (sin tratamiento) fueron adquiridos en las mismas condiciones.

Las **figuras 1A) a 1E)** muestran fotografías del efecto citotóxico sobre células mesenquimales, obtenidas de pulpa dental humana, luego de la experimentación antes descrita, donde:

La **Figura 1A)** es una fotografía para un blanco, sin exposición.

La **Figura 1B)** es una fotografía para células expuestas a SES durante 30 segundos.

La **Figura 1C)** es una fotografía para células expuestas a SES durante 60 segundos.

La **Figura 1D)** es una fotografía para células expuestas a solución al 0.12% de clorhexidina durante 30 segundos.

La **Figura 1E)** es una fotografía para células expuestas a solución al 0.12% de clorhexidina durante 60 segundos.

Se observaron diferencias significativas en la toxicidad de la clorhexidina vs la SES, siendo ésta mucho mayor para la clorhexidina, tal como se muestra en las viabilidades expuestas en la **Figura 2** que es un gráfico que demuestra el efecto citotóxico sobre células mesenquimales, obtenidas de pulpa dental humana, luego de exponerlas durante 30 ó 60 segundos a los antisépticos: solución al 0.12% de clorhexidina o SES.

En un ensayo independiente, se evaluó la citotoxicidad de soluciones electrolizadas de superoxidación con pH neutro a concentración mayor (55, 60 y 70 ppm) y menor a 50 ppm (48, 30, 15, 7.5 y 3.75 ppm) de CLD, sobre monocapas de células MDCK teñidas con azul de tripano. Se utilizaron microplacas confluentes de la línea celular MDCK las cuales se expusieron, previo lavado con DMEM (baja glucosa), a SES con concentración mayor o menor que 50 ppm de CLD. Se incubaron durante 30 minutos a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, se lavaron dos veces con el medio de cultivo, se tiñeron con azul de tripano (0.4% en PBS) durante un minuto y se lavaron 2 veces con el mismo medio. Finalmente se fijaron con formalina al 10% en PBS y se montaron con VECTASHIELD® en porta-objetos para ser analizadas por microscopía confocal y/o de contraste de fases. Adicionalmente, para el caso de concentraciones que resultaron tóxicas, también se realizó el estudio comparativo con NaOCl, tiñendo las células con Anexina V-FITC/IP para observar por microscopía confocal la naturaleza del daño.

La **Figura 3A)** es una micrografía de la monocapa de células MDCK expuestas a

una SES con concentración mayor a 50 ppm de CLD y teñidas con azul de tripano.

La **Figura 3B)** es una micrografía de la monocapa de células MDCK expuestas a una SES con concentración menor a 60 ppm de CLD y teñidas con azul de tripano.

La **Figura 3C)** es una micrografía de la monocapa de células MDCK expuestas a una SES con concentración de 60 ppm de CLD y teñidas con Anexina V-FITC/IP.

La **Figura 3D)** es una micrografía de la monocapa de células MDCK expuestas a $\text{NaOCl}_{(\text{aq})}$ con concentración de 60 ppm de CLD y teñidas con Anexina V-FITC/IP.

Se concluye que la SES es inocua y biocompatible cuando se aplica a concentraciones menores a 50 ppm y que la naturaleza de su daño potencial es apoptótico, a diferencia del $\text{NaOCl}_{(\text{aq})}$ que es necrótico. Esto es muy importante pues, derivado del proceso necrótico observado en tratamientos con $\text{NaOCl}_{(\text{aq})}$, se genera detritus que puede fungir como agente alérgeno y pirógeno en el hospedero.

2) Estabilidad y efectividad como germicida.

La SES descrita en la presente invención, a diferentes concentraciones, muestra estabilidad a largo plazo, tal como se expone en la **Figura 4**, dónde se aprecian sus comportamientos como germicidas frente a *E. coli* y *S. aureus*, de acuerdo a lo establecido en la norma mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999.

3) Efectividad para inviabilizar quistes y trofozoítos de protozoarios parásitos como giardia duodenalis, sensibles y resistentes a albendazol.

Las figuras 5 a 9 muestran microfotografías de quistes de *G. duodenalis*, sensibles y resistentes a albendazol, tratados con SES o $\text{NaOCl}_{(\text{aq})}$, 0.106 mM y 0.007 mM, y teñidos con FDA/IP para determinar su viabilidad en función de la integridad de su membrana externa.

Los quistes fueron obtenidos por exposición de trofozoítos a medio de cultivo TYI-S-33 conteniendo 5 mg bilis bovina/mL a pH 7.8 seguido de choque hipotónico. Posteriormente a su purificación, los quistes fueron tratados con SES o solución de NaOCl y teñidos con FDA/IP para evaluar su viabilidad (FDA+) o muerte (IP+). Finalmente las células se re-suspendieron en 100 μL de PBS y se analizaron con

microscopía óptica acoplada a sistema de epifluorescencia. Se muestran las imágenes de quistes sensibles [Figuras 5-7] y resistentes [Figuras 5, 8 y 9] a albendazol tratados con 0 mM (blanco; 0 ppm) [Figura 5A], 0.106 mM (60 ppm) [Figuras 6A y 8A] y 0.007 mM (3.7 ppm) [Figuras 6B y 8B] de SES; así como los tratamientos con 0 mM (blanco; 0 ppm) [Figura 5B], 0.106 mM (60 ppm) [Figuras 7A y 9A] y 0.007 mM (3.7 ppm) [Figura 7B y 9B] de NaOCl.

Los resultados de conteo microscópico permitieron establecer la superioridad de la SES sobre del NaOCl, a concentración y pH equivalentes, puesto que para la dilución más baja (0.007 mM) la solución de hipoclorito no fue capaz de matar a todos los quistes resistentes a ABZ [Figura 9B] mientras que la SES si lo hizo [Figura 8B]. En función del número de quistes dañados y sin dañar en la muestra, se determinó una eficacia del 30% para la solución acuosa de NaOCl. Se sabe que las soluciones a base de NaOCl, son muy alcalinas ($\text{pH} > 12$) y que su dilución con agua corriente no permite alcanzar pH cercanos a la neutralidad con concentración de cloro libre adecuada para realizar óptima eliminación de quistes de *G. lamblia* y/u otros parásitos. Por lo tanto, la ventaja de la SES con pH neutro es clara ya que, incluso a diluciones altas (6.25%), conserva el pH y concentración de especies activas de cloro y oxígeno, necesarios para matar quistes del parásito en tiempos de contacto desde 5 minutos.

La Figura 5A) es una micrografía de quistes de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, teñidos con FDA/IP.

La Figura 5B) es una micrografía de quistes de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, teñidos con FDA/IP.

La Figura 6A) es una micrografía de quistes de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, tratados con 0.106 mM (60 ppm) de SES y teñidos con FDA/IP.

La Figura 6B) es una micrografía de quistes de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, tratados con 0.007 mM (3.7 ppm) de SES y teñidos con FDA/IP.

La Figura 7A) es una micrografía de quistes de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, tratados con 0.106 mM (60 ppm) de $\text{NaOCl}_{(\text{aq})}$ y teñidos con FDA/IP.

La Figura 7B) es una micrografía de quistes de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, tratados con 0.007 mM (3.7 ppm) de $\text{NaOCl}_{(\text{aq})}$ y teñidos con

FDA/IP.

La **Figura 8A)** es una micrografía de quistes de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, tratados con 0.106 mM (60 ppm) de SES y teñidos con FDA/IP.

5 La **Figura 8B)** es una micrografía de quistes de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, tratados con 0.007 mM (3.7 ppm) de SES y teñidos con FDA/IP.

La **Figura 9A)** es una micrografía de quistes de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, tratados con 0.106 mM (60 ppm) de NaOCl_(aq) y teñidos con FDA/IP.

10 La **Figura 9B)** es una micrografía de quistes de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, tratados con 0.007 mM (3.7 ppm) de NaOCl_(aq) y teñidos con FDA/IP.

Las figuras 10 a 14 muestran determinaciones, por citómetro de flujo, de poblaciones de trofozoítos de *G. duodenalis*, sensibles [**Figuras 10-12**] y resistentes [**Figuras 10, 13 y 14**] a albendazol, tratados con SES [**Figuras 11 y 13**] o NaOCl_(aq) [**Figuras 12 y 14**], a diferentes concentraciones y teñidos con FDA/IP. El experimento se realizó con el fin de valorar el efecto de la SES comparativamente con el NaOCl_(aq) (empleado como control positivo) sobre la viabilidad de los trofozoítos expuestos a distintas concentraciones de ambas soluciones: 0.106mM (60 ppm) [**Figuras 11-14A**],
 15 0.055mM (30 ppm) [**Figuras 11-14B**], 0.028mM (15 ppm) [**Figuras 11-14C**] y 0 mM (control; 0 ppm) [**Figuras 10A y 10B**] de especies activas de cloro y oxígeno para el caso de la SES y de cloro para el caso del NaOCl_(aq). Se utilizó la técnica de tinción con colorantes fluorogénicos [di-acetato de fluoresceína (FDA)-ioduro de propidio(PI)]. El empleo de esta técnica permitió una tinción diferencial en la que las células viables
 20 presentaron una tinción verde (FDA+) debido a actividad de esterasas citosólicas y las no viables presentaron una tinción roja (PI+) debido a la penetración del colorante hasta el núcleo de las células dañadas.

Los resultados demostraron que el daño provocado a las células sensibles y resistentes a ABZ, con las soluciones SES y NaOCl es comparable cuando se
 30 encuentran a la misma concentración. Al utilizarlas a 60 y 30 ppm de especies activas, el porcentaje de células dañadas fue casi del 95% [**Figuras 11-14A y 11-14B**], mientras

que el resto de las diluciones inducen la muerte de apenas el 5% [Figuras 11-14C]. Estos resultados permiten establecer la concentración letal *in vitro* de 0.055 mM para trofozoítos sensibles y resistentes a ABZ tanto para NaOCl como para SES, aunque de acuerdo a las poblaciones sobrevivientes, la SES fue ligeramente superior al NaOCl_(aq) [Figuras 13-14B y 11-14C].

La Figura 10A) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, teñidos y sin teñir con FDA/IP y determinada por citometría de flujo.

La Figura 10B) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, teñidos y sin teñir con FDA/IP y determinada por citometría de flujo.

La Figura 11A) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, tratados con 0.106 mM (60 ppm) de SES y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

La Figura 11B) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, tratados con 0.055 mM (30 ppm) de SES y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

La Figura 11C) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, tratados con 0.028 mM (15 ppm) de SES y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

La Figura 12A) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, tratados con 0.106 mM (60 ppm) de NaOCl_(aq) y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

La Figura 12B) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, tratados con 0.055 mM (30 ppm) de NaOCl_(aq) y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

La Figura 12C) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa WB, sensible a albendazol, tratados con 0.028 mM (15 ppm) de NaOCl_(aq) y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

La Figura 13A) muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, tratados con 0.106 mM (60 ppm) de SES y teñidos con

FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

La **Figura 13B)** muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, tratados con 0.055 mM (30 ppm) de SES y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

5 La **Figura 13C)** muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, tratados con 0.028 mM (15 ppm) de SES y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

La **Figura 14A)** muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, tratados con 0.106 mM (60 ppm) de $\text{NaOCl}_{(\text{aq})}$ y teñidos
10 con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

La **Figura 14B)** muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de una cepa resistente a albendazol, tratados con 0.055 mM (30 ppm) de $\text{NaOCl}_{(\text{aq})}$ y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

La **Figura 14C)** muestra una población de trofozoítos de *G. duodenalis* de una
15 cepa resistente a albendazol, tratados con 0.028 mM (15 ppm) de $\text{NaOCl}_{(\text{aq})}$ y teñidos con FDA/IP, determinada por citometría de flujo.

No existen otros reportes que describan eficacia de algún tipo de solución electrolizada de superoxidación sobre trofozoítos o quistes de *G. duodenalis*.

En un estudio adicional, *ex vivo*, se probó la efectividad de la SES de la presente
20 invención para inviabilizar quistes procedentes de pacientes diagnosticados con giardiosis. El estudio se realizó mediante la prueba de desenquistamiento *in vitro*. Los quistes se purificaron y cuantificaron las muestras de pacientes donadores e infectados con *G. duodenalis*. Se realizaron las exposiciones a diferentes concentraciones de la SES y se analizaron por microscopía de contraste de fases, además de realizar
25 ensayos de desenquistamiento *in vitro* como indicador de la viabilidad de los quistes tratados. Se observó desenquistamiento únicamente en las muestras tratadas con agua destilada (muestras blanco) [**Figura 15A**], lo que corroboró la eficacia de la SES para matar quistes de *G. duodenalis* potencialmente infectivos o viables. Se muestran los resultados de los tratamientos con 0.106 mM (60 ppm) [**Figura 15B**] y 0.007 mM (3.7
30 ppm) [**Figura 15C**] de SES.

La **Figura 15A)** es una micrografía, por contraste de fases, de quistes de

pacientes infectados con *G. duodenalis* tratados con agua bidestilada y sometidos a desenquistamiento *in vitro*.

La **Figura 15B)** es una micrografía, por contraste de fases, de quistes de pacientes infectados con *G. duodenalis* tratados con 0.106 mM (60 ppm) de SES y
5 sometidos a desenquistamiento *in vitro*.

La **Figura 15C)** es una micrografía, por contraste de fases, de quistes de pacientes infectados con *G. duodenalis* tratados con 0.007 mM (3.7 ppm) de SES y sometidos a desenquistamiento *in vitro*.

Estos resultados permiten establecer a las SES como desinfectantes con
10 propiedades superiores a las de las soluciones convencionales a base de NaOCl.

3) Ejemplo de inducción de lisis osmótica de una solución electrolizada de superoxidación de pH neutro sobre quistes del parásito giardia duodenalis.

15 Como otro nivel de análisis, se tomaron muestras de quistes de *G. duodenalis* provenientes de pacientes infectados, y se trataron con diferentes concentraciones de SES (60, 25, 3.7 y 0 ppm). Se prepararon para realizar análisis por microscopía electrónica de barrido [**Figura 16**].

En las muestras sin tratamiento (agua destilada; 0 ppm SES) [**Figura 16A**] pudo
20 apreciarse la morfología característica de los quistes sanos o viables como esferas u óvalos turgentes. Por otro lado, las micrografías de las muestras tratadas con las diferentes concentraciones de SES mostraron células deformes con hundimientos superficiales pronunciados y/o surcos por aparente pérdida de turgencia. Los defectos fueron más evidentes en las muestras tratadas con SES al 100% (0.106 mM; 60 ppm)
25 [**Figura 16B**], aunque también se identificaron varias células tratadas con SES al 25% (0.028 mM; 15 ppm) [**Figura 16C**] y al 6.25% (0.007 mM; 3.7 ppm) con morfología anormal [**Figura 16D**]. El daño morfológico en los quistes es congruente con un mecanismo de acción tipo lisis osmótica, establecido para la SES de la presente invención, sobre microorganismos patógenos. En este sentido, resultó muy interesante
30 el hecho de que la pared quística de *G. duodenalis*, considerada muy rígida en función de su composición de 70% polisacárido (red de N-acetil-D-galactosamina) y 30%

proteína (conteniendo las llamadas cyst wall proteins [CWPs]), presentó alteraciones a nivel estructural que fueron producidas por acción de la solución SES de la presente invención.

La **Figura 16A)** es una micrografía, de microscopía electrónica de barrido, de quistes de pacientes infectados con *G. duodenalis* tratados con agua bidestilada.

La **Figura 16B)** es una micrografía, de microscopía electrónica de barrido, de quistes de pacientes infectados con *G. duodenalis* tratados con 0.106 mM (60 ppm) de SES.

La **Figura 16C)** es una micrografía, de microscopía electrónica de barrido, de quistes de pacientes infectados con *G. duodenalis* tratados con 0.028 mM (15 ppm) de SES.

La **Figura 16D)** es una micrografía, de microscopía electrónica de barrido, de quistes de pacientes infectados con *G. duodenalis* tratados con 0.007 mM (3.7 ppm) de SES.

Finalmente, deberá entenderse que el método para inducir lisis osmótica en parásitos y microorganismos patógenos con solución electrolizada de superoxidación de ph neutro de la presente invención, no está limitado exclusivamente a las modalidades descritas e ilustradas anteriormente y que las personas que tienen habilidades ordinarias en el arte pueden, con las enseñanzas proporcionadas por la invención, efectuar modificaciones al método para inducir lisis osmótica en parásitos y microorganismos patógenos con solución electrolizada de superoxidación de ph neutro de la presente invención, las cuales quedarán claramente dentro del concepto inventivo y alcance de la invención que se reivindica en las siguientes reivindicaciones.