



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Química

Tesis para acceder al título de Doctorado en Ciencias Químicas

**CONJUGADOS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS-
PORFIRINA PARA LA INACTIVACIÓN FOTODINÁMICA DE
MICROORGANISMOS**

Lic. Ana Coral Scanone

Director: Dr. Edgardo N. Durantini

Co-directora: Dra. M. Gabriela Álvarez

Río Cuarto, Córdoba, Argentina

Marzo de 2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

Departamento de Química

Lic. Ana Coral Scanone Firma..... Aclaración.....

Dr. Edgardo N. Durantini Firma..... Aclaración.....

Dra. M. Gabriela Álvarez Firma..... Aclaración.....

COMISIÓN ASESORA Y JURADO

Dra. Patricia Molina Departamento de Química. *Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales* Universidad Nacional De Río Cuarto

Firma..... Aclaración.....

Dr. Gustavo Morales Departamento de Química. *Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales* Universidad Nacional De Río Cuarto

Firma..... Aclaración.....

Dra. Carla Giacomelli Instituto de Investigaciones en Físico- Química de Córdoba. Universidad Nacional De Córdoba

Firma..... Aclaración.....

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:.....

Calificación:.....

A mis padres...

«La utopía está en el horizonte. Camino dos pasos, ella se aleja dos pasos y el horizonte se corre diez pasos más allá. ¿Entonces para qué sirve la utopía? Para eso, sirve para caminar».

Eduardo Galeano

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres, Andrea y Daniel, y mis hermanos, Alejandro y Francisco, por aguantarme siempre.

Gracias a mis directores Gabriela y Edgardo. Por la confianza que depositaron en mí desde un principio, dejándome trabajar con total libertad. Gracias por su tiempo, paciencia, dedicación y motivación.

Gracias a mis amigas de toda la vida, mis hermanas del alma, las que me acompañaron en todo momento y las que me ayudan día a día a ser mejor persona: Noe, Tiz, Nati, Jesi y Vero. Y a sus hermosos niños por llenarme de alegría y dulzura: Oli, Nahu, Gere y Nachi.

Gracias a las primeras personas con las que compartí los primeros días de aprendizaje en la universidad, y hoy, son unas de mis grandes amigas y motivaciones a seguir. Gracias por estar siempre presentes, acompañarme y motivarme, Jessi y Eli. Y a sus niños, entre ellos mi hermoso ahijado, Bauti.

Gracias a los mejores amigos y compañeros que me dio el cursado de la Lic. en Química, quienes me acompañaron y motivaron también estos cinco años: mis “demonios”.

Gracias a Cachito, Mari y Ani por sus mates en momentos de descanso y por su tiempo y asistencia técnica cuando lo necesité.

Gracias a los integrantes del jurado, Patricia, Carla y Gustavo, por el tiempo y la predisposición ofrecidos en todo momento y por sus valiosas devoluciones.

Gracias a todos los integrantes del grupo PDI, a los de siempre y los que ya no están, por sus enseñanzas.

Gracias a mis compañeros del Gran becario. Por la compañía, las discusiones, los encuentros y desencuentros, que hicieron posible la convivencia. Gracias a los benditos viernes de postre.

Gracias a Airam por ser mi salvación los últimos días de escritura de la tesis, y por ayudarme a que quede hermosa, dedicando todo el tiempo necesario para ello.

Gracias a Andrés y a Iván por ser los mejores asistentes técnicos incondicionales.

Gracias a la querida y hermosa Universidad Nacional de Río Cuarto

Gracias a todos los integrantes del departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico Químicas y Naturales que contribuyeron a mi formación.

Gracias a los queridos estudiantes del Secundario no docente de la universidad y a los directores del mismo por la confianza.

Gracias a los queridos compañeros de Sinergia y Becarios de investigación, con los que compartimos reuniones y debates con sueños de transformación.

Gracias a CONICET por otorgarme la beca de posgrado, con la cual fue posible realizar el doctorado.

Gracias a la Educación Pública y a cada uno de los habitantes de la Argentina por brindarme la posibilidad de formarme en grado y posgrado. Refuerzo mi compromiso con el país y espero estar siempre a la altura de las circunstancias para responder a las necesidades de la sociedad, desde el lugar que me toque estar.

Gracias a todos por hacer de mi doctorado un logro colectivo.

RESUMEN

La resistencia de los microorganismos a diferentes antimicrobianos ha aumentado considerablemente en los últimos años. Por lo tanto, es necesario desarrollar terapias alternativas para el control y tratamiento de enfermedades infecciosas. Así, la inactivación fotodinámica (PDI) ha sido propuesta como una estrategia emergente para la erradicación de patógenos. En este sentido, el uso de agentes fototerapéuticos inmovilizados en una matriz sólida permite la recuperación con posterioridad al tratamiento y una aplicación sustentable. En este trabajo de Tesis Doctoral se sintetizaron conjugados de derivados de porfirinas unidos a nanopartículas magnéticas. El núcleo magnético de Fe_3O_4 funcionalizado directamente con grupos amino (MNPNH_2) resulta ser un soporte inadecuado para inmovilizar fotosensibilizadores (PSs) debido a la baja estabilidad. Sin embargo, este núcleo recubierto con una capa de sílica y luego funcionalizado con grupos amino (MNPSINH_2) mostró ser un soporte estable. En primer lugar, se inmovilizó una porfirina aniónica (TCPP) sobre dichas nanopartículas. Mediante espectroscopía UV-visible se corrobora la unión del PS al soporte. Estudios cinéticos con distintos sustratos indican que TCPP inmovilizada produce eficientemente especies reactivas de oxígeno (ROS). Estudios *in vitro* de PDI con la levadura *Candida albicans* y las bacterias *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) y *Escherichia coli* (Gram negativa), muestran una considerable disminución de la viabilidad celular de los tres microorganismos. El resultado más interesante es que el conjugado es reciclable y reutilizable en la inactivación de microbios hasta, al menos, tres veces. Estos resultados motivaron la síntesis de nuevos PSs que adquieren cargas positivas en la periferia del macrociclo tetrapirrólico y de esta manera, se pueden obtener conjugados que interaccionan mejor con las células microbianas. Así, se diseñaron porfirinas con simetría A_3B y ABAB , con carácter anfílico sustituidas por grupos amino y perfluorofenilo. Dichos PSs muestran una importante actividad fotodinámica en solución. Además, se observa elevada PDI de los microorganismos, siendo A_3B el más eficiente. Por otro lado, estas porfirinas se inmovilizaron sobre MNPSINH_2 . Estudios cinéticos e *in vitro* muestran que el conjugado formado tiene buena actividad fotodinámica y una eficiente PDI de *S. aureus*. Sin embargo, la principal desventaja de este procedimiento es el bajo rendimiento en la obtención de porfirinas asimétricamente sustituidas. Por lo tanto, se decidió trabajar con una porfirina perfluorada (F_{20}TPP) con simetría A_4 , la cual se obtiene con mayor rendimiento. Este nuevo conjugado $\text{MNPSINH-F}_{19}\text{TPP}$ se modificó *in situ* para obtener grupos amino sobre la periferia del macrociclo. El conjugado $\text{MNPSIN}^+-\text{F}_{16}\text{TPP-N}^+$, el cual contiene cargas positivas sobre los grupos amino de las nanopartículas y de las porfirinas, es el más eficiente en la PDI de microorganismos y además, puede ser reutilizado. Finalmente, la exploración del desarrollo de nuevas estructuras para anclar a las nanopartículas, lleva a la utilización de BODIPYs. Estas moléculas basadas en la mitad del macrociclo tetrapirrólico presentan un procesos de síntesis y purificación son más sencillos. A partir de un BODIPY fluorescente y otro con elevada actividad fotodinámica se diseñaron conjugados MNPSINH-BODIPYs . Así, fue posible obtener un conjugado que actúa como fluoróforo para la detección de infecciones y otro como agente fototerapéutico con elevada eficiencia para la erradicación fotodinámica de microorganismos.

ABSTRACT

The resistance of microorganisms to different antimicrobials has increased in recent years. Therefore, it is necessary to develop alternative therapies for the control and treatment of infectious diseases. Thus, photodynamic inactivation (PDI) has been proposed as an emerging strategy for the eradication of pathogens. In this sense, the use of immobilized phototherapeutic agents in a solid matrix allows the recovery of it after treatment and a sustainable application. In this PhD thesis, conjugates of porphyrin derivatives linked to magnetic nanoparticles were synthesized. The magnetic core of Fe_3O_4 functionalized directly with amino groups (MNP NH_2) turns out to be an inadequate support to immobilize photosensitizers (PSs) due to the low stability. However, this core coated with a layer of silica and then functionalized with amino groups (MNPSi NH_2) was a stable support. First, an anionic porphyrin (TCPP) was immobilized on these nanoparticles. The union of the PS to the support was observed by means of UV-visible spectroscopy. Kinetic studies with substrates indicate that immobilized TCPP efficiently produces reactive oxygen species (ROS). *In vitro* studies of PDI with the yeast *Candida albicans* and the bacteria *Staphylococcus aureus* (Gram-positive) and *Escherichia coli* (Gram-negative) show a considerable decrease in the cell viability of these microorganisms. The most interesting result is that the conjugate is recyclable and reusable in the inactivation of microbes up to at least three times. These results motivate the synthesis of new PSs that acquire positive charges in the periphery of the tetrapyrrolic macrocycle. In this way, the conjugates can have a better interaction with microbial cells. Thus, porphyrins with A_3B and ABAB symmetry were designed with amphiphilic character bearing amino and perfluorophenyl groups. These PSs show an important photodynamic activity in solution. In addition, the PDI of the microorganisms was observed, being A_3B the most efficient. On the other hand, these porphyrins were immobilized on MNPSi NH_2 . Kinetic and *in vitro* studies show that the conjugate presents appropriated photodynamic activity and an efficient PDI of *S. aureus*. However, the main disadvantage of this process is the low yield in obtaining asymmetrically substituted porphyrins. Therefore, a perfluorinated porphyrin (F_{20}TPP) with A_4 symmetry was used, which can be synthesized in higher yield. This new conjugate MNPSiNH- F_{19}TPP was modified *in situ* to obtain amino groups on the periphery of the macrocycle. The conjugate MNPSi N^+ - F_{16}TPP - N^+ , which contains positive charges on the amino groups of nanoparticles and porphyrins, is the most efficient in the PDI of microorganisms and can also be reused. Finally, the exploration of the development of new structures for nanoparticles leads to the use of BODIPYs. They are based on half of the tetrapyrrole macrocycle and have a simplest synthesis and purification processes. From a fluorescent BODIPY and another with high photodynamic activity, novel conjugates were designed MNPSiNH-BODIPYs. Thus, it was possible to obtain a conjugate that acts as fluorophore for the detection of infections and another as a phototherapeutic agent with higher efficiency for the photodynamic eradication of microorganisms.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág
ÍNDICE DE TABLAS	xvi
ÍNDICE DE FIGURAS	xviii
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	xxvi
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xxviii
GLOSARIO DE ESTRUCTURAS DE MOLÉCULAS	xxxii
CAPÍTULO I.....	23
I. INTRODUCCIÓN	23
I.1. Resistencia a los antimicrobianos: una problemática mundial.....	23
I.1.1. Factores que aceleran la aparición y propagación de la RAM.....	25
I.1.2. Medidas de prevención en Argentina.....	26
I.2. Tratamiento de las enfermedades infecciosas	26
I.3. Inactivación fotodinámica: tratamiento alternativo al uso de antimicrobianos.....	27
I.3.1. Antecedentes de la PDI	28
I.3.2. Generalidades de la acción fotodinámica.....	29
I.3.3. Fundamentos, condiciones óptimas y ventajas de la PDI	30
I.3.4. Mecanismos de fotosensibilización.....	32
I.3.5. PDI de Microorganismos	36
I.3.6. Características de los PS para PDI	40
I.4. Inmovilización de PS	49
I.4.1. Nanopartículas magnéticas.....	51
I.4.2. Conjugados NP magnéticas-PS para la PDI de microorganismos	52
II. OBJETIVOS	57
II. 1. Objetivos generales.....	57

ÍNDICE DE CONTENIDO

II. 2. Objetivos específicos	57
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
III.1. Equipamiento general.....	65
III.2. Reactivos y materiales.....	66
III.3. Sistemas de irradiación.....	66
III.4. Síntesis de MNP	68
III.4.1. Síntesis de MNP de Fe ₃ O ₄ . Método de coprecipitación	68
III.4.2. Síntesis de nanopartículas magnéticas con una cobertura de sílica (MNPSI)..	68
III.4.3. Funcionalización de nanopartículas magnéticas con grupos propilamino (MNPNH ₂ y MNPSINH ₂)	68
III.5. Síntesis de los conjugados MNPNH ₂ -TCPP y MNPSINH-TCPP.....	69
III.6. Síntesis de porfirinas que contienen grupos amino alifáticos básicos.....	73
III.6.1. Síntesis de meso-(4-(3-N,N-dimetilaminopropoxi)fenil)dipirrometano (ADPM)	73
III.7. Síntesis de los conjugados MNPSINH-F ₄ APP y MNPSINH-F ₁₀ APP	75
III.8. Síntesis de los conjugados MNPNH ₂ -F ₁₉ TPP, MNPN ⁺ -F ₁₉ TPP, MNPNH ₂ -F ₁₉ TPP-N y MNPN ⁺ -F ₁₉ TPP-N ⁺	77
III.9. Metilación de grupos amino	80
III.10. Síntesis de los conjugados MNPNH ₂ -F ₄ Ph-BOD-H ₂ y MNPNH ₂ -F ₄ Ph-BOD-Br ₂	80
III.11. Caracterización de las NP y los conjugados.....	81
III.12. Síntesis de 2,2'-(antraceno-9,10-diil)bis(tetrasodimetilmalonato) (ABMM)	81
III.13. Decantación magnética.....	82
III.14. Estudios espectroscópicos	82
III.15. Estudios de fotodescomposición de sustratos en estado estacionario	83
III.15.1. Fotooxidación de derivado del antraceno (ABMM).....	83

ÍNDICE DE CONTENIDO

III.15.2. Fotooxidación de 9,10-dimetilantraceno (DMA)	85
III.15.3. Fotooxidación de L-triptófano (Trp)	86
III.16. Estudios con microorganismos	87
III.16.1. Condiciones de crecimiento.....	87
III.16.2. Unión de los PS a las células microbianas	88
III.16.3. Fotoinactivación de microorganismos.....	89
III.16.4. Curva de crecimiento.....	91
III.16.5. Reutilización de conjugados nanopartícula magnética-porfirina en la PDI de microorganismos	92
III.17. Análisis estadísticos.....	95
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	101
IV.1.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas	105
IV.1.1.2. Síntesis de MNP de Fe ₃ O ₄ con terminaciones amino (MNPNH ₂)	105
IV.1.2. Caracterización de las MNP	106
IV.1.2.1. Microscopía de transmisión electrónica (TEM).....	106
IV.1.3. Actividad fotodinámica	112
IV.1.3.1. Fotooxidación de ABMM	112
IV.1.3.2. Fotooxidación de Trp	113
IV.1.4. PDI de microorganismos	115
IV.2.1. Síntesis de nanopartículas magnéticas	131
IV.2.2. Caracterización de las nanopartículas magnéticas	131
IV.2.3. Actividad fotodinámica	133
IV.2.3.1. Fotooxidación de los sustratos ABMM y Trp.....	133
IV.2.4. PDI de microorganismos	135
IV.3.1. Porfirinas que contienen grupos amino alifáticos básicos y perfluorofenilo .	143

ÍNDICE DE CONTENIDO

IV.3.2. Síntesis	144
IV.3.3. Espectroscopía de absorción UV-visible y fluorescencia	145
IV.3.4. Actividad fotodinámica	146
IV.3.5. Estudios con microorganismos.....	148
IV.4.1. Síntesis de conjugados MNPSINH-F ₄ TAP y MNPSINH-F ₉ TAP.....	165
IV.4.2. Propiedades espectroscópicas de absorción UV-visible de MNPSINH-F ₄ APP y MNPSINH-F ₉ APP	166
IV.4.4. PDI de microorganismos	168
IV.5.1. Síntesis de los conjugados C1, C2, C3 y C4	189
IV.5.2. Microscopía de transmisión electrónica (TEM) y potencial Z.....	191
IV.5.3. Espectroscopía de absorción UV-visible y fluorescencia	193
IV.5.4. Actividad fotodinámica	195
IV. 6. 1. Estructura y propiedades de los BODIPYs seleccionados para formar conjugados nanomagnéticos fluoróforos y fotoactivos	193
CAPÍTULO VI	213
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	213

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Absorbancias correspondientes a la relación entre el exceso de 2,4-fdnb y n-butilamina.	109
Tabla 2. Propiedades espectroscópicas uv-visible de MNP-TCPP y TCPP libre en agua.	112
Tabla 3. Parámetros cinéticos para la descomposición de sustratos (k_{obs}^{ABMM} y k_{obs}^{trp}) y rendimientos cuánticos de producción de $o_2(^1\delta_g)$ (Φ_δ) en agua.	115
Tabla 4. Propiedades espectroscópicas uv-visible de MNPSINH-TCPP y TCPP libre, en agua.	133
Tabla 5. Parámetros cinéticos para la descomposición de sustratos (k_{obs}^{ABMM} , k_{obs}^{trp}) y rendimientos cuánticos de producción de $o_2(^1\delta_g)$ (ϕ_δ) en agua.	135
Tabla 6. Propiedades espectroscópicas y fotodinámicas de F ₁₀ APP, F ₅ APP and TAPP en DMF.	148
Tabla 7. Propiedades fotodinámicas de MNPSINH-F ₄ APP y MNPSINH-F ₉ APP en agua	168
Tabla 8. Parámetros espectroscópicos de los conjugados C1, C2, C3, C4 y la porfirina f ₂₀ tp	195
Tabla 9. Parámetros cinéticos para la descomposición de sustratos ABMM y DMA (k_{obs}^{ABMM} , k_{obs}^{dma}).	197
Tabla 10. Parámetros cinéticos para la descomposición del sustrato TRP (k_{obs}^{trp})	199
Tabla 11. Parámetros espectroscópicos de BODIPYs y conjugados correspondientes en DMF	195
Tabla 12. Parámetros cinéticos para la descomposición de DMA en ACN	198

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la molécula a) psolareno, b) acridina y c) eosina.	29
Figura 2. PS derivados de macrociclos tetrapirrólicos.	30
Figura 3. Membrana y pared celular de bacterias gram positivas	38
Figura 4. Membrana y pared celular de bacterias gram negativas.	39
Figura 5. Membrana y pared celular de célula fúngica	40
Figura 6. Estructura molecular del macrociclo tetrapirrólico de porfirinas (a, b, c y d representan grupos sustituyentes) (izquierda) e imágenes en tres dimensiones (3D) del macrociclo (derecha).	42
Figura 7. Posiciones meso y β sobre el macrociclo tetrapirrólico	43
Figura 8. a) espectro de absorción característico de una porfirina base libre. b) espectro de emisión de fluorescencia característico de porfirinas.	48
Figura 9. Estructura química de BODIPY.	49
Figura 10. Representación de diferentes sistemas en escala nanométrica.	50
Figura 11. Diferentes arreglos de irradiación. A. proyector. B. monocromador. C. celda. D. policubeta. E. tubo de ensayo con suspensión microbiana. F.LED. G. estufa. H. soporte.	67
Figura 12. Secuencia de lavado por decantación magnética con imán de neodimio de 20 mm de diámetro x 10 mm de alto. tiempo de migración de mnp hacia el imán (a-d)= 2 min (en agua).	82
Figura 13. Colonias de células a) <i>s. aureus</i> , b) <i>e. coli</i> y c) <i>c. albicans</i>	89
Figura 14. Imágenes típicas de TEM de (a) MNP, (b) MNPNH ₂ .	107
Figura 15. Espectros FT-IR de a) MNP, b) APTS y c) MNPNH ₂	108
Figura 16. Espectros de absorción de MNPNH-TCPP (línea continua), MNPNH ₂ (línea discontinua), diferencia de absorción (MNPNH-TCPP) – (MNPNH ₂) (línea gris) y TCPP (línea discontinua punteada) en agua	111
Figura 17. Fotooxidación de ABMM (35 μ m). a) cambios en el espectro de absorción de ABMM sensibilizado por MNPNH-TCPP. b) gráficos de primer orden para MNPNH ₂ (◆), MNPNH-TCPP (■) y TPPS ₄ ⁴⁻ (ref) (▲), en H ₂ O. λ_{irr} = 455-800 nm, δt_{irr} =5 min.	113

Figura 18. Fotodescomposición de TRP (~20 μ m), en H₂O. a) cambios en espectro de emisión de TRP sensibilizado por MNPNH-TCPP ($\lambda_{exc}=290$ nm). b) gráficos de primer orden por MNPNH-TCPP (■), MNPNH₂ (◆) y TPPS₄⁴⁻ (▲). $\lambda_{irr}=455-800$ nm, $\delta t_{irr}=5$ min. 114

Figura 19. Inactivación fotodinámica de *C. albicans* tratadas con a) diferentes concentraciones de MNPNH-TCPP (■), MNPNH₂ (◆) y MNP (►) (1,0 mg, 2,5 mg y 5,0 mg) e irradiadas con luz visible durante 30 min y b) 2,5 mg de MNPNH-TCPP (5 μ m) (■), MNPNH₂ (◆) y MNP (►) y expuestas a irradiación con luz visible por diferentes tiempos (5, 15 y 30 min). las células se incubaron con dichas concentraciones durante 30 min a 37 °C en la oscuridad. células sin fotosensibilizador irradiadas (●). 116

Figura 20. Inactivación fotodinámica de *E. coli* tratadas con a) diferentes concentraciones de MNPNH-TCPP (■), MNPNH₂ (◆) y MNP (►) (0,5 mg, 1,5 mg y 2,5 mg) e irradiadas con luz visible durante 30 min y b) 2,5 mg de MNPNH-TCPP (5 μ m) (■), MNPNH₂ (◆) y MNP (►) y expuestas a irradiación con luz visible por diferentes tiempos (5, 15 y 30 min). las células se incubaron con dichas concentraciones durante 30 min a 37 °C en la oscuridad. células sin fotosensibilizador irradiadas (●). 117

Figura 21. Inactivación fotodinámica de *S. aureus* tratadas con a) diferentes concentraciones de MNPNH-TCPP (■), MNPNH₂ (◆) y MNP (►) (0,5 mg, 1,5 mg y 2,5 mg) e irradiadas con luz visible durante 30 min y b) 2,5 mg de MNPNH-TCPP (5 μ m) (■), MNPNH₂ (◆) y MNP (►) y expuestas a irradiación con luz visible por diferentes tiempos (5, 15 y 30 min). las células se incubaron con dichas concentraciones durante 30 min a 37 °C en la oscuridad. células sin fotosensibilizador irradiadas (●). 118

Figura 22. Curva de crecimiento de a) *C. albicans* y b) *E. coli*. control oscuridad (○), control iluminación (●), MNPNH-TCPP en oscuridad (Y) (10,0 mg, 15 μ m) y MNPNH-TCPP iluminado(■) (10,0 mg, 15 μ m). absorbancia ($\lambda=660$ nm) determinada en intervalos de 30 min. 120

Figura 23. Estudios de reutilización de MNPNH-TCPP en a) *C. albicans*, b) *E. coli* y c) *S. aureus* (200 μ l, $\sim 10^6$ UFC/ml) incubadas con 1,5 mg (4,5 μ m) de MNPNH-TCPP durante 30 min, a 37 °C en la oscuridad, con posterior exposición a la luz visible (30 min en a y b, 15 min en c). experiencias: (1) células sin MNPNH-TCPP y mantenidas en la oscuridad; (2) células con MNPNH-TCPP en la oscuridad; (3) células con MNPNH-TCPP expuestas a la luz visible; (4) nuevas células tratadas con MNPNH-TCPP recuperado de la experiencia 3

ÍNDICE DE FIGURAS

- (reutilización 1); (5) nuevas células tratadas con MNPNH-TCPP recuperado de la experiencia 4 (reutilización 2). 123
- Figura 24.** Espectros de absorción de MNPNH-TCPP antes de inactivar fotodinámicamente los microorganismos (línea continua) y luego de la pdi (línea punteada). 124
- Figura 25.** Imágenes típicas de TEM de (a) MNPSINH₂ y (b) MNPSINH-TCPP 132
- Figura 26.** Espectros de absorción de MNPSINH-TCPP (línea continua), MNPNH₂ (línea discontinua), diferencia de absorción (MNPSINH-TCPP) – (MNPNH₂) (línea gris) y TCPP (línea discontinua punteada) en agua. 133
- Figura 27.** a) fotooxidación de ABMM (35 μm) y b) fotodescomposición de trp (20 μm). gráficos de primer orden para MNPNH₂ (◆), MNPSINH-TCPP (■) y TPPS₄⁴⁻(ref) (▲), en h₂O, λ_{irr} = 455-800 nm, δt_{irr} = 5 min. 134
- Figura 28.** Inactivación fotodinámica de a) *C. albicans*, b) *E. coli* y c) *S. aureus*, tratadas con 2,5 mg de MNPSINH-TCPP (5 μm) (■), MNPSINH₂ (◆) y MNPSI (◄), y expuestas a irradiación con luz visible por diferentes tiempos (15 y 30 min en a) y b); 5 y 15 en c)). células sin fotosensibilizador irradiadas (●). 137
- Figura 29.** Estudios de reutilización de MNPSINH-TCPP en a) *C. albicans*, b) *E. coli* y c) *S. aureus* (200 μl, ~10⁶ UFC/ml) incubadas con 2,5 mg (4,5 μm) de MNPSINH-TCPP durante 30 min, a 37 °C en la oscuridad, con posterior exposición a la luz visible (30 min en a y b, 15 min en c). experiencias: (1) células sin MNPSINH-TCPP y mantenidas en la oscuridad; (2) células con MNPSINH-TCPP en la oscuridad; (3) células con MNPSINH-TCPP expuestas a la luz visible; (4) nuevas células tratadas con MNPSINH-TCPP recuperado de la experiencia 3 (reutilización 1); (5) nuevas células tratadas con MNPSINH-TCPP recuperado de la experiencia 4 (reutilización 2). 139
- Figura 30.** Espectros de a) absorción, b) emisión de fluorescencia (λ_{exc} = 515 nm) y c) excitación (λ_{em} = 715 nm) de F₅APP (línea azul), f₁₀app (línea roja) and TAPP (línea rosa) en DMF. 145
- Figura 31.** Gráficos de primer orden para la fotooxidación de dma fotosensibilizada por F₅APP (■), F₁₀APP (▼) and TAPP (▲) (λ_{irr} = 420 nm) in DMF. 147
- Figura 32.** cantidad de F₅APP recuperada de a) *C. albicans* (~10⁶ UFC/ml) y b) *E. coli* (~10⁸ UFC/ml) tratadas con 2.5 μm (▼), 5.0 μm (■) y 7.5 μm (▲) de ps y c) *s. aureus* (~10⁸

ÍNDICE DE FIGURAS

UFC/ml) tratada con 1.0 μm (▼), 2.5 μm (■) y 5.0 μm (▲) de ps, para diferentes tiempos de incubación a 37 °C en oscuridad. 149

Figura 33. Cantidad de $f_{10\text{app}}$ recuperada de a) *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/ml) y b) *E. coli* ($\sim 10^8$ UFC/ml) tratadas con 2.5 μm (▼), 5.0 μm (■) y 7.5 μm (▲) de ps y c) *S. aureus* ($\sim 10^8$ UFC/ml) tratada con 1.0 μm (▼), 2.5 μm (■) y 5.0 μm (▲) de ps, para diferentes tiempos de incubación a 37 °C en oscuridad. 150

Figura 34. Cantidad de t_{app} recuperada de a) *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/ml) y b) *E. coli* ($\sim 10^8$ UFC/ml) tratadas con 2.5 μm (▼), 5.0 μm (■) y 7.5 μm (▲) de ps y c) *S. aureus* ($\sim 10^8$ UFC/ml) tratada con 1.0 μm (▼), 2.5 μm (■) y 5.0 μm (▲) de ps, para diferentes tiempos de incubación a 37 °C en oscuridad. 151

Figura 35. Curvas de sobrevivencia de células sensibilizadas por $F_5\text{APP}$; a) *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/ml) y b) *E. coli* ($\sim 10^8$ UFC/ml) incubadas con 2.5 μm (▼), 5.0 μm (■) and 7.5 μm (▲), c) *S. aureus* ($\sim 10^8$ UFC/ml) incubadas con 1.0 μm (▼), 2.5 μm (■) y 5.0 μm (▲) a 37 °C en oscuridad e irradiadas con luz visible por diferentes tiempos. cultivo control de células irradiadas sin fotosensibilizador (●). 153

Figura 36. Curvas de sobrevivencia de células sensibilizadas por $F_{10}\text{APP}$; a) *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/ml) y b) *E. coli* ($\sim 10^8$ UFC/ml) incubadas con 2.5 μm (▼), 5.0 μm (■) and 7.5 μm (▲), c) *S. aureus* ($\sim 10^8$ UFC/ml) incubadas con 1.0 μm (▼), 2.5 μm (■) y 5.0 μm (▲) a 37 °C en oscuridad e irradiadas con luz visible por diferentes tiempos. cultivo control de células irradiadas sin fotosensibilizador (●). 154

Figura 37. Curvas de sobrevivencia de células sensibilizadas por $T\text{APP}$; a) *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/ml) y b) *E. coli* ($\sim 10^8$ UFC/ml) incubadas con 2.5 μm (▼), 5.0 μm (■) and 7.5 μm (▲), c) *S. aureus* ($\sim 10^8$ UFC/ml) incubadas con 1.0 μm (▼), 2.5 μm (■) y 5.0 μm (▲) a 37 °C en oscuridad e irradiadas con luz visible por diferentes tiempos. cultivo control de células irradiadas sin fotosensibilizador (●). 155

Figura 38. Sobrevivencia de a) *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/ml), b) *E. coli* ($\sim 10^8$ UFC/ml) tratadas con 5 μm de $F_5\text{APP}$ e irradiadas 15 y 5 min, correspondientemente y c) *S. aureus* ($\sim 10^8$ UFC/ml) tratadas con 1 μm de $F_5\text{APP}$ y 5 min de irradiación; (1) células en oscuridad; (2) células irradiadas; (3) células tratadas con $F_5\text{APP}$ en oscuridad; (4) células tratadas con $F_5\text{APP}$ irradiadas; (5) células irradiadas conteniendo 50 mm de azida de sodio; (6) células

ÍNDICE DE FIGURAS

tratadas con F₅APP conteniendo 50 mm de azida de sodio, irradiadas; (7) células irradiadas conteniendo 50 mm d-manitol; (8) células tratadas con f₅app conteniendo 50 mm D-mannitol , irradiadas (**p* < 0.05, en comparación con el control). 158

Figura 39. Supervivencia de a) *C. albicans* (~10⁶ UFC/ml), b) *E. coli* (~10⁸ UFC/ml) tratadas con 5 µm de F₁₀APP e irradiadas 15 y 5 min, correspondientemente y c) *S. aureus* (~10⁸ UFC/ml) tratadas con 1 µm de F₁₀APP y 5 min de irradiación; (1) células en oscuridad; (2) células irradiadas; (3) células tratadas con f₁₀app en oscuridad; (4) células tratadas con F₁₀APP irradiadas; (5) células irradiadas conteniendo 50 mm de azida de sodio; (6) células tratadas con F₁₀APP conteniendo 50 mm de azida de sodio, irradiadas; (7) células irradiadas conteniendo 50 mm d-manitol; (8) células tratadas con F₁₀APP conteniendo 50 mm D-mannitol , irradiadas (**p* < 0.05, en comparación con el control). 159

Figura 40. Supervivencia de a) *C. albicans* (~10⁶ UFC/ml), b) *E. coli* (~10⁸ UFC/ml) tratadas con 5 µm de tapp e irradiadas 15 y 5 min, correspondientemente y c) *S. aureus* (~10⁸ UFC/ml) tratadas con 1 µm de tapp y 5 min de irradiación; (1) células en oscuridad; (2) células irradiadas; (3) células tratadas con tapp en oscuridad; (4) células tratadas con tapp irradiadas; (5) células irradiadas conteniendo 50 mm de azida de sodio; (6) células tratadas con tapp conteniendo 50 mm de azida de sodio, irradiadas; (7) células irradiadas conteniendo 50 mm d-manitol; (8) células tratadas con tapp conteniendo 50 mm D-mannitol , irradiadas (**p* < 0.05, en comparación con el control). 160

Figura 41. a) espectro de absorción de MNPSINH-f₉app (línea continua) ($\lambda_{\text{máx}}=422$ nm), MNPSINH-F₄APP (línea discontinua) ($\lambda_{\text{máx}}=426$ nm), scattering de MNPSINH₂ (línea gris) en DMF; b) diferencia entre los espectros de absorción de los conjugados y el scattering de MNPSINH₂. 166

Figura 42. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de ABMM fotosensibilizada por MNPSINH-f₄app (■), MNPSINH-F₉APP (▼) y TPPS⁴⁻₄ (▲) ($\lambda_{\text{irr}}= 455-800$ nm, $\delta t_{\text{irr}} = 30$ s), en agua. 167

Figura 43. Curvas de supervivencia de *S. aureus* (~10⁸ UFC/ml) tratadas con: 0.7 mg (3 µm) de MNPSINH-F₄APP (■, línea discontinua) y MNPSINH-F₉APP (▼, línea discontinua); y 1,2 mg (5,0 µm) de MNPSINH-F₄APP (■, línea continua) y MNPSINH-F₉APP (▼, línea continua); incubadas 30 min a 37 °C en oscuridad y, posteriormente, irradiadas con luz visible por 5 y 15 min. cultivo control (●) -células sin fotosensibilizador e irradiadas. 169

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 44.** Representación del conjugado 1. 189
- Figura 45.** Representación del conjugado 2. 190
- Figura 46.** Representación del conjugado 3. 191
- Figura 47.** Representación del conjugado 4. 191
- Figura 48.** Fotografía de a) C1, b) C2, c) C3 y d) C4 por microscopía de transmisión electrónica. 192
- Figura 49.** Espectro de absorción uv-visible en a) H_2O y b) DMF de los conjugados C1 (línea negra), C2 (línea roja), C3 (línea azul), C4 (línea celeste) y de la porfirina libre F₂₀TPP (línea rosa). scattering de MNPSINH₂ (línea gris). 194
- Figura 50.** Espectro de emisión en H_2O de los conjugados C1 (línea negra), C2 (línea roja), C3 (línea azul), C4 (línea celeste) y de la porfirina libre f₂₀tpp (línea rosa). 194
- Figura 51.** Gráficos de primer orden para la fotooxidación de a) ABMM en agua (35 μm), $\delta t_{\text{irr}} = 30$ s, b) ABMM en pbs (35 μm), $\delta t_{\text{irr}} = 60$ s y c) dma en DMF (35 μm), fotosensibilizada por C1 (■), C2 (●), C3 (◄), C4 (▼) y TPPS⁴⁻₄ (▲); $\lambda_{\text{irr}} = 455\text{-}800$ nm. 196
- Figura 52.** Gráficos de primer orden para la fotooxidación de trp en pbs (35 μm), $\delta t_{\text{irr}} = 180$ s, fotosensibilizada por C1 (■), C2 (●), C3 (◄), C4 (▼) y TPPS⁴⁻₄ (▲); $\lambda_{\text{irr}} = 455\text{-}800$ nm. 198
- Figura 53.** Supervivencia de a) *C. albicans*, b) *E. coli* y c) *S. aureus* tratadas con 0,4 mg, 2 μm de porfirina en los conjugados (10 nmol/mg) y expuestas a irradiación con luz visible (90 mw/cm^2) por 15 min para *S. aureus* y 30 min para *e. coli* y (c) *C. albicans*. tratamiento 1) control de células irradiadas, 2) células incubadas con C1 e irradiadas, 3) células incubadas con C2 e irradiadas, 4) células incubadas con C3 e irradiadas y 5) células incubadas con C4 e irradiadas; (---) límite de detección. 200
- Figura 54.** Estudios de reutilización de C4 en a) *C. albicans*, b) *E. coli* y c) *S. aureus* (200 μl , $\sim 10^4$ UFC/ml) tratadas con 0,2 mg, 2 μm de porfirina en el conjugado (10 nmol/mg) durante 30 min, a 37 °C en la oscuridad, con posterior exposición a la luz visible (30 min en a y b, 15 min en c). experiencias: (1) control células irradiadas; (2) células con C4 en la oscuridad; (3) células con C4 expuestas a la luz visible; (4) nuevas células tratadas con C4 recuperado de (3) en oscuridad; (5) nuevas células tratadas con C4 recuperado de (3) e irradiadas (reutilización 1); (6) nuevas células tratadas con C4 recuperado de (5) en

ÍNDICE DE FIGURAS

oscuridad; (7) nuevas células tratadas con C4 recuperado de (5) e irradiadas (reutilización 2); (---) límite de detección. 201

Figura 55. Imágenes microscópicas de *E. coli* incubadas por 20 min con C2 (3 μm) y PI (1 μm): a) campo claro, b) fluorescencia, antes de irradiar, c) luego de 30 min de irradiación (100x), d) imagen campo control oscuridad, e) fluorescencia del control oscuridad (50 min). 202

Figura 56. Imágenes microscópicas de *E. coli* incubadas por 20 min con C4 (3 μm) y PI (1 μm) a) campo claro, b) fluorescencia, antes de irradiar, c) luego de 30 min de irradiación (100x), d) imagen campo claro control oscuridad, e) fluorescencia del control oscuridad (50 min). 203

Figura 57. Imágenes microscópicas de *e. coli*: a) campo claro, b) fluorescencia, control irradiación (30 min), pi (1 μm), c) campo claro, incubadas por 20 min con MNPSIn⁺ y pi (1 μm), d) fluorescencia, incubadas por 20 min con MNPSIn⁺ e irradiadas 30 min. 203

Figura 58. Imágenes microscópicas de *S. aureus* incubadas por 20 min con C2 (3 μm) y PI (1 μm): a) campo claro, b) fluorescencia, antes de irradiar, c) luego de 30 min de irradiación (100x), d) imagen campo claro control oscuridad, e) fluorescencia del control oscuridad (50 min). 204

Figura 59. Imágenes microscópicas de *S. aureus* incubadas por 20 min con C4 (3 μm) y PI (1 μm): a) campo claro, b) fluorescencia, antes de irradiar, c) luego de 20 min de irradiación (100x), d) imagen campo claro control oscuridad, e) fluorescencia del control oscuridad (50 min). 204

Figura 60. Imágenes microscópicas de *S. aureus* incubadas por 20 min con C4 (3 μm) y PI (1 μm): a) campo claro, b) fluorescencia, antes de irradiar, c) luego de 20 min de irradiación (100x), d) imagen campo claro control oscuridad, e) fluorescencia del control oscuridad (50 min). 205

Figura 61. Sstructura química de los BODIPYs 193

Figura 62. Espectros de absorción uv-vis de: (a) F₅PH-BOD-H₂ (línea continua), F₅PH-BOD-BR₂ (línea discontinua), (b) MNP-F₄PH-BOD-H₂ (línea continua) y scattering de MNPSINH₂ (línea gris) (c) mnp-f₄ph-bod-br₂ (línea continua) y scattering de MNPSINH₂ (línea gris).y (d) espectros de emisión de fluorescencia de F₅PH-BOD-H₂ (línea continua), F₅PH-BOD-BR₂ (línea discontinua) y MNP-F₄PH-BOD-H₂ (línea gris). ($\lambda_{\text{exc}}=512$ nm). 195

- Figura 63.** Suspensión conjugado MNPSINH-F₄PH-BOD-H₂. irradiación uv de 254 nm (a). sin irradiación (b). 196
- Figura 64.** Fotooxidación de DMA (35 μ m). a) cambios en el espectro de absorción de dma sensibilizado por MNP-F₄PH-BOD-BR₂. b) gráficos de primer orden para BR₂-BOD-OAC (ref)(■), BR₂-BOD-PHF₅(●), MNP-F₄PH-BOD-BR₂ (▼) y H₂-BOD-PHF₅(▲), en ACN. (λ_{irr} =510 nm), δt_{irr} =5 min. 197
- Figura 65.** Curvas de sobrevivencia de a) *S. aureus* (~10⁸ UFC/ml) y b) *E. coli* (~10⁸ UFC/ml) tratadas con 0,5 mg (3 μ m de BODIPY inmovilizado) de MNPSINH-F₄PH-BOD-H₂ (►) y MNPSINH-F₄PH-BOD-BR₂ (◆), incubadas 30 min a 37 °C en oscuridad y posteriormente irradiadas por diferentes tiempos con luz visible. cultivo control: células sin ps e irradiadas (●). 199
- Figura 66.** Imágenes microscópicas de *E. coli* incubadas por 30 min con MNP-F₄PH-BOD-BR₂ (3 μ m) y PI (1 μ m): a) campo claro, b) fluorescencia, antes de irradiar, c) luego de 120 min de irradiación (100x), d) imagen campo claro control oscuridad, e) fluorescencia del control oscuridad (130 min). 201
- Figura 67.** Imágenes microscópicas de *E. coli* incubadas por 30 min con MNP-F₄PH-BOD-H₂ (3 μ m) y PI (1 μ m): a) campo claro, b) fluorescencia, antes de irradiar, c) luego de 120 min de irradiación (100x). 201
- Figura 68.** Imágenes microscópicas de *s. aureus* incubadas por 30 min con MNP-F₄PH-BOD-H₂ (3 μ m) y PI (1 μ m): a) campo claro, b) fluorescencia, antes de irradiar, c) luego de 25 min de irradiación (100x), e) fluorescencia del control oscuridad (30 min), respecto a la imagen campo claro d). 202
- Figura 69.** Imágenes microscópicas de *s. aureus* incubadas por 30 min con MNP-F₄PH-BOD-BR₂ (3 μ m) y PI (1 μ m): a) campo claro, b) fluorescencia, antes de irradiar, c) luego de 10 min de irradiación (100x), e) fluorescencia del control oscuridad (15 min), respecto a la imagen campo claro d). 202
- Figura 70.** imágenes microscópicas de *s. aureus* incubadas por 30 min con MNP-F₄PH-BOD-H₂ : a) campo claro, b) fluorescencia, antes de irradiar 203

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Proceso de inactivación fotodinámica para el tratamiento de tejidos infectados.	31
Esquema 2. Diagrama de Jablonski modificado para un ps	34
Esquema 3. Mecanismos de acción fotodinámica: tipo I y tipo II.	34
Esquema 4. Reacciones de oxígeno singlete: a) cicloadición [2+4], b) cicloadición [2+2] y c) adición 1,3-eno.	36
Esquema 5. Síntesis de porfirinas a partir de una mezcla binaria de aldehídos y pirrol.	44
Esquema 6. Síntesis de porfirina-ab ₃ a partir de dipirrometanos.	46
Esquema 7. Reacción de porfirina monocarboxílica con EDC y NHS.	69
Esquema 8. Síntesis de MNPNH-TCPP y MNPSINH-TCPP.	70
Esquema 9. Reacciones de identificación de grupos amino	72
Esquema 10. Síntesis de ADMP.	73
Esquema 11. Síntesis de F ₅ APP y F ₁₀ APP.	75
Esquema 12. Representación de los conjugados MNPSINH-F ₄ APP y MNPSINH-F ₉ APP.	76
Esquema 13. metodología de trabajo para la obtención de los diferentes conjugados derivados de MNPSINH-F ₁₉ TPP.	77
Esquema 14. Síntesis de los conjugados C1, C2, C3 y C4.	79
Esquema 15. Síntesis de los conjugados MNPSINH-F ₄ PH-BOD-BR ₂ y MNPSINH-F ₄ PH-BOD-H ₂ .	81
Esquema 16. Reacción de abmm con O ₂ (¹ δ _g).	83
Esquema 17. Reacción de dma con O ₂ (¹ δ _g).	85
Esquema 18. Reacción de trp con el oxígeno O ₂ (¹ δ _g).	86
Esquema 19. Método de recuperación de los conjugados nanopartícula magnética-porfirina para su posterior reutilización.	93
esquema 20. Reacción entre D-manitol y ROS del mecanismo tipo I	157

Símbolos

Δ : cambio o variación

ϵ : Coeficiente de absorción molar

HO \cdot : radical hidroxilo

k_{obs} : Constante de velocidad observada

IC: Conversión interna

ISC: Entrecruzamiento de sistemas

λ_{em} : Longitud de onda de emisión

λ_{ex} : Longitud de onda de excitación

λ_{irr} : Longitud de onda de irradiación

μM : micromolar

Φ_F : Rendimiento cuántico de fluorescencia

Φ_{Δ} : Rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete

Φ_T : rendimiento cuántico de producción de triplete.

$\text{O}_2^{\cdot-}$: radical anión superóxido

$\text{O}_2(^3\Sigma_g)$: oxígeno molecular en estado fundamental

$\text{O}_2(^1\Delta_g)$: oxígeno molecular singlete

A

A: absorbancia.

ABMM: 2,2'-(antraceno-9,10-diil)bis(metilmalonato) de sodio.

ACN: acetonitrilo.

Ar: argón

ATS: agar tripticasa soya.

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

B

(BF₃-O(Et)₂): trifluoruro de boro-éter etílico.

C

Cocos: bacterias con forma esférica

CTS: caldo tripticasa soya.

D

DCM: diclorometano.

DDQ: 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona.

DMA: 9,10-dimetilantraceno.

DMF: *N,N*-dimetilformamida.

D₂O: agua deuterada u óxido de deuterio.

F

FT-IR: espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*).

F₅APP: 5-perfluorofenil-10,15,20-tris-(4-(3-*N,N*-dimetilaminopropoxi)fenil)-porfirina

F₁₀APP: 5,15-bis(perfluorofenil)-10,20-bis(4-(3-*N,N*-dimetilamino propoxi)fenil) -porfirina

F₂₀TPP: 1,2,3,4-tetrakis(perfluorofenil)-porfirina

G

GC-MS: cromatógrafo gaseoso acoplado a un detector de masa.

H

h: horas

¹HNMR: espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón.

HPLC: cromatografía líquida de alta presión.

HOMO: orbital molecular de mayor energía ocupado

I

I: intensidad de emisión a una cierta λ por parte de una molécula

ICS: intercruciamiento de sistemas

***in situ*:** del latín “en el lugar” designa el análisis de un fenómeno exactamente en el lugar y condiciones donde el mismo se desarrolla

***in vitro*:** del latín “dentro del vidrio” se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo (estudios desarrollados con microorganismos en el laboratorio)

***in vivo*:** del latín “dentro de lo vivo” se refiere a experimentación hecha dentro o en el tejido vivo de un organismo vivo

L

LED: diodo emisor de luz (*light emitting diode*), fuente de luz

LUMO: orbital molecular de más baja energía desocupado

M

MNP: núcleo magnético Fe₃O₄

MNPSI: núcleo magnético recubierto con sílica

MNPNH₂: núcleo magnético funcionalizado con grupos amino

MNPSINH₂: núcleo magnético recubierto con sílica y funcionalizado con grupos amino

MNPSIN⁺: núcleo magnético recubierto con sílica y funcionalizado con grupos amino metilados

MNPNH-TCPP: conjugado NP-porfirina TCPP, con NP recubiertas sin sílica

MNPSINH-TCPP: conjugado NP-porfirina TCPP, con NP recubiertas con sílica

MNPSINH-F₄APP: conjugado NP-porfirina F₅APP

MNPSINH-F₉PAP: conjugado NP-porfirina F₁₀APP

MNPSINH-F₁₉TPP: conjugado NP-porfirina F₂₀TPP

MNPSIN⁺-F₁₉TPP: conjugado NP-porfirina F₂₀TPP. Grupos amino de las NP metilados

MNPSINH-F₁₆TPP-N: conjugado NP-porfirina F₂₀TPP modificada *in situ*

MNPSIN⁺-F₁₉TPP-N⁺: conjugado NP-porfirina F₂₀TPP modificada *in situ*. Grupos amino de las NP y de la porfirina, metilados.

MNPSINH-F₄Ph-BOD-H₂: conjugado NP-BODIPY F₅Ph-BOD-H₂

MNPSINH-F₄Ph-BOD-Br₂: conjugado NP-BODIPY F₅Ph-BOD-Br₂

MS: espectroscopia de masa

MSSA: *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

N

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

ns: nanosegundos

NP: nanopartícula/s

O

ON: *overnight*. Cultivo celular con un crecimiento de aproximadamente 12 h.

P

PBS: buffer fosfato salino.

PDI: inactivación fotodinámica.

PDT: terapia fotodinámica.

PpIX: protoporfirina IX.

ps: picosegundos.

PS: fotosensibilizador/es

⁰PS: estado fundamental del fotosensibilizador.

¹PS_n*: estado excitado singlete de mayor energía del fotosensibilizador.

¹PS*: estado excitado singlete del fotosensibilizador.

³PS*: estado excitado triplete del fotosensibilizador.

Q

Quencher: molécula que desactiva el estado excitado de otra molécula

Quenching: proceso mediante el cual una molécula desactiva el estado excitado de otra.

R

R_r: relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el solvente desde el origen de una placa de TLC.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

rpm: revoluciones por minuto.

T

τ: tiempo de vida del estado excitado de una molécula.

TCPP: 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxifenil)porfirina

TAPP: 5, 10, 15, 20-tetrakis(4-(3-*N,N*-dimetilaminopropoxi) fenil) porfirina

TPPS₄⁴⁻: 5, 10, 15, 20-tetra-(4-sulfonatofenil)porfirina.

TEA: trietilamina.

TFA: ácido trifluoracético.

THF: tetrahidrofurano.

TLC: cromatografía de capa fina.

Trp: L-triptófano.

U

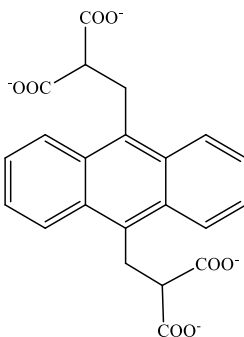
UFC: unidades formadoras de colonias.

UV: ultravioleta.

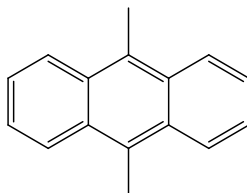
GLOSARIO DE ESTRUCTURAS DE MOLÉCULAS

Sustratos fotooxidables

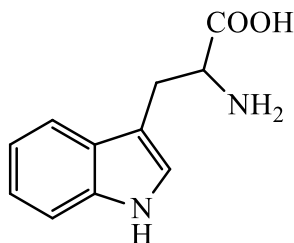
ABMM: Ácido 2,2'-(antraceno-9,10-diil)bis(acido metilmalónico)



DMA: 9,10-dimetilantraceno

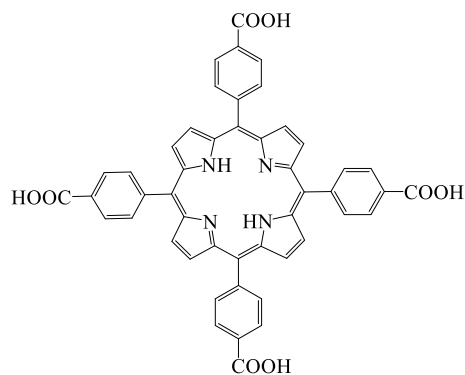


Trp: L-triptófano

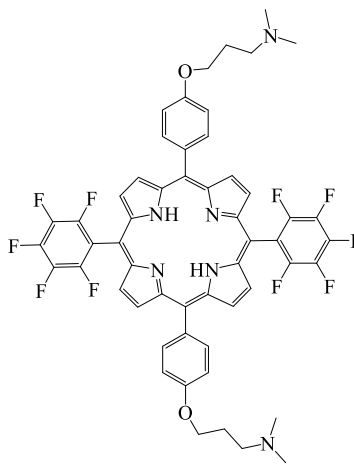


Fotosensibilizadores:

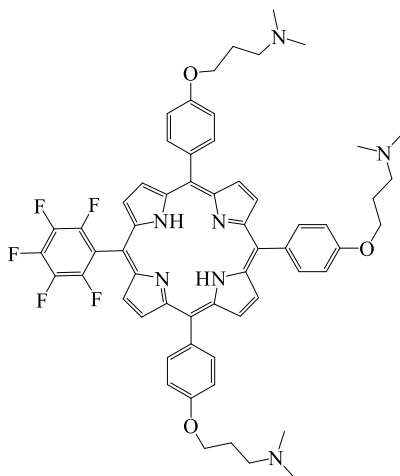
T CPP: porfirina tetraácida



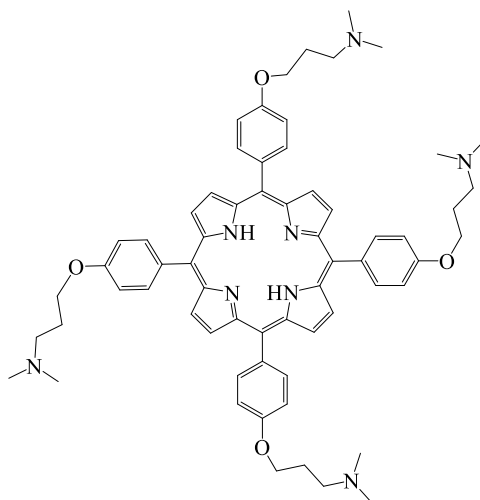
F₁₀APP (ABAB): 5,15-bis-(perfluorofenil)-10,20-bis-4-(3-*N,N*-dimetilamino propoxi)fenil porfirina.



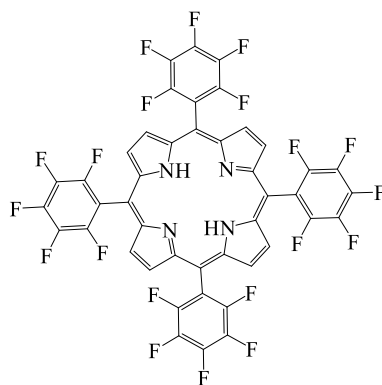
F₅APP (A₃B): -(perfluorofenil)-10,15,20-tris-4-(3-*N,N* dimetilamino propoxi)fenil porfirina



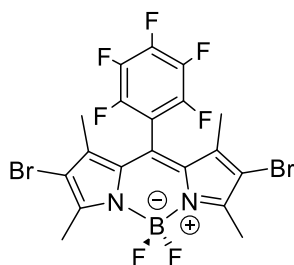
TAPP (A₄): 5,10,15,20-tetrakis-4-(3-*N,N*-dimetilamino-propoxi)fenil porfirina



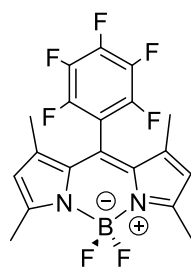
F₂₀TPP: 5,10,15,20-tetrakis (perfluorofenil) porfirina



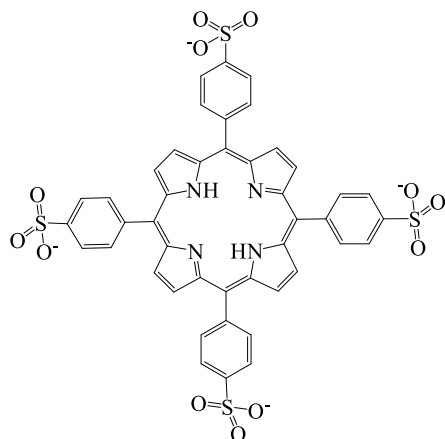
F₅Ph-BOD-Br₂



F₅Ph-BOD-H₂

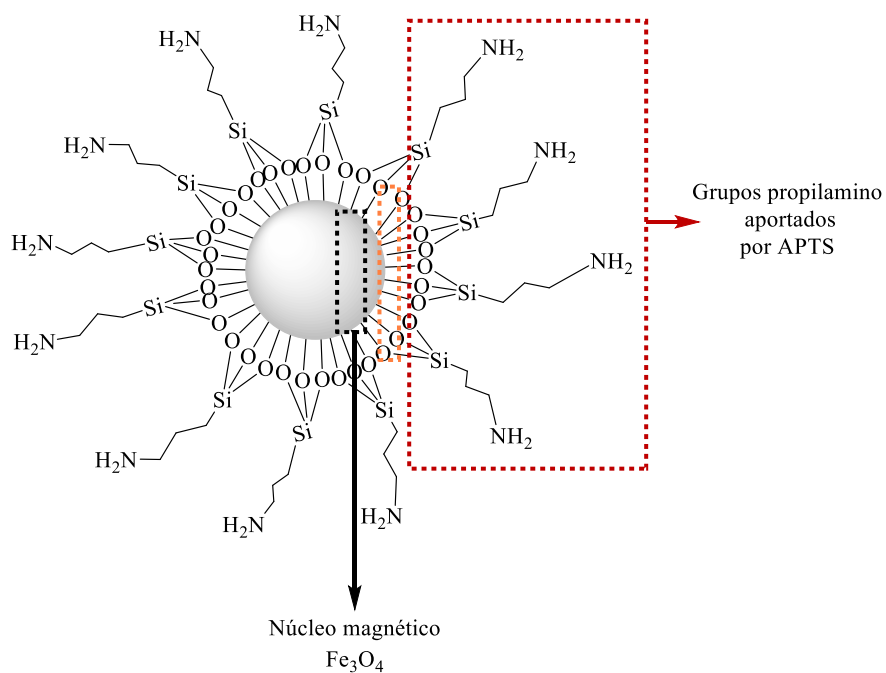


TPPS₄⁴⁻

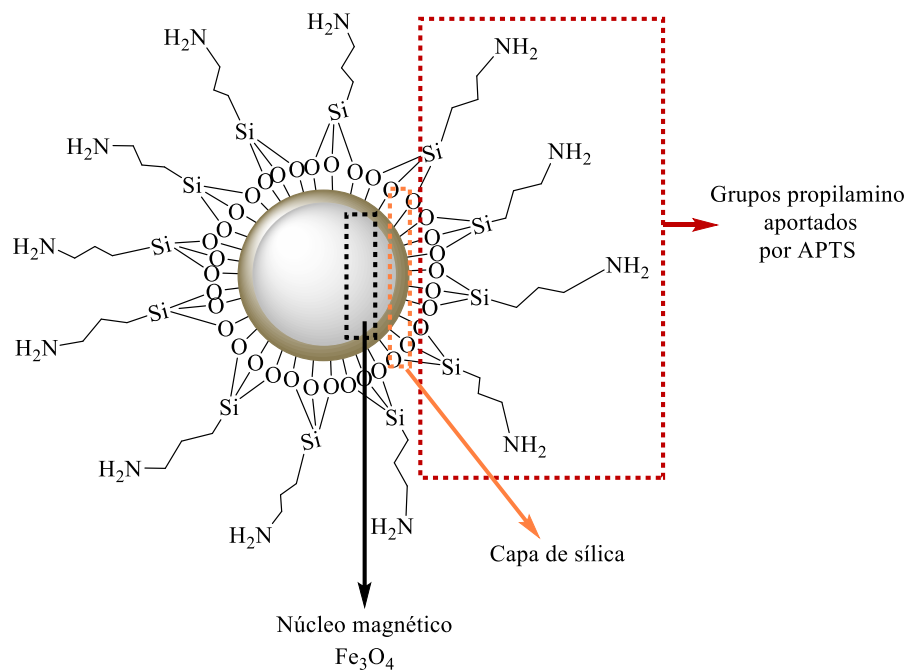


Nanopartículas magnéticas y conjugados:

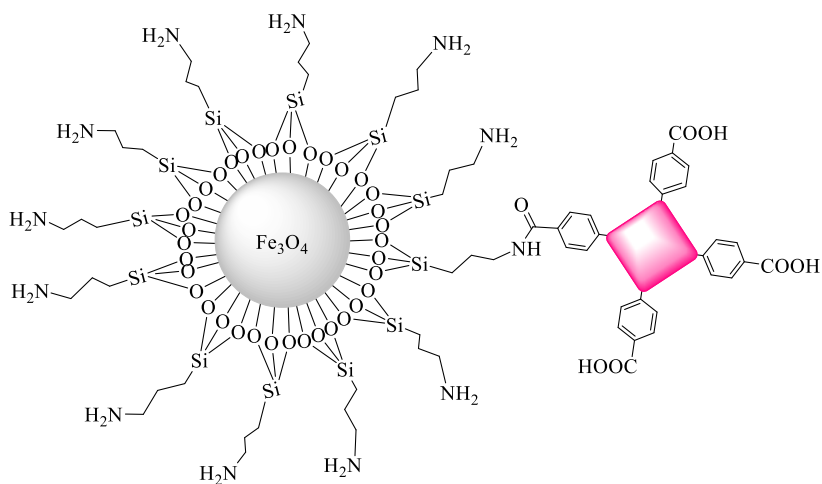
MNPNH₂: NP magnética funcionalizada con grupos amino



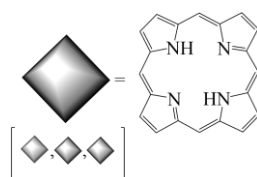
MNPSINH₂: NP magnética con una capa de sílice y terminaciones amino



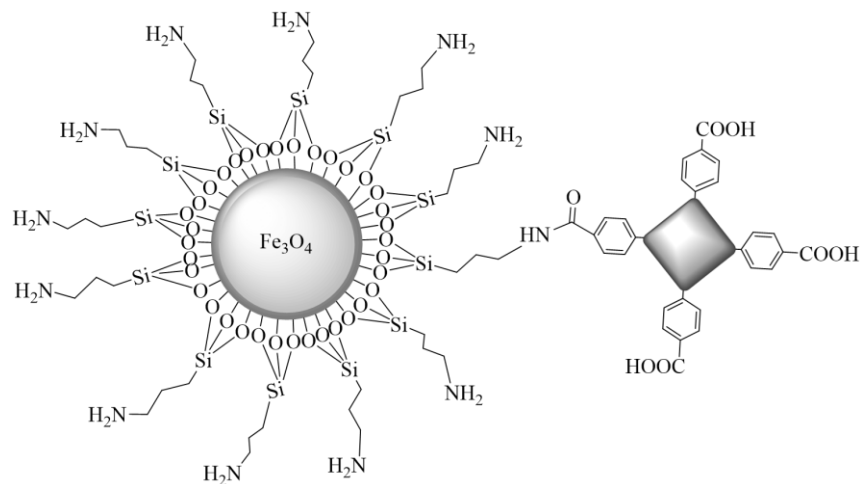
MNPNH-TCPP:



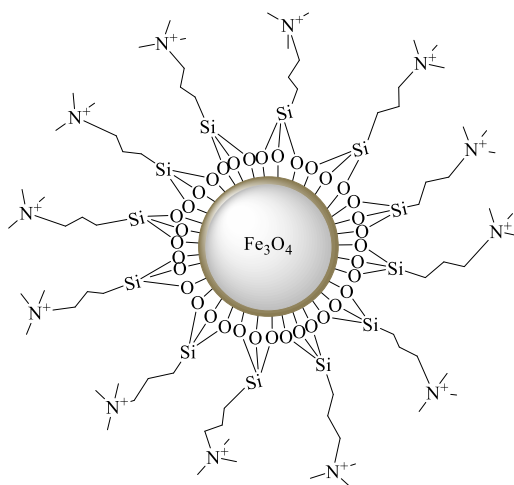
Anillo tetrapirrólico:



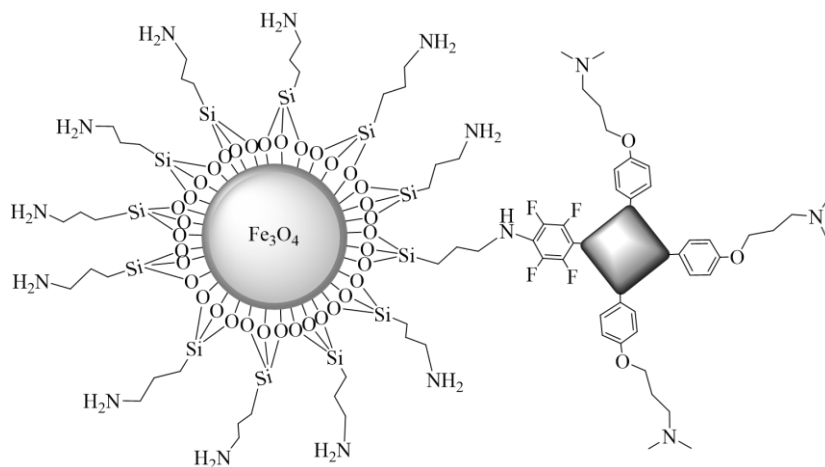
MNPSINH-TCPP:



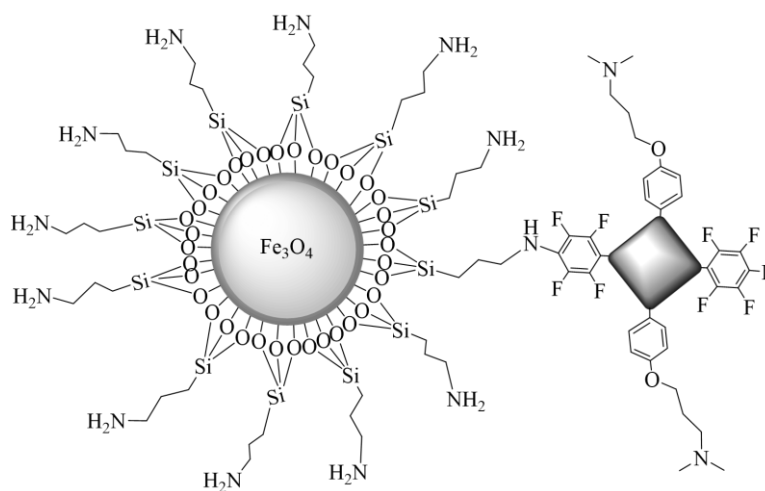
MNPSIN⁺:



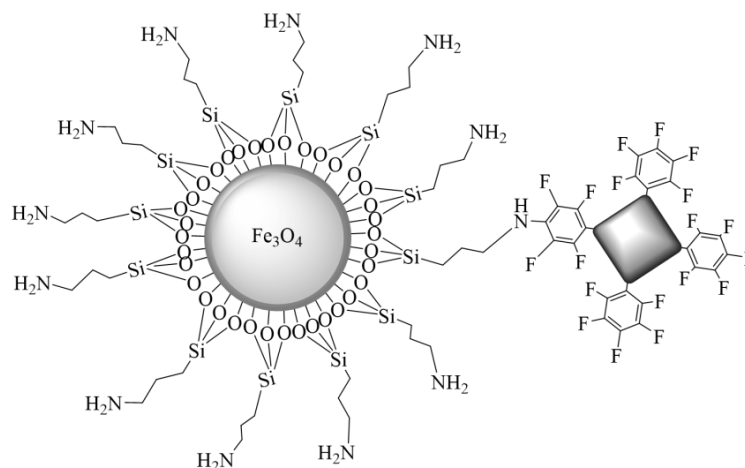
MNPSINH-F₄APP:



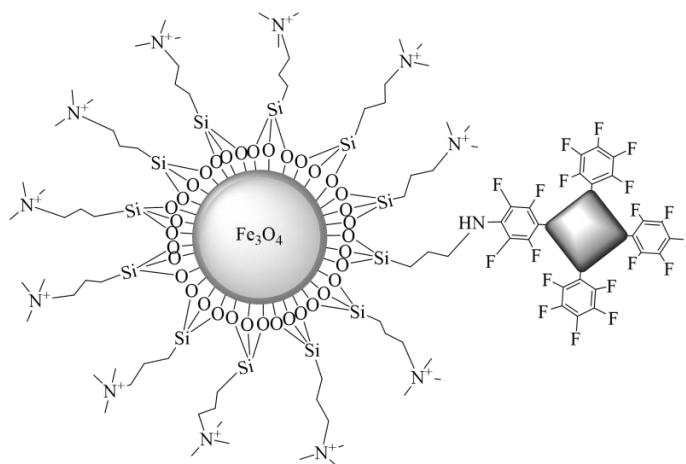
MNPSINH-F₉APP:



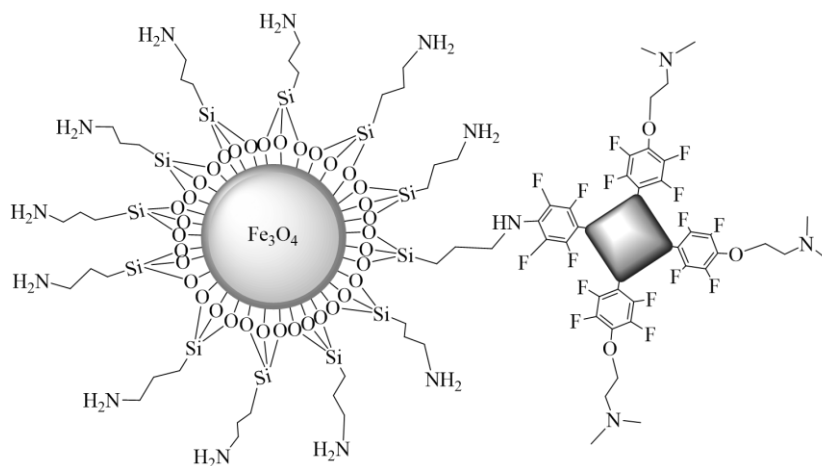
C1: MNPSINH- F₁₉TPP:



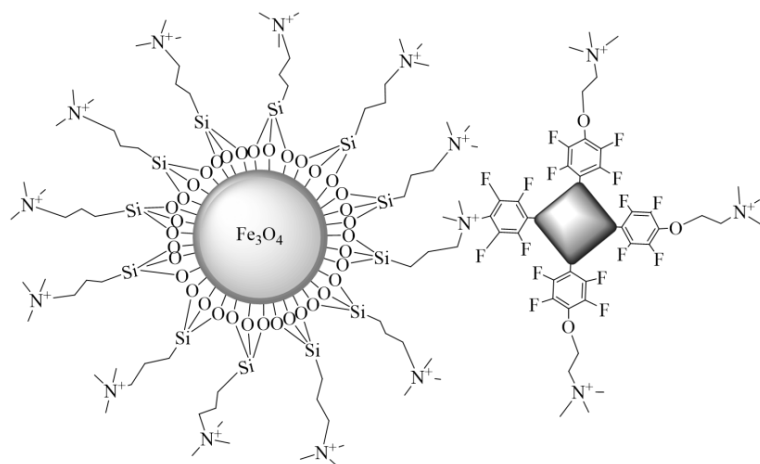
C2: MNPSIN⁺-F₁₆TPP:



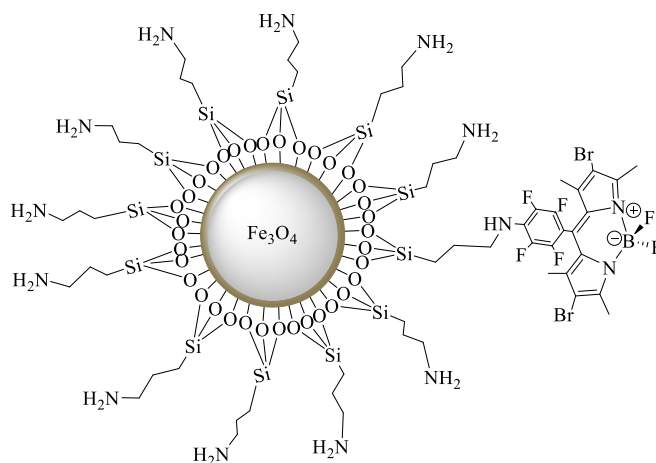
C3: MNPSINH-F₁₆TPP-N:



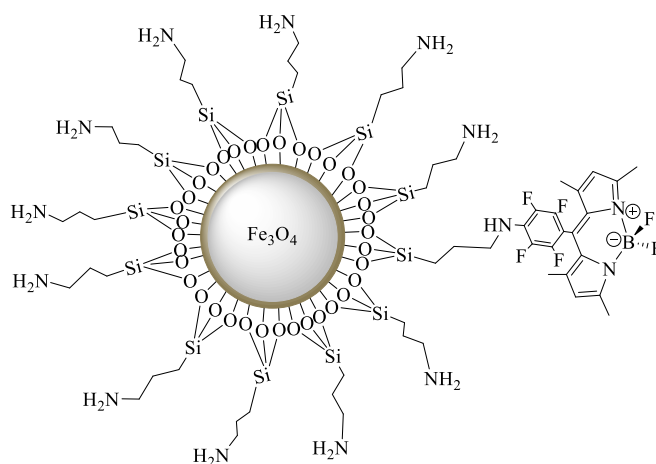
C4: MNPSIN⁺-F₁₆TPP-N⁺:



MNPSINH-F₄Ph-BOD-Br₂:

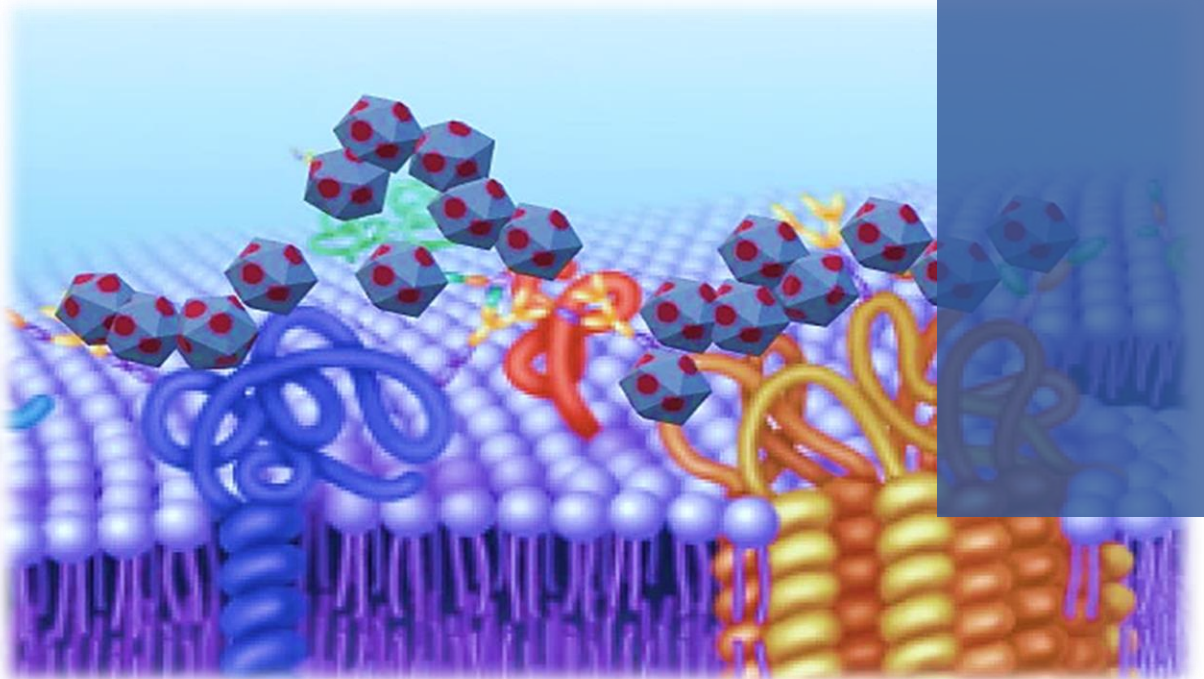


MNPSINH-F₄Ph-BOD-H₂:



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN



CAPÍTULO I

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Resistencia a los antimicrobianos: una problemática mundial

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es la capacidad de adaptación de los microorganismos que les permite crecer en presencia de antimicrobianos. Si bien cualquier tipo de microorganismo puede desarrollar esta capacidad, la problemática es más grave en las bacterias. Ante la variedad de antimicrobianos disponibles, los microorganismos pueden ser resistentes a uno, varios, la mayoría o todos ellos. Las consecuencias de una infección por gérmenes resistentes incluyen, entre otras, mayor duración de la infección, mayor mortalidad, internaciones más prolongadas, pérdida de protección en el uso profiláctico en cirugías y otros procedimientos médicos e incremento de los costos de la atención médica. Además, la prevalencia creciente de RAM en seres humanos y en animales amenaza con erosionar a la economía mundial por las pérdidas de productividad y el incremento de los costos de tratamiento. En la 68.^a Asamblea Mundial de la Salud celebrada en mayo de 2015 se aprobó un plan de acción mundial para luchar contra la resistencia a los antimicrobianos, incluida la resistencia a los antibióticos, que es el tipo de farmacoresistencia que más urge atajar ¹.

La resistencia a los antimicrobianos se está produciendo en todo el mundo; está minando la capacidad para tratar las enfermedades infecciosas y socavando muchos otros avances en los ámbitos de la salud y la medicina. El objetivo del proyecto de plan de acción mundial es garantizar, mientras sea posible, la continuidad de la prevención y el tratamiento satisfactorios de las enfermedades infecciosas con medicamentos eficaces, seguros y de calidad garantizada, que se usen de modo responsable y sean accesibles a todas las personas que los necesiten.

La resistencia a los antibióticos afecta a todos los países. Los pacientes con infecciones causadas por bacterias farmacoresistentes corren mayor riesgo de tener peores resultados clínicos y morir. Además, consumen más recursos sanitarios que los infectados por cepas no resistentes de las mismas bacterias. La resistencia de *Klebsiella pneumoniae* (bacteria intestinal común que puede causar infecciones potencialmente mortales) al tratamiento utilizado como último recurso (los antibióticos carbapenémicos) se ha propagado a todas las regiones del mundo. *K. pneumoniae* es una importante causa de infecciones intrahospitalarias, como la

neumonía, la sepsis o las infecciones de los recién nacidos y los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos. Debido a la resistencia, en algunos países los antibióticos carbapenémicos ya no son eficaces en más de la mitad de los pacientes con infecciones por *K. pneumoniae*.

La resistencia de *Escherichia coli* a una de las clases de medicamentos más utilizadas en el tratamiento de las infecciones urinarias (las fluoroquinolonas) está muy generalizada. En muchas partes del mundo hay países en los que este tratamiento es ineficaz en más de la mitad de los pacientes.

La resistencia a los fármacos de primera línea para el tratamiento de las infecciones por *Staphylococcus aureus* (causa frecuente de infecciones graves en los centros sanitarios y en la comunidad) es generalizada. Se calcula que los pacientes con infecciones por *S. aureus* resistente a la meticilina² tienen una probabilidad de morir un 64% mayor que los pacientes con infecciones no resistentes.

La colistina es el último recurso para el tratamiento de infecciones potencialmente mortales por enterobacteriáceas resistentes a los antibióticos carbapenémicos. Recientemente se ha detectado resistencia a la colistina en varios países y regiones³, y ello hace que las infecciones por estas bacterias dejen de ser tratables.

Por otro lado, las infecciones por levaduras del género *Candida sp.* son cada vez más prevalentes en pacientes hospitalizados, especialmente en grupos de mayor riesgo como pueden ser pacientes con neoplasia hematológica bajo tratamiento de quimioterapia y en cuidados intensivos. La resistencia de *Candida sp.* representa un reto terapéutico que deja un menor número de posibilidades para el tratamiento de estas infecciones que se caracterizan, a su vez, por una alta morbimortalidad.⁴

En cuanto al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), se calcula que en 2010 el 7% de las personas que iniciaron un tratamiento antirretrovírico (TAR), en los países en desarrollo, tenían VIH farmacorresistente. En los países desarrollados la cifra era del 10-20%. Recientemente, algunos países han comunicado tasas de resistencia del 15% o más en quienes comienzan el tratamiento contra el VIH, y de hasta un 40% en quienes lo reinician. Es urgente que se preste atención a este problema.

El aumento de la resistencia tiene importantes repercusiones económicas, dado que los fármacos de segunda y tercera línea son, respectivamente, 3 y 18 veces más caros que los de primera línea.

En Argentina, según datos de la Red de Vigilancia de la RAM, WHONET-Argentina, obtenidos a través de una red de hospitales centinela distribuidos en todo el territorio, se ha encontrado la presencia de *Klebsiella pneumoniae* en más de 250 establecimientos de salud de alta y mediana complejidad. Se estima que, durante 2013, el riesgo de desarrollar una infección severa por esa bacteria habría alcanzado a 1 de cada 2000 personas internadas en el Área Metropolitana de Buenos Aires. Otra situación preocupante son las cepas bacterianas que poseen la capacidad adicional de subsistir y diseminarse por fuera de las instituciones de salud, afectando a la comunidad en general. Prueba de ello es *Staphylococcus aureus* “meticilino-resistente” que ha alcanzado niveles de prevalencia en la comunidad superiores a los observados a nivel hospitalario. Del mismo modo, y como consecuencia de la actividad antropomórfica, se han encontrado genes (con o sin los huéspedes bacterianos) que codifican mecanismos de resistencia antimicrobiana en fuentes de agua (ríos, estanques naturales de aguas, plantas de tratamiento de desechos urbanos y plantas potabilizadoras de agua) y en el agua a término, constituyendo una amenaza sin precedentes para la salud de la población general.⁵

I.1.1. Factores que aceleran la aparición y propagación de la RAM

La RAM es un fenómeno que aparece de forma natural con el tiempo, generalmente por modificaciones genéticas. Sin embargo, el proceso se ve acelerado por el mal uso y el abuso de los antimicrobianos. En muchos lugares hay un abuso y mal uso de los antibióticos tanto en las personas como en los animales, y es frecuente que se administren sin supervisión de un profesional. Como ejemplos de uso incorrecto se pueden citar su administración para tratar infecciones víricas (como los resfriados o la gripe), su uso como estimulantes del crecimiento de animales o para prevenir enfermedades en animales sanos.

Los microbios resistentes a los antimicrobianos están presentes en las personas, los animales y el medio ambiente (agua, suelo y aire). Estos pueden transmitirse de persona a persona o entre las personas y los animales, inclusive a través de la alimentación de origen animal. El mal control de las infecciones, las condiciones sanitarias deficientes y la manipulación inadecuada de los alimentos fomentan la propagación de la RAM.

I.1.2. Medidas de prevención en Argentina

En 2015, la Resolución conjunta de los ministerios de Salud y ex Agricultura, Ganadería y Pesca No. 834/2015 Y 391/2015, con un abordaje interdisciplinario adoptado con el concepto “Una salud”, impulsado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), formalizó la Estrategia Argentina para el Control de la Resistencia Antimicrobiana. A través del Programa Nacional de Vigilancia de la RAM en animales de consumo, creado y aprobado mediante la Resolución Senasa 591/2015, se busca como objetivo primario determinar y monitorear de forma sostenida en el tiempo, la prevalencia de la resistencia de bacterias comensales y zoonóticas, a diferentes antimicrobianos de importancia en salud humana; y así poder evaluar posibles medidas que permitan retrasar o impedir la diseminación de bacterias resistentes y, de esta manera, minimizar su riesgo potencial sobre la salud pública y animal. El segundo objetivo es reducir la pérdida de eficacia de principios activos esenciales (antimicrobianos), priorizados a nivel internacional a través de un listado de “antimicrobianos de importancia crítica” por su uso esencial en medicina humana, y al tener estos en la actualidad escasos o ningún sustituto, el Senasa promueve la difusión de información sobre el uso responsable de los antimicrobianos y buenas prácticas agropecuarias, con la finalidad de minimizar la utilización de estos, sin comprometer la salud de los animales o la actividad de producción pecuaria.

I.2. Tratamiento de las enfermedades infecciosas

Las infecciones de las vías respiratorias inferiores continúan siendo la enfermedad transmisible más letal. En 2016 causaron tres millones de defunciones en todo el mundo. La tasa de mortalidad por enfermedades diarreicas, que se redujo casi un millón entre 2000 y 2016, fue de 1,4 millones de muertes en 2016. También ha disminuido el número de muertes por tuberculosis durante el mismo periodo, pero esta enfermedad continúa siendo una de las 10 principales causas de muerte, con 1,3 millones de fallecimientos. En cambio, la infección por el VIH/sida ya no figura entre las 10 primeras causas; si, en 2016, fallecieron 1,1 millones de personas por esta causa, en 2000 esta cifra se redujo hasta los 1,5 millones. Aproximadamente el 40 % de las muertes registradas en 2016 en países de ingresos altos se debieron a infecciones respiratorias, enfermedades diarreicas y VIH/SIDA. Sin embargo, la situación es aún más grave en países de ingresos bajos, donde el mismo grupo de enfermedades junto con el paludismo y

la tuberculosis, causan alrededor del 70 % de las defunciones, debido a controles sanitarios más deficientes.

Para disminuir el número de muertes causadas por enfermedades infecciosas, a nivel mundial se están realizando mejoras en los sistemas básicos e integrales de seguimiento, en la monitorización y prevención de la RAM. Tanto en los países de altos como de bajos ingresos, de a poco se están estableciendo políticas que garantizan la seguridad e higiene, el acceso al agua potable, el control de las infecciones en los centros sanitarios y la vacunación. Sin embargo, es imperativo el desarrollo de nuevas drogas y metodologías antimicrobianas.⁶ Algunos de los tratamientos antimicrobianos alternativos que se han desarrollado son:

- Modificación del fenotipo bacteriano: tratamiento basado en cambiar las características morfológicas y de desarrollo, además de las propiedades bioquímicas, la conversión fenotípica a la resistencia a los antibióticos y el fenotipo menos virulento.⁷

- Terapia con bacteriófagos: consistente en la utilización de fagos (virus que invaden a las células bacterianas) que generalmente alteran el metabolismo bacteriano causando lisis.⁸

- Tratamiento con bacteriocinas: se trata de péptidos secretados por una amplia variedad de bacterias con el objetivo de eliminar la competencia del medio.⁹⁻¹⁰

Frente a la problemática de RAM se hacen necesarias más inversiones e innovaciones en la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos, vacunas y pruebas diagnósticas. Desde este enfoque, el presente trabajo de investigación pretende abordar un método alternativo al tratamiento de infecciones que no generen RAM y que pueda erradicar las enfermedades infecciosas que, desde hace años, son difíciles de combatir, generando un alto porcentaje de muertes en el mundo.

I.3. Inactivación fotodinámica: tratamiento alternativo al uso de antimicrobianos

La inactivación fotodinámica (PDI, del inglés *photodynamic inactivation*) surge como una de las metodologías alternativas para el tratamiento de microorganismos patógenos.¹¹

La PDI es un nuevo enfoque para matar o eliminar los patógenos que están infectando un tejido¹². Todos los estudios que han examinado la muerte de las bacterias resistentes a los antibióticos por PDI, han encontrado que son igual de susceptibles que sus homólogos no

tratados previamente ¹³ (o incluso más susceptibles ¹⁴). Por otra parte se está investigando la posibilidad de utilizar esta técnica no sólo para la aplicación en el campo de la clínica sino también, en aplicaciones medioambientales, más específicamente para la inactivación de microbios patógenos en el agua de consumo y aguas residuales o industriales ¹⁵⁻¹⁷.

I.3.1. Antecedentes de la PDI

Más de tres mil años antes de la era moderna, se trataba el raquitismo, entre otras enfermedades, mediante baños de sol, lo que se conocía como helioterapia ¹⁸. Estas prácticas pueden considerarse como fototerapias, ya que combinan la acción de la luz sobre el cuerpo del paciente, sin administrar ningún fármaco PS externo ¹⁹. A principios del siglo XIV a. C. las técnicas han ido evolucionando en países como la India y Egipto con la administración de extractos de plantas, que contienen psoralenos (Figura 1 a), a enfermos de psoriasis y vitiligo en combinación con la exposición a la luz solar ²⁰. Dichas técnicas se engloban en el término fotoquimioterapia, ya que las acciones terapéuticas se obtienen mediante la absorción de un fotón por un sensibilizador exógeno ¹⁹.

A principios del siglo XX, los científicos Oscar Raab y Hermann von Tappeiner (Universidad de Ludwig-Maximilian, Munich, Alemania), observaron que los paramecios (organismos unicelulares de la clase Protista) incubados con acridina (Figura 1b) morían al ser expuestos a la luz solar, pero sobrevivían en la oscuridad ²¹. Poco después von Tappeiner y el dermatólogo Múnich Jesionek fueron los primeros en utilizar este descubrimiento, como la base de una terapia, cuando pintaron la eosina (Figura 1 c), colorante de xanteno, en un carcinoma de células basales de la piel de un paciente e iluminaron con luz solar ²². Este fue el primer uso de la terapia fotodinámica (PDT, del inglés *photodynamic therapy*) para el tratamiento de una enfermedad. En 1904 estos investigadores establecieron la importancia del oxígeno atmosférico en este fenómeno y se propuso el término “acción fotodinámica” ²³, haciendo énfasis en el requerimiento de oxígeno para que la fotosensibilización ocurriese. En 1972, impulsada por los descubrimientos de los investigadores como Lipson y Baldes en los Estados Unidos., se informó el uso de un derivado de hematoporfirina, combinado con la luz roja para el tratamiento de cáncer de vejiga en animales ²⁴ y en los seres humanos ²⁵.

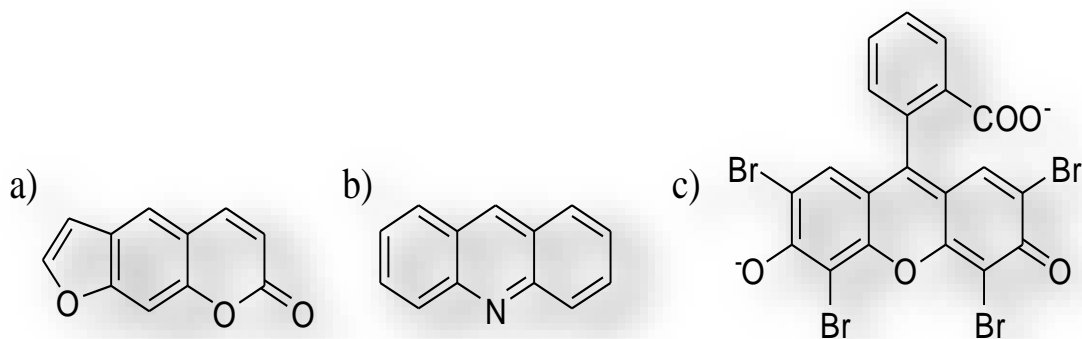


Figura 1. Estructura de la molécula a) psolareno, b) acridina y c) eosina.

En la actualidad, la fototerapia es una tecnología médica bien establecida, con aplicaciones tan diversas como la fotoestimulación de la biosíntesis de la vitamina D, el tratamiento de la hiperbilirrubinemia (ictericia) neonatal y de psoriasis, por ejemplo. La técnica se está extendiendo a afecciones que se caracterizan por un crecimiento excesivo de células no deseadas o anormales, tales como degeneraciones musculares relacionadas con la edad, hiperplasia protática benigna y enfermedades dermatológicas ²⁶⁻²⁷.

I.3.2. Generalidades de la acción fotodinámica

La acción fotodinámica hace referencia al efecto fotodinámico, el cual se basa en la inducción del daño o muerte celular mediante la combinación de luz visible, un agente fotosensibilizador (PS, del inglés *photosensitizer*) apropiado y oxígeno molecular en su estado fundamental triplete $O_2(^3\Sigma_g)$. Un PS es una molécula capaz de excitarse y transferir la energía a otras moléculas, cuando es irradiado con luz. Farmacológicamente es utilizado como droga xenobiótica que incrementa la fotosensibilidad de un organismo. Los PS derivados de macrociclos tetrapirrólicos están representados por: porfirinas, clorinas, bacterioclorinas, azaporfirinas, ftalocianinas, naftalocianinas y porfícenos (Figura 2). Algunos de estos se han propuesto en los últimos años como posibles agentes fototerapéuticos. ²⁸

Una de las aplicaciones médicas más importantes de la acción fotodinámica es la PDT para el tratamiento del cáncer, conocida también como fotoquimioterapia. Este tipo de terapia involucra la administración de un PS, el cual es incorporado y acumulado selectivamente en células tumorales. La posterior exposición de las mismas con luz de una longitud de onda apropiada provoca la muerte celular ²⁹⁻³². La PDT presenta un gran interés clínico para ser

aplicada en tratamientos, como los endoscópicamente accesibles, por ejemplo, tumores en pulmones y vejigas, como así también para tratamientos gastrointestinales y ginecológicos. En este último tiempo, nuevos PS se aplican en otros campos de la medicina como oftalmología y dermatología ^{29, 33}. En el presente, existe una gran variedad de aplicación de PS con efectos biológicos muy diversos, tales como herbicidas ³⁴⁻³⁵, insecticidas ³⁶⁻³⁸, antibacterianos ³⁹⁻⁴¹, antifungidas ⁴²⁻⁴³, antivirales ⁴⁴⁻⁴⁵. Además, muchos de ellos se aplican para la fotoesterilización de agua ⁴⁶, fluidos biológicos y sangre contaminados con organismos patógenos ⁴⁷⁻⁴⁸.

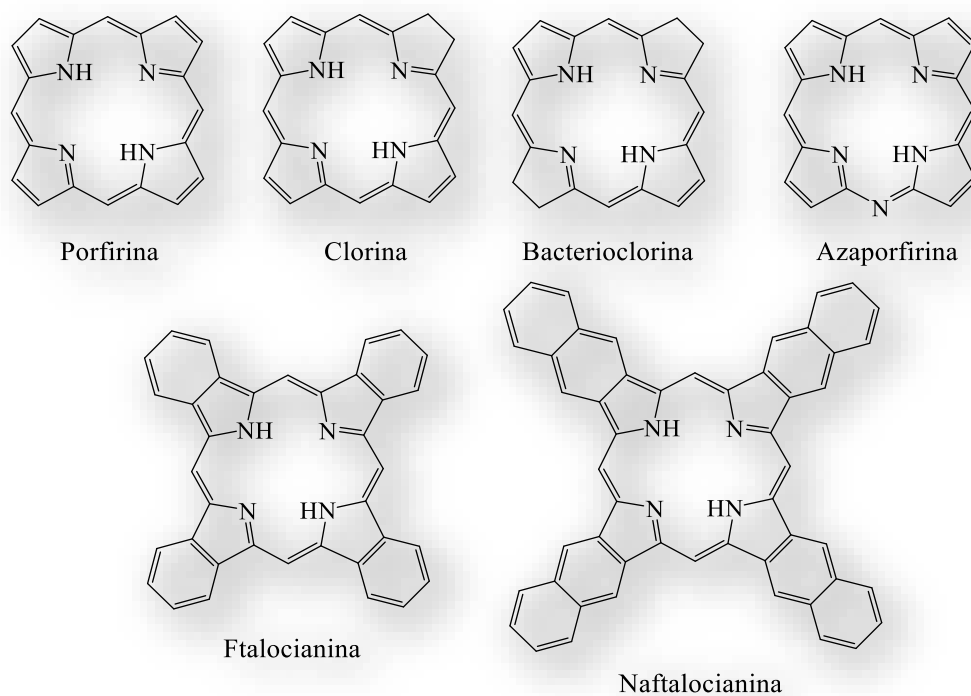


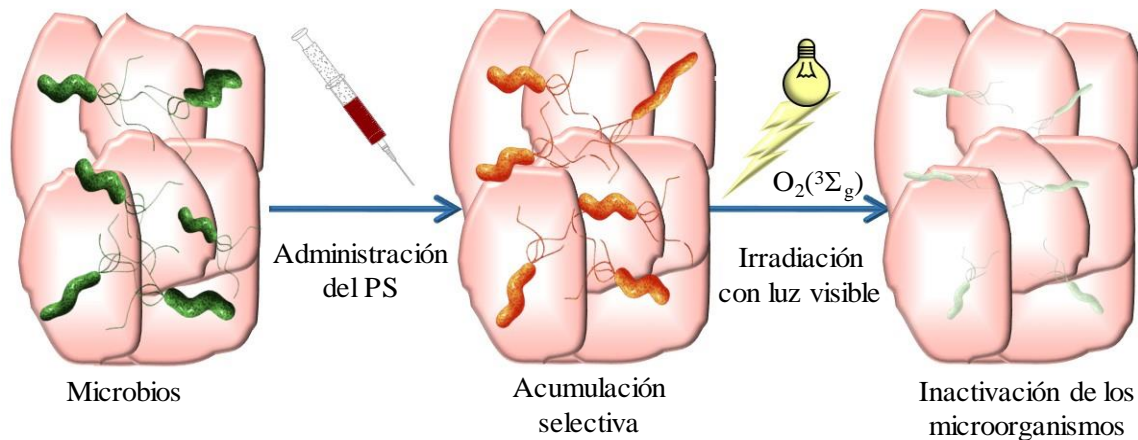
Figura 2. PS derivados de macrociclos tetrapirrólicos.

I.3.3. Fundamentos, condiciones óptimas y ventajas de la PDI

La PDI de microorganismos (Esquema 1) se basa en la administración de un PS, el cual se acumula preferencialmente en la célula microbiana. La subsiguiente irradiación con luz visible del área afectada, en presencia de oxígeno, induce la actividad fotodinámica a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por su denominación en inglés *Reactive Oxygen Species*). Dichas especies reaccionan con ciertas macromoléculas de la célula microbiana, lo que conduce a un daño letal en el microorganismo ⁴⁸⁻⁴⁹. La PDI posee la ventaja,

INTRODUCCIÓN

sobre otras terapias, en tener una selectividad dual, ya que, no sólo el PS puede ser específico de una clase de células, sino que también la luz puede ser irradiada puntualmente en el área afectada ⁵⁰. La selectividad del PS por las células microbianas se demostró experimentalmente por investigaciones *in vitro*. Estas ponen de manifiesto que los fibroblastos y queratinocitos (algunos de los compuestos más frecuentes de tejidos humanos) no muestran daños luego de ser irradiados con luz visible, en condiciones que provocan gran disminución en la supervivencia de agentes infecciosos típicos ⁵¹.



Esquema 1. Proceso de inactivación fotodinámica para el tratamiento de tejidos infectados.

La primera etapa de la PDI, depende del tiempo de incubación de las células patógenas con el PS. En el caso de los microorganismos, la unión debe ser de unos pocos minutos, independientemente del tipo de molécula que se emplee. Este paso es de suma importancia debido a que la dosis de PS es del orden micromolar. Así, a estas concentraciones no hay acumulación significativa de estas moléculas en las células mamíferas del huésped ⁵² La segunda etapa de la PDI, que consiste en la irradiación de una lesión infectada, se lleva a cabo unos pocos minutos después de la deposición tópica del PS.

Diversos estudios indican que la PDI es particularmente adecuada para el tratamiento de infecciones microbianas localizadas, incluyendo aquellas que se han vuelto crónicas después de tratamientos prolongados ⁵³⁻⁵⁵. Entre sus características favorables, se encuentran:

- La posibilidad de desarrollar regímenes de tratamiento que actúan de manera eficiente contra la mayoría de los patógenos microbianos, incluyendo bacterias Gram positivas y negativas, levaduras, hongos, protozoos y parásitos ⁵⁶⁻⁵⁸.

- La alta susceptibilidad exhibida por un gran número de cepas microbianas sin aparición de especies resistentes, incluso después de múltiples tratamientos ⁵⁹⁻⁶⁰.
- El bajo riesgo de inducir efectos genotóxicos y mutagénicos tanto en las células huésped como en las microbianas ⁶¹.
- La posibilidad de ser aplicada sola o combinada con otros antimicrobianos ⁶².
- La selectividad del agente por el microorganismo. El patógeno es inactivado con una concentración de PS y con una dosis de luz mucho más bajas que las necesarias para un efecto similar en células eucariotas ⁶³.
- La rápida velocidad de acción de la PDI en comparación con los antibióticos que normalmente requieren muchos días o semanas para ser eficaces, lo que hace más fácil que los microorganismos muten y se vuelvan resistentes a los fármacos ⁶⁴.
- La irradiación puntual sobre el área afectada lo que permite localizar el tratamiento. Incluso, infecciones profundas pueden ser asistidas con esta terapia, gracias a los avances continuos en la tecnología de fibra óptica ⁶⁵.

A pesar de todas las ventajas nombradas, el tratamiento está en pleno desarrollo y es imprescindible continuar con las investigaciones para encontrar, tanto los PS más eficientes, como la tecnología apropiada para su uso.

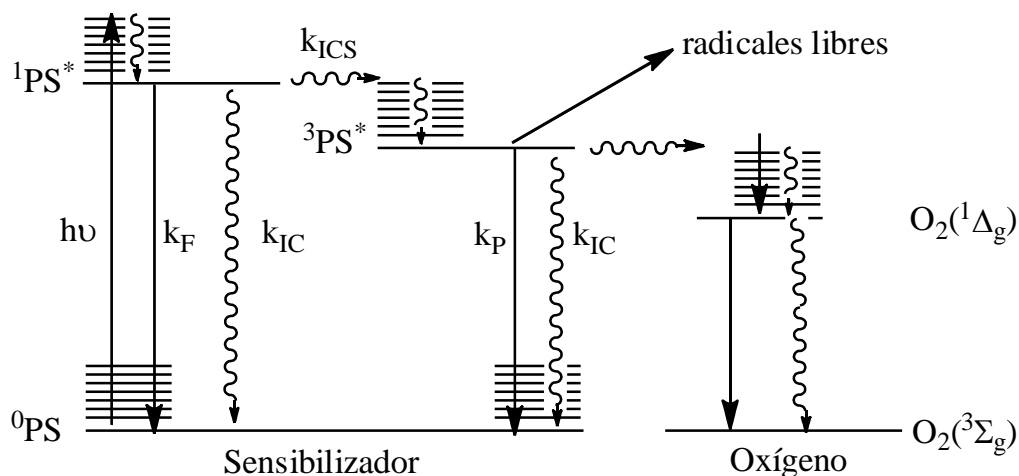
I.3.4. Mecanismos de fotosensibilización

La combinación de un PS, luz y $O_2(^3\Sigma_g)$ produce un daño bimolecular y ocurre básicamente por dos mecanismos. Inicialmente, el estado basal del PS (0PS) tiene un par de electrones apareados con espines opuestos en un orbital molecular, por lo que, es un estado singlete ⁶⁶. Cuando se irradia con luz de longitud de onda adecuada, uno de sus electrones es promovido desde el orbital molecular de más energía ocupado (HOMO) hacia el orbital molecular de menor energía desocupado (LUMO), constituyendo el estado excitado. Debido a que el electrón conserva su spin en el proceso, dicho estado se denomina estado excitado singlete ($^1PS^*$) y se caracteriza por tener un tiempo de vida corto (nanosegundos) ⁶⁶. El PS en el estado excitado puede perder su energía por la emisión de un fotón (fluorescencia) o convertirla en calor, lo que se conoce como relajación vibracional no radiativa. A su vez, el $^1PS^*$ puede sufrir un acoplamiento spin-órbita, produciendo un entrecruzamiento de sistemas (ICS) y pasar al estado

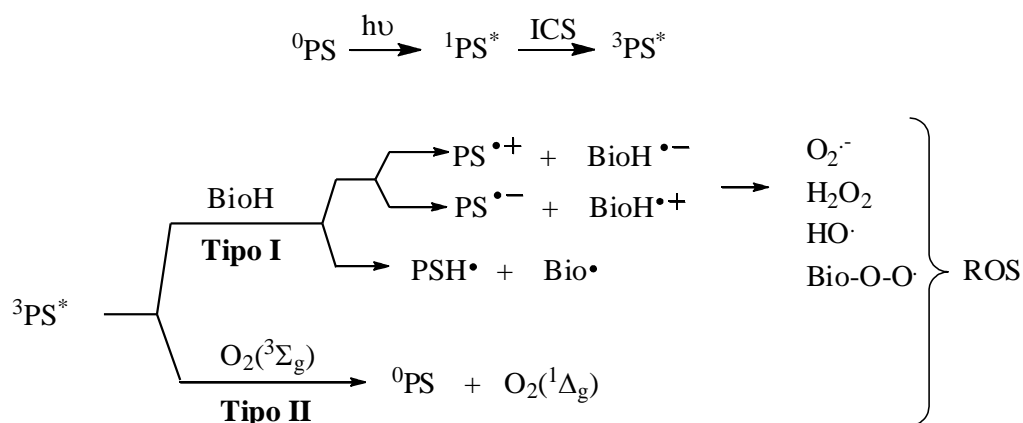
excitado triplete ($^3\text{PS}^*$). $^3\text{PS}^*$ tiene un tiempo de vida más largo que $^1\text{PS}^*$, del orden de micro y milisegundos, debido a que el electrón en el LUMO posee un espín paralelo al del HOMO. En estas condiciones, el estado excitado no puede volver fácilmente a su estado fundamental, ya que es un proceso prohibido por espín y por otro lado, no cumpliría con el principio de exclusión de Pauli ⁶⁶. Por lo tanto, en el estado excitado triplete, la energía del PS puede disiparse por un decaimiento térmico o por un proceso radiativo, conocido como fosforescencia.

Básicamente, pueden ocurrir dos mecanismos después de la fotoactivación del PS, los cuales son considerados los principales implicados en el fotodaño de células, llamados mecanismo Tipo I y Tipo II (Esquema 2 y Esquema 3):

- *Mecanismo Tipo I: transferencia de electrones o hidrógeno.* El sensibilizador $^3\text{PS}^*$ puede reaccionar con un sustrato de origen biológico (BioH), tal como una biomolécula, para formar radicales libres o iones radicales a través de una transferencia de electrones o de protones. La mayoría de estos radicales reaccionan instantáneamente con $\text{O}_2(^3\Sigma_g)$ para generar una mezcla de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^\bullet) ⁶⁷. Estos intermediarios son capaces de oxidar una amplia variedad de biomoléculas y producir la inactivación de las células de microorganismos. Al igual que H_2O_2 el radical OH^\bullet puede atravesar fácilmente las membranas biológicas produciendo los daños correspondientes ⁶⁸.
- *Mecanismo Tipo II: transferencia de energía.* En este proceso la energía del estado triplete del sensibilizador excitado ($^3\text{PS}^*$) es transferida a $\text{O}_2(^3\Sigma_g)$ para formar oxígeno singlete $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. La larga vida de $^3\text{PS}^*$ le permite reaccionar con el oxígeno en su estado fundamental y producir el daño oxidativo característico de la PDI ⁶⁹.



Esquema 2. Diagrama de Jablonski modificado para un PS



Esquema 3. Mecanismos de acción fotodinámica: Tipo I y Tipo II.

Formación de oxígeno molecular singlete

En el proceso de transferencia de energía de ${}^3\text{PS}^*$ a ${}^3\text{O}_2$, una única molécula de PS puede ir a través de varios ciclos produciendo moléculas de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. La molécula de oxígeno es excepcional debido a que su primer estado excitado tiene un valor de energía muy bajo, y la única condición para generar $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ es que ${}^3\text{PS}^*$ tenga una energía mayor a 0,96 eV (92,6 kJmol^{-1}). Considerando que la energía necesaria para pasar del estado singlete al triplete, de la mayoría de los PS es de 40 kJmol^{-1} , la transición para obtener ${}^1\text{PS}^*$ debe ocurrir a una longitud de onda menor que 850 nm.²⁹

El proceso de fotosensibilización del tipo II se puede dividir en dos etapas: la formación de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ y su posterior ataque al medio biológico. El rendimiento cuántico de formación de O_2

($^1\Delta_g$) (Φ_Δ) del PS es un parámetro importante para evaluar su potencial aplicación en PDI. En principio, $^1PS^*$ y $^3PS^*$ podrían generar $O_2(^1\Delta_g)$, sin embargo debido a que el tiempo de vida de $^1PS^*$ es relativamente corto (del orden de los nanosegundos), se supone que $^3PS^*$ es la especie responsable de la producción de la especie excitada del O_2 . El valor de Φ_Δ depende de las condiciones experimentales utilizadas para su determinación, como lo son el tipo de solvente y las características de PS.¹⁹

El valor de Φ_Δ puede determinarse usando diferentes métodos.⁷⁰ Uno de los métodos involucra la observación directa de la luminiscencia que produce la relajación del $O_2(^1\Delta_g)$ ~1270 nm. Otra posibilidad está basada en el análisis cuantitativo de reacciones que ocurren entre un sustrato orgánico o biológico (actinómetro) y el $O_2(^1\Delta_g)$. Un actinómetro ideal debe cumplir con ciertos requisitos para obtener valores confiables de la constante de reacción química (k_r): i) Los espectros de absorción del actinómetro y el PS no deben superponerse; ii) No deben producirse interacciones entre el estado fundamental y el estado excitado del actinómetro y el sustrato; iii) La reacción entre el actinómetro y $O_2(^1\Delta_g)$ debe ser sólo de naturaleza química e insignificante la desactivación física (los productos de la reacción no deben ser reactivos en las condiciones de reacción); iv) La presencia del actinómetro no debe modificar la concentración en estado estacionario del $O_2(^1\Delta_g)$.⁷¹

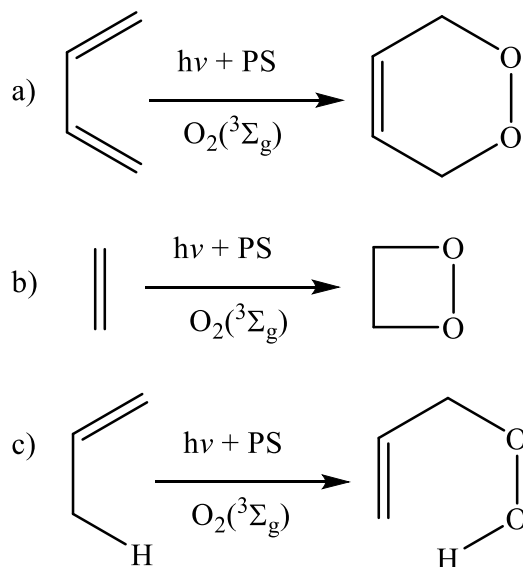
Reacciones de ROS

En general, los efectos nocivos de las ROS en la célula son daños al ADN, oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y oxidación de aminoácidos en las proteínas t (albúmina y globulina).

En particular, el $O_2(^1\Delta_g)$ reacciona con los dobles enlaces de estructuras macromoleculares cíclicas de forma diferente (Esquema 4):

- Puede participar en cicloadiciones de Diels-Alder, dando como resultado la formación de endoperóxidos puenteados.⁷
- Se adiciona a un doble enlace carbono-carbono para formar un anillo inestable de 1,2-dioxetano.⁷²
- Se añade a uno de los carbonos de un doble enlace, desplazándolo a un carbono vecino y formando un hidroperóxido (reacción eno).⁷³

Es así como el $O_2(^1\Delta_g)$ modifica las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos, específicamente tirosina, histidina y triptófano. Además, reacciona con los aminoácidos cisteína y metionina para formar varios sulfóxidos debido a las relativamente altas densidades de electrones que poseen los restos de azufre.⁸ Por otro lado, esta ROS puede conducir a la extensa carbonilación de proteínas y es responsable de la destrucción de grupos prostéticos (por ejemplo, el hemo en la catalasa).^{9, 74} Además, lleva a cabo reacciones de tipo eno con lípidos insaturados para formar hidroperóxidos. Reacciona con el colesterol para dar lugar a hidroperóxidos,⁷⁵ y con componentes del ácido desoxirribonucleico (ADN), particularmente con guanina y timina (nucleósidos de purina) para producir endoperóxidos inestables y altamente reactivos. Todas estas reacciones, inducen daños en ciertas biomoléculas, lo que conlleva a una pérdida de sus funciones biológicas conduciendo a la inactivación celular.



Esquema 4. Reacciones de oxígeno singlete: a) cicloadición [2+4], b) cicloadición [2+2] y c) adición 1,3-eno.

I.3.5. PDI de Microorganismos

Las células microbianas presentan diferentes características biológicas, morfológicas y fisiológicas, por lo que la susceptibilidad a los procesos de fotosensibilización pueden ser significativamente diferentes, según el microorganismo sobre el que se apliquen⁷⁶. En varios casos, las infecciones son causadas por una flora microbiana heterogénea, por lo que el protocolo aprobado para el tratamiento de estas infecciones debe ser eficaz y adecuado para un amplio espectro de microbios.⁵³

I.3.5.1. PDI de infecciones bacterianas

La estructura básica de una célula bacteriana consiste en una bicapa lipídica, la membrana plasmática, la cual encierra al citoplasma, una solución acuosa de proteínas, enzimas, nutrientes y sales, donde ocurren los procesos físicos y químicos que permiten la vida y que se caracteriza por contener a la molécula de ADN. A su vez, la mayoría de los microorganismos cuentan con una pared celular por encima de la membrana plasmática débil, que les confieren rigidez y los protege de las agresiones del medio ⁷⁷.

En 1884, el médico danés Christian Gram desarrolló un procedimiento de tinción que lleva su nombre, con el cual pudo diferenciar bacterias según la composición de su envoltura celular. Aquellas bacterias que se tiñen con el pigmento utilizado (violeta de cresilo) durante los procedimientos de tinción en el laboratorio, se denominan Gram positivas, mientras que las que no lo retienen son llamadas Gram negativas. ⁷⁸

Las bacterias Gram positivas contienen una pared celular formada por una capa gruesa de peptidoglucano (Figura 3). Este polisacárido se constituye principalmente de *N*-acetilglucosamina, *N*-acetilmurámico y los aminoácidos L-alanina, D-alanina, D-glutámico y lisina, o en otros casos, ácido diaminopimélico ⁷⁹. Los azúcares forman láminas que se mantienen unidas por péptidos, constituyendo una fuerte estructura tridimensional. Además, la pared celular contiene proteínas y una serie de polisacáridos denominados ácidos teicoicos, cuyos grupos fosfatos son responsables de la carga negativa presente en la pared.

Staphylococcus aureus, responsable de abscesos, dermatitis, infecciones localizadas y posibles gastroenteritis, también conocida como la bacteria intrahospitalaria; *Streptococcus pyrogenes*, causante de infecciones supurativas en el trayecto respiratorio, así como fiebre reumática; *Clostridium tetani*, responsable del tétanos; son ejemplos de bacterias Gram positivas.

Por otro lado, las bacterias Gram negativas poseen una capa delgada de peptidoglucano, la cual está unida a una segunda membrana externa por medio de lipoproteínas (Figura 4).

Dicha membrana está compuesta por lipopolisacáridos. El sistema de pared y membrana es altamente organizado, presentando un casi continuo de cargas negativas que están parcialmente neutralizadas por los cationes Mg^{2+} y Ca^{2+} , aportando a las bacterias una fuerte protección a ataques externos. Por esta razón, las Gram negativas son uno de los principales desafíos para cualquier tipo de tratamiento. *Neisseria gonorrhoeae*, causante de la gonorrea, *Neisseria*

INTRODUCCIÓN

meningitidis, causante de la meningitis, son algunos ejemplos de cocos gram negativos. Mientras que en bacilos gram negativos causantes de enfermedades podemos encontrar a *Klebsiella pneumoniae* (infecciones respiratorias), *Escherichia coli* (infecciones urinarias), *Salmonella typhi* (infecciones gastrointestinales), entre otras.

Estudios *in vitro* con microorganismos indican que las bacterias Gram positivas son susceptibles a la inactivación fotodinámica causada por diferentes PS, mientras que las Gram negativas muestran resistencia a la acción de agentes neutros, principalmente.⁸⁰

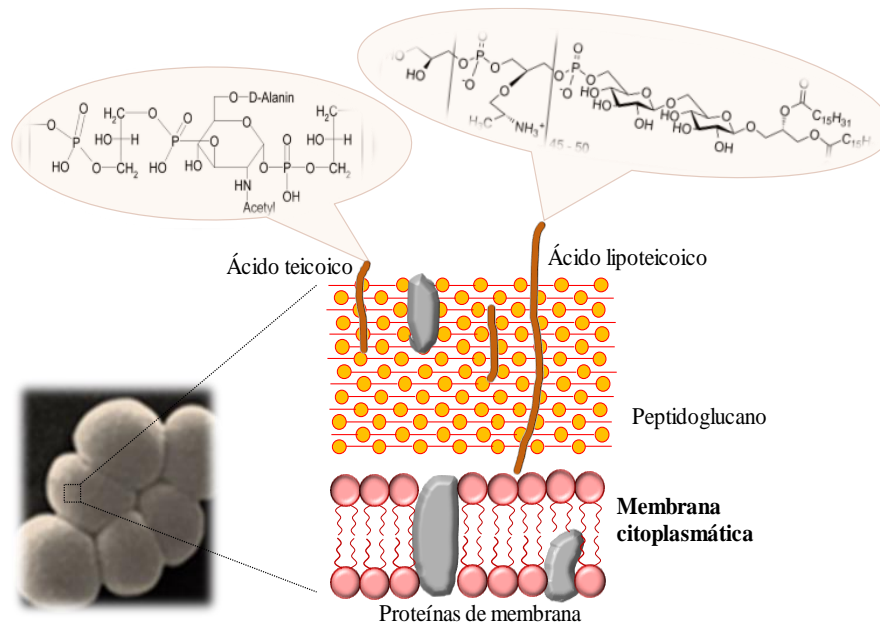


Figura 3. Membrana y pared celular de bacterias Gram positivas

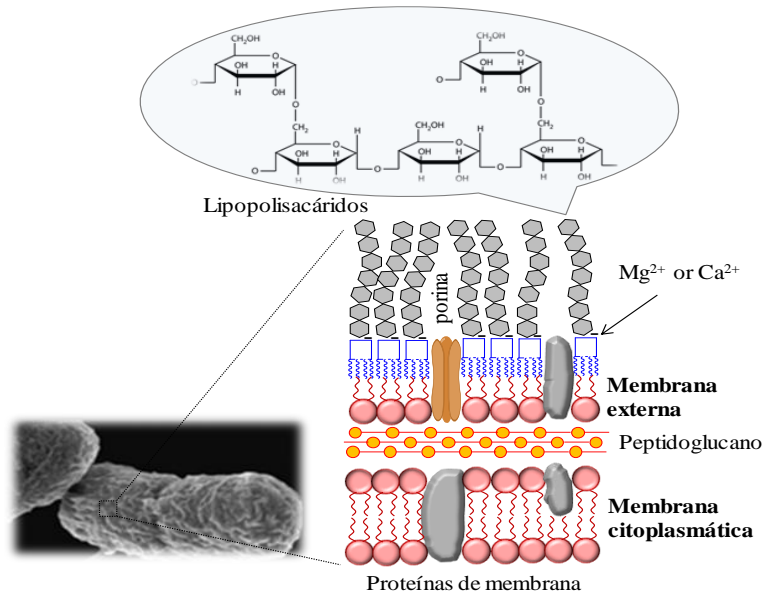


Figura 4. Membrana y pared celular de bacterias Gram negativas.

I.3.5.2. PDI de Infecciones fúngicas

Estas infecciones no solamente son causadas por agentes ya conocidos sino también por patógenos emergentes, considerados no patógenos o contaminantes de laboratorio. Además, el grupo de pacientes de riesgo aumentó debido a la pandemia del virus de inmunodeficiencia humana (HIV), lo que no sólo provocó un aumento en las infecciones causadas por hongos oportunistas, sino también por los agentes de micosis endémicas ⁸¹.

Las infecciones por *Candida albicans* (levadura, hongo unicelular), han aumentado notablemente en los últimos 30 años. Pueden ocasionar afecciones cutáneo- mucosas y sistémico-profundas en pacientes inmunocomprometidos. Las células de *C. albicans* están rodeadas por una pared celular rígida compuesta principalmente por polisacáridos solubles e insolubles, como quitina, β -glucanos y manoproteínas (Figura 5). La permeabilidad de la pared de los hongos es intermedia entre la permeabilidad de las paredes de *Gram* positivas y las *Gram* negativas. En consecuencia, la envoltura celular actúa como una barrera de permeabilidad muy efectiva, la cual es relativamente impermeable a drogas neutras y aniónicas ⁸².

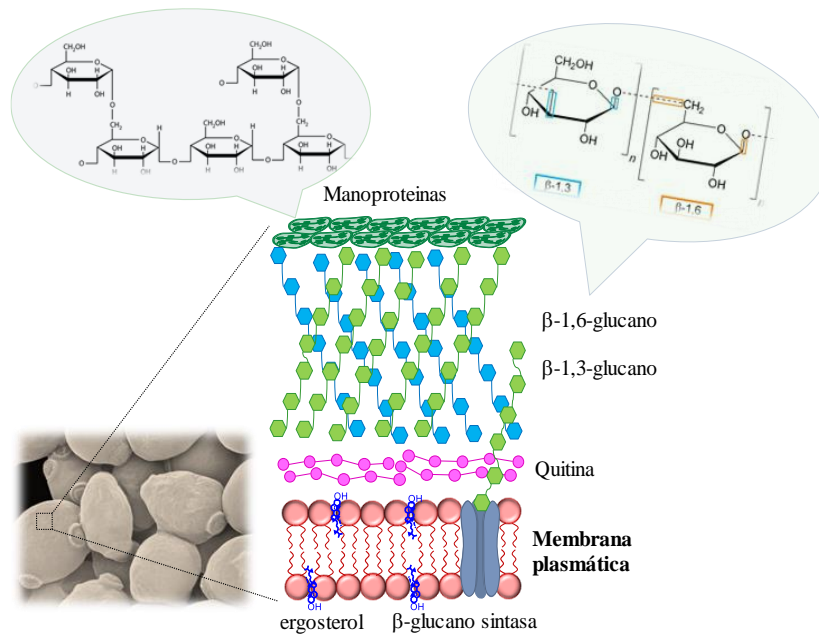


Figura 5. Membrana y pared celular de célula fúngica

I.3.6. Características de los PS para PDI

Teniendo en cuenta las características bioquímicas y morfológicas de las células microbianas, se pueden mencionar las siguientes propiedades de un PS que le permiten actuar de manera efectiva en la PDI de microorganismos:

- Proceso de síntesis reproducible y adecuado para la purificación correspondiente.
- Alto coeficiente de absorción (ϵ , $M^{-1}.cm^{-1}$) en las longitudes de onda a las cuales la luz penetra más profundamente en los tejidos (ventana terapéutica, 600-800 nm).
- Mínima toxicidad en la ausencia de luz.
- Largo tiempo de vida del estado excitado triplete, del orden de los micro o milisegundos, para producir eficientemente ROS.
- Alto rendimiento cuántico de formación de triplete (Φ_T) para favorecer la generación de ROS.
- Apropiada energía del estado triplete ($E_T > 95$ kJ/mol) para transferir eficientemente la energía al estado fundamental del oxígeno molecular.
- Emisión de fluorescencia adecuada, para poder detectar sus distribución en sistema *in vivo*.
- Buena solubilidad en fluidos biológicos. Las propiedades fotofísicas del PS varían según

éste se encuentre en forma monomérica o agregada, y por lo tanto esto afectará directamente el daño fotodinámico.

- Lipofilicidad moderada. Compuestos muy lipofílicos quedarán atrapados dentro de la membrana plasmática, mientras que las moléculas altamente hidrofílicas se ubicarán en el medio acuoso extracelular, dificultando la incorporación ²⁹.
- Fotoestabilidad adecuada. La fotodescomposición puede ser una ventaja o una desventaja en los tratamientos de PDI. Si se descompone muy rápido, el efecto fotodinámico puede ser incompleto, pero una velocidad de descomposición apropiada, la cual permita primero inactivar las células y luego eliminar el PS del medio, disminuye el efecto fotocitotóxico remanente.
- Alta selectividad por el microorganismo y baja toxicidad en otros tejidos. La síntesis de fotosensibilizadores asimétricamente sustituidos en la periferia del macrociclo permite la combinación de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos en una molécula sensibilizadora, produciendo un eje de polaridad intramolecular ⁸³. Este efecto puede producir una mejor incorporación, lo cual es un prerrequisito para un tratamiento fotodinámico efectivo ⁸⁴. El mecanismo de acción de los compuestos con actividad terapéutica está influenciado por sus propiedades fisicoquímicas y por las interacciones específicas (puente de hidrógeno, transferencia de carga, interacciones electrón dador-aceptor) y no específicas (causadas por efectos de polaridad-polarizabilidad) en las que puedan participar con el entorno biológico.
- Alta habilidad para inducir la inactivación celular, aún a bajas dosis de luz irradiada.
- Localización preferentemente en la membrana citoplasmática del microorganismo, debido a que allí se encuentran componentes que reaccionan con ROS, provocando la muerte celular por un daño en la membrana, en lugar de implicar el material genético ⁷⁶.

I.3.6.1. Porfirinas

I.3.6.1.1. Características generales

Los núcleos porfirínicos consisten de cuatro anillos del tipo pirrólico unidos por grupos metino originando un macrociclo (Figura 6). Las porfirinas son estructuras planas con un tamaño de aproximadamente 9 Å de diámetro y con una cavidad central de 4 Å que permite acomodar una gran variedad de iones metálicos logrando, de esta manera, variar las propiedades

del macrociclo. El aumento de sustituyentes en la periferia causa superposición de orbitales conduciendo a la deformación en la planaridad del macrociclo.

Las porfirinas son sistemas aromáticos, debido a que poseen 18 electrones π conjugados, que cumplen con la regla de Hückel. La energía de estabilización por resonancia no ha sido medida pero se estima que es de ~ 1200 kJ/mol¹⁹. El sistema es rígido y, en ausencia de sustituyentes, muestra considerable estabilidad térmica.

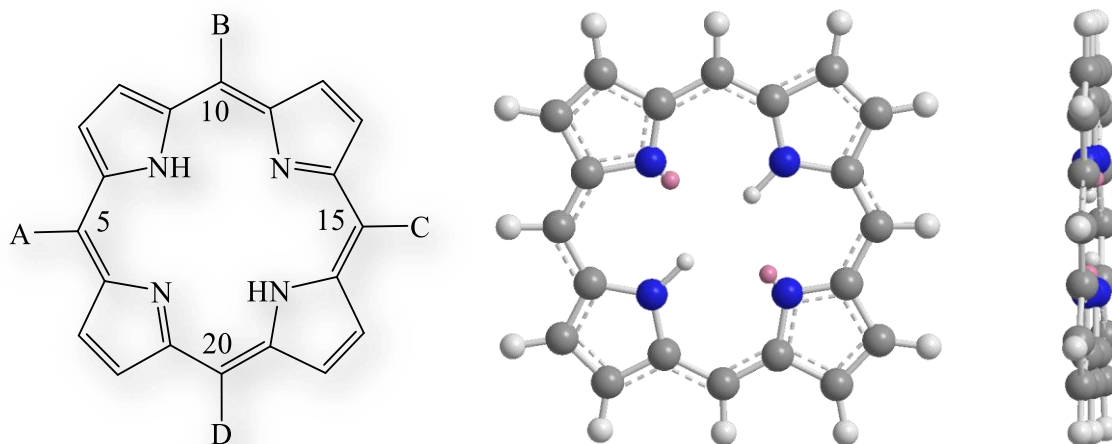


Figura 6. Estructura molecular del macrociclo tetrapirrólico de porfirinas (A, B, C y D representan grupos sustituyentes) (izquierda) e imágenes en tres dimensiones (3D) del macrociclo (derecha).

Estos PS son cristales de color púrpura, que al irradiarlos en solución presentan fluorescencia color roja. Debido a que su esqueleto básico es hidrofóbico, es necesario funcionalizarlas para mejorar su solubilidad en solventes polares. Algunas de ellas derivan de productos naturales, por ejemplo, la hematoporfirina de la sangre. Estos PS pueden ser obtenidos mediante síntesis químicas.

La elevada absorción en la zona visible del espectro, la estabilidad química aportada por su estructura aromática y la baja toxicidad en la oscuridad, son propiedades de las porfirinas que generan ventajas frente al uso de otros PS.

I.3.6.1.2. Síntesis de porfirinas

La síntesis de porfirinas es de suma importancia debido a que involucra un amplio espectro de aplicaciones científicas. El control de la disposición de diversos sustituyentes en la periferia

del macrociclo permite el diseño y adaptación para aplicaciones específicas. Existen dos patrones diferentes de sustitución, posición β o *meso*, como se indica en la Figura 7.

Las β -porfirinas se asemejan a otras porfirinas ya existentes en la naturaleza, mientras que las *meso*-porfirinas no presentan homólogos biológicos directos; sin embargo, se han encontrado amplias aplicaciones como modelos biomiméticos y como útiles componentes en materiales químicos ¹⁹. La popularidad de la síntesis de porfirinas *meso*-sustituidas es debida a su síntesis fácil, a partir de reactivos disponibles y no son necesarias condiciones de reacción extremas.

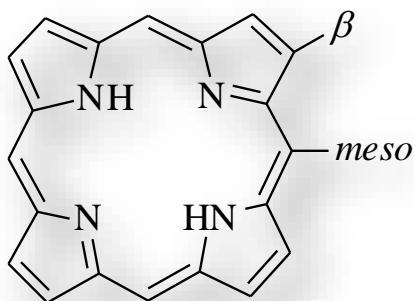
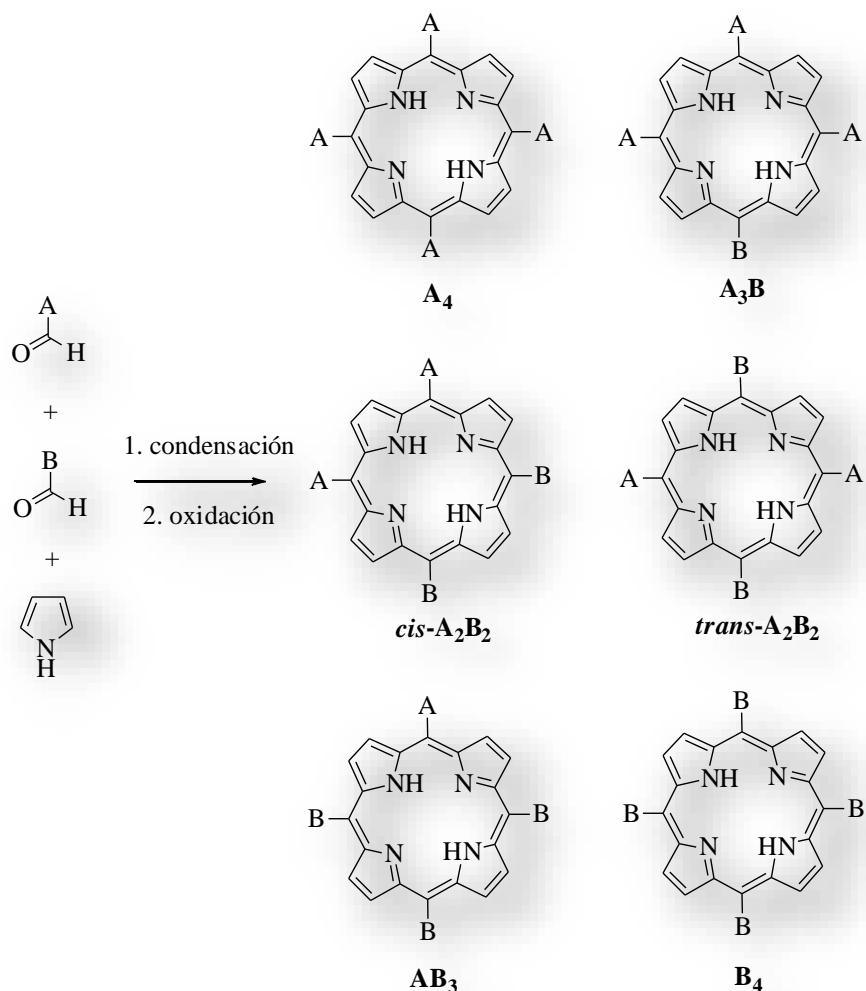


Figura 7. Posiciones *meso* y β sobre el macrociclo tetrapirrólico

Síntesis de meso-porfirinas asimétricas

Particularmente interesante es la síntesis de porfirinas sustituidas por una estructura molecular (A) que difiere de otro sustituyente (B) ⁸⁵. Las porfirinas asimétricas conteniendo dos tipos diferentes de sustituyentes en posición *meso* pueden ser preparadas por la condensación de una mezcla binaria de aldehídos y pirrol (Esquema 5) ⁸⁶.



Esquema 5. Síntesis de porfirinas a partir de una mezcla binaria de aldehídos y pirrol.

Sin embargo, la mayor limitación encontrada en estos procesos de síntesis es la distribución de los sustituyentes alrededor del anillo tetrapirrólico, dando lugar a la obtención de una mezcla de porfirinas (6 porfirinas son posibles de formar).

Suponiendo igual reactividad de los aldehídos, y una relación 1:1 de los mismos los rendimientos esperados serían: A_4 6,25%, A_3B 25%, $cis-A_2B_2$ 25%, $trans-A_2B_2$ 12,5%, AB_3 25% y B_4 6,25%⁸⁷. Las porfirinas de simetría AB_3 o A_3B son a menudo las más deseadas cuando se realiza la condensación con mezcla de aldehídos, y su rendimiento aumenta a un ~ 42% cuando la relación del aldehído conteniendo el sustituyente A respecto a B es 1:3 o A respecto a B es 3:1, respectivamente. Sin embargo, el porcentaje de rendimiento obtenido, depende directamente de la reactividad de los aldehídos, así como del proceso de purificación^{85, 88-89}.

Además, estos rendimientos están calculados basados en un cien por ciento de formación del macrociclo tetrapirrólico. Generalmente dicha formación no supera el treinta por ciento.

Síntesis de meso-porfirinas asimétricas a partir de dipirrometanos

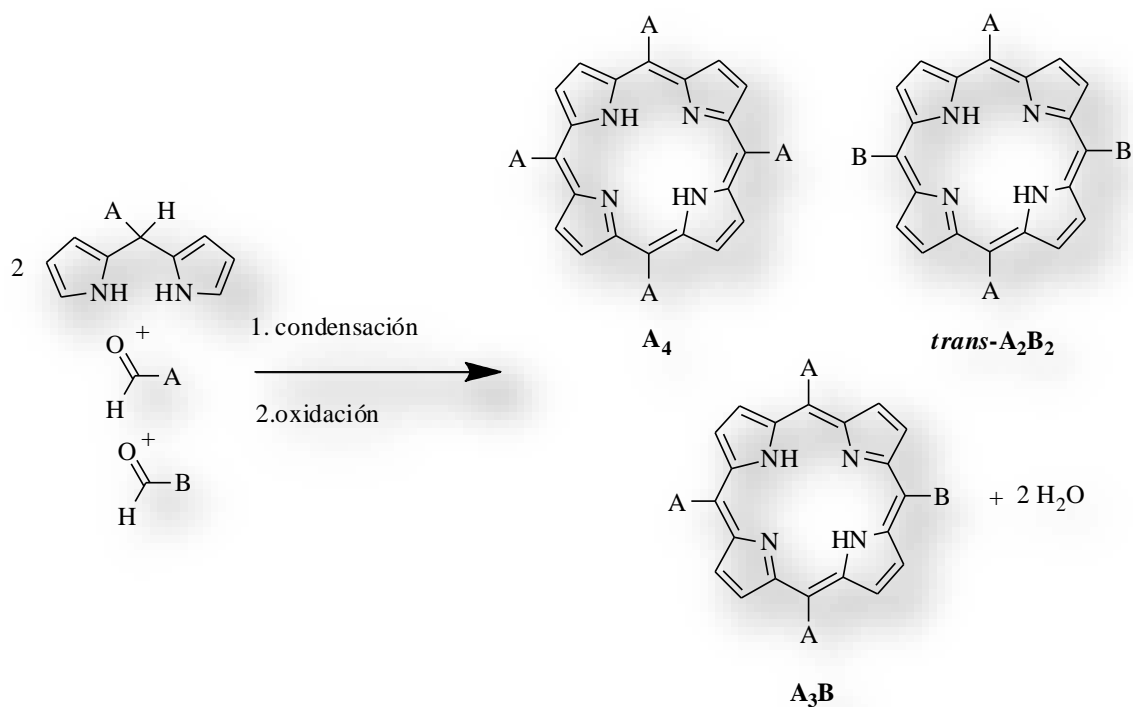
Porfirinas con simetría A₃B o AB₃

Resultan de suma importancia las porfirinas de simetría A₃B o AB₃ debido a que el sustituyente que se encuentra en menor proporción brinda la posibilidad de unir la porfirina con otras moléculas, y los tres grupos iguales permiten cambiar las propiedades físicas del macrociclo tetrapirrólico. Como se mencionó en la sección 1.5, la generación de un eje de polaridad intramolecular mejora la incorporación en células, lo cual resulta un requisito para un mejor efecto fotodinámico.

En los últimos años fue desarrollado un procedimiento conveniente para la síntesis de porfirinas A₃B o AB₃, el cual consiste en la condensación de dipirrometano con una mezcla binaria de aldehídos (Esquema 6)⁸⁵. Esta metodología permite obtener también la porfirina simétrica (cuatro grupos iguales) y la porfirina *trans*-A₂B₂, las cuales pueden separarse por técnicas cromatográficas. En general, este procedimiento presenta ventajas con respecto a la síntesis tradicional (mezcla binaria de aldehídos y pirrol), debido principalmente a un proceso de purificación más sencillo y a la obtención de la porfirina deseada con rendimientos ~5 veces superiores.

Si bien la importancia de las porfirinas asimétricas radica en la mejor incorporación del macrociclo tetrapirrólico en una célula microbiana, también resultan de suma importancia los fotosensibilizadores que contienen grupos catiónicos, los cuales son efectivos para la inactivación de bacterias Gram negativas y levaduras debido a que facilitan la interacción con la envoltura celular^{83,90}.

Las aminas alifáticas presentan una basicidad considerable, por lo cual podrían protonarse en las condiciones de trabajo en el medio biológico generando cargas positivas intrínsecas. En general, la síntesis de los dipirrometanos y porfirinas se realiza a partir de la condensación de aldehídos catalizada por ácidos. Sin embargo, cuando se emplean aldehídos sustituidos por grupos aminos, se presenta la dificultad de que estos neutralizan al catalizador frenando la reacción⁹¹⁻⁹².



Esquema 6. Síntesis de porfirina-AB₃ a partir de dipirrometanos.

Una de las alternativas para solucionar este problema es la protección de los grupos amino, formando derivados de amida⁹³. Esta metodología agrega dos pasos más al proceso de síntesis. Otra alternativa es la síntesis de dipirrometanos con sustituyentes básicos a altas temperaturas sin utilizar catálisis ácida. Posteriormente, este intermediario, más reactivo que la mezcla directa de aldehído y pirrol, puede utilizarse para la síntesis de la porfirina con exceso del catalizador ácido.

I.3.6.1.3. Características espectroscópicas y propiedades fotofísicas

Las porfirinas presentan dos tipos de bandas características en el espectro de absorción. Una banda intensa alrededor de 420 nm llamada banda *Soret* o *B*, con coeficiente de absorción molar $\epsilon \sim 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y cuatro bandas de menor intensidad en la zona comprendida entre 500-700 nm llamadas bandas *Q*, cuyo ϵ es de aproximadamente $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Figura 6 A). Los espectros de emisión de las porfirinas presentan dos bandas a ~650 y 720 nm para porfirinas base libre, las cuales fueron asignadas a las transiciones *Q*(0-0) y *Q*(0-1) (Figura 6 B)⁹⁴. Tales transiciones corresponden a los decaimientos desde el primer estado excitado a los dos primeros niveles vibracionales del fundamental (0 y 1 respectivamente). Debido a la estructura rígida que

caracteriza a los macrociclos tetrapirrólicos, los espectros de emisión presentan pequeños corrimientos de Stokes.

Las moléculas absorben la energía de la longitud de onda con las que son irradiadas y son excitadas desde el estado fundamental del PS, al primer estado excitado singlete u otro estado singlete de mayor energía ($^1PS_n^*$). Desde este estado, el PS disipa energía muy rápidamente ($\sim ps$) hasta alcanzar el $^1PS_1^*$, el cual tiene un tiempo de vida entre 1 y 5 ns. La desactivación al 0PS es realizada por fluorescencia o procesos de desactivación no radiativos (Esquema 2). En general para porfirinas base libre derivadas de tetrafenilporfirina, los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) tienen valores de $\sim 0,1$.⁹⁵ Alternativamente, puede producirse un entrecruzamiento de sistema (ISC) al primer estado excitado triplete $^3PS_1^*$. Este proceso es prohibido por las reglas de selección. Sin embargo, para las moléculas formadas por macrociclos estas reglas no pueden ser aplicadas con exactitud debido al acoplamiento espín-orbita. Esta es la razón por la cual la velocidad de ISC es muy alta para estas las porfirinas, dando como resultado una población elevada del $^3PS_1^*$. El estado $^3PS_1^*$ tiene un tiempo de vida (desde μs a ms) mucho mayor que el del $^1PS_1^*$, debido a que la transición al estado 0PS , no está permitida. El rendimiento cuántico de formación de tripletes (Φ_T) es del orden de 0,6-0,8. Desde el estado $^3PS_1^*$, la energía puede liberarse en forma de luz por fosforescencia, por conversión interna o ser transferida a otra molécula. En este último fenómeno, el cual es de crucial importancia en fotoquímica, el estado $^3PS_1^*$ decae al fundamental 0PS con la transferencia simultánea de su energía de excitación a una molécula aceptora (A), la cual es promovida a un estado excitado. En este proceso la porfirina actúa como un PS y aunque los fotones son absorbidos inicialmente por el macrociclo tetrapirrólico, es la molécula A la que termina finalmente en un estado excitado. Para que la sensibilización sea eficiente, la energía del estado $^3PS_1^*$ tiene que ser superior al estado excitado de la molécula A. El intercambio de energía intermolecular desde una especie a otra conduce a la población de estados excitados, los cuales muchas veces son inaccesibles mediante absorción directa.⁹⁶ Otro modo que tiene la porfirina en estado excitado para disipar su energía es mediante reacción química con moléculas en estado fundamental, conduciendo a la formación de productos. La mayoría de las reacciones químicas tienen lugar desde $^3PS_1^*$, debido a que el tiempo de vida de este estado en las porfirinas es mayor respecto al estado $^1PS_1^*$.⁹⁶

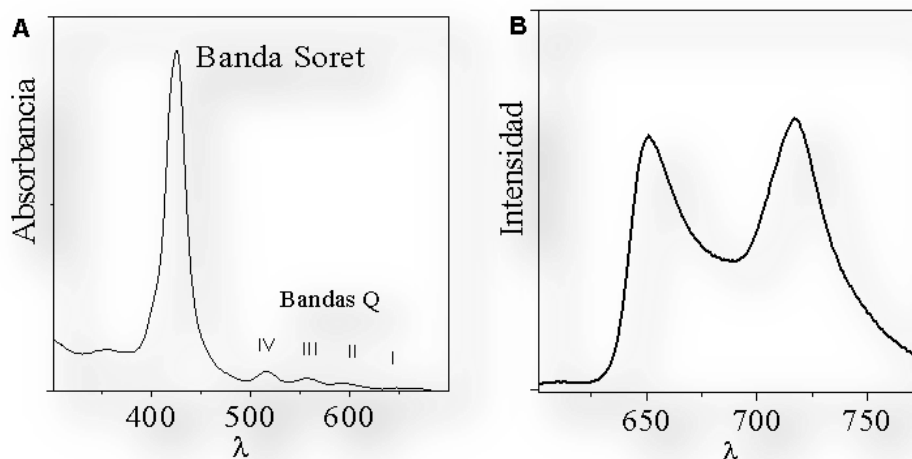


Figura 8. A) Espectro de absorción característico de una porfirina base libre. B) Espectro de emisión de fluorescencia característico de porfirinas.

I.3.6.2. BODIPYs

Los BODIPYs, compuestos generalmente apolares con estructura formal de zwitterión, están basados en el núcleo de 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indaceno, constituido por dos núcleos pirrólicos y un grupo BF₂, formando un complejo dipirrometénico·BF₂ (Figura 9). Por su analogía con los anillos tetrapirrólicos, se los suele llamar “hermanos menores de las porfirinas”.

Algunas de las propiedades más importantes de los BODIPYs involucran alta absorción y emisión de fluorescencia en el rango del visible, baja generación de estado triplete excitado, estabilidad fotoquímica, robustez química y buena solubilidad en solventes orgánicos.⁹⁷⁻⁹⁹ Estos complejos son estables a pH fisiológico, lo que combinado con una baja toxicidad los convierte en excelentes sondas para uso en sistemas biológicos. Así, estas estructuras han recibido un interés sustancial como fluoróforos en bioimagen, marcaje biológico y ensayos de fluorescencia

98, 100-104

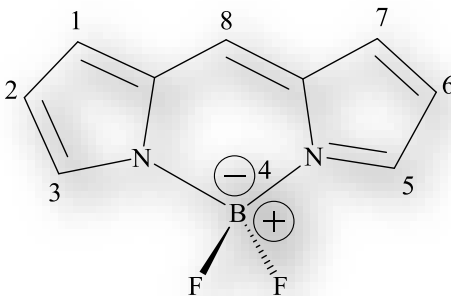


Figura 9. Estructura química de BODIPY.

La versatilidad de las vías sintéticas para obtención de BODIPYs permite utilizar diferentes estrategias para encontrar la relación adecuada entre estructura y características espectroscópicas y fotofísicas deseadas.¹⁰⁵ Por lo tanto, se han introducido átomos de halógenos, principalmente de iodo y bromo, lo cual permite generar el efecto de átomo pesado internamente, mejorando así la formación del estado triplete.¹⁰⁶ De esta manera, el fluoróforo BODIPY se puede cambiar a PS uniendo átomos pesados directamente en el anillo *s*-indaceno.¹⁰⁷

Por otro lado, los núcleos aromáticos en el BODIPY son ricos en electrones, por lo que experimentan fácilmente distintas reacciones de sustitución electrofílica aromática. De esta manera, pueden llevarse a cabo reacciones de nitración,¹⁰⁸ halogenación,¹⁰⁹⁻¹¹¹ formilación¹¹² y sulfonación.¹¹³ Estas vías sintéticas, permiten agregar diversos grupos funcionales en las posiciones 2 y 6, principalmente. Sin embargo, en los últimos años, se han desarrollado reacciones similares que permiten derivatizar otras posiciones de la estructura.¹¹⁴⁻¹¹⁵

En cuanto a las propiedades espectroscópicas, los BODIPYs no sustituidos muestran una banda de absorción estrecha a ~ 500 nm con un alto coeficiente de extinción molar ($\sim 10^5$ M⁻¹ cm⁻¹).¹¹⁶ La banda de absorción principal se atribuye a la banda vibracional 0-0 de una fuerte transición S0 \rightarrow S1. La sustitución en la posición *meso* del núcleo BODIPY no cambia significativamente la posición de esta banda de absorción.¹¹⁷

I.4. Inmovilización de PS

La mayoría de los PS altamente efectivos son hidrofóbicos e insolubles en agua. Sin embargo, para obtener un efecto fotodinámico eficiente, el PS debe mantenerse principalmente disuelto como monómero en el microentorno celular. Por lo tanto, la administración del agente fototerapéutico es uno de los principales desafíos en PDI de microbios. Así, varias estrategias

INTRODUCCIÓN

de encapsulación han sido estudiadas para evitar que el PS hidrofóbico forme agregados inactivos en un entorno acuoso ¹¹⁸. Por otro lado, la extensión del principio fotodinámico a una nueva tecnología respetuosa con el medio ambiente, sólo puede ser económicamente viable si el PS se inmoviliza en una matriz sólida, a fin de permitir su recuperación completa, después del proceso de fotoinactivación. En este sentido, el desarrollo reciente de la nanotecnología aplicada a la medicina ha abierto un nuevo frente de avance en el campo de la fototerapia. Las nanopartículas (NP) con un tamaño que varía de 1 a 100 nm (Figura 10), han generado expectativas para el suministro de agentes fototerapéuticos para producir una muerte efectiva de las células patológicas ¹¹⁹.

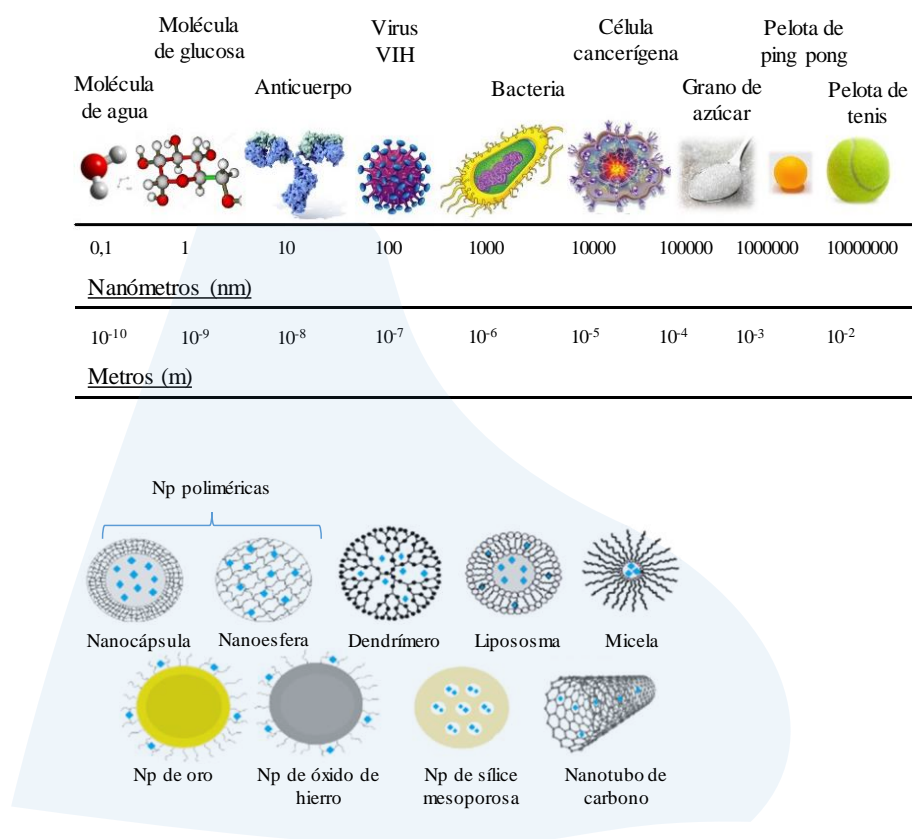


Figura 10. Representación de diferentes sistemas en escala nanométrica.

Diferentes tipos de NP han sido propuestas para la terapia fotodinámica (PDT), basadas principalmente en lípidos, lipoproteínas, polímeros, carbón, metales, semiconductores y sílice ¹²⁰. En particular, las NP de sílice fueron preparadas mediante la encapsulación de PS, tales como la protoporfirina IX (PpIX), 2-devinil-2-(1-hexiloxietil) pirofeofórbido (HPPH), *meso-*

tetrakis(3-hidroxifenil)clorina (mTHPC) y azul de metileno (MB) ^{118, 121-122}. Sin embargo, la adsorción no covalente de PS dentro de los poros de la cubierta de sílice pueden provocar la liberación del agente al medio ¹²³. Pocos estudios han explorado este enfoque. Bonnett informó la inmovilización de un PS por adsorción en quitosano y, también, en ácido tetrasulfónico por unión covalente. La evaluación fotomicrobica de estos sistemas mostró que el más eficaz es aquel en el que el PS se une covalentemente al polímero ¹²⁴.

El uso de PS inmovilizados sobre una superficie, con el fin de disminuir la carga microbiana por PDI, pretende abordar problemas de salud, económicos, ecológicos y públicos.

I.4.1. Nanopartículas magnéticas

Las NP magnéticas, han adquirido gran importancia y se han encontrado numerosas aplicaciones en campos como la biomedicina, diagnóstico y tratamiento de cáncer, biología molecular, bioquímica, en tecnología de ferrofluidos, entre otros. Esto se debe principalmente a que las propiedades de las NP magnéticas difieren fuertemente de las propiedades del material en bloque. Las propiedades magnéticas de este material están influenciadas por el tamaño de las partículas, dado que a escalas del orden de los 10 a 100 nm, las NP son consideradas como partículas monodominio, presentando propiedades superparamagnéticas que las hacen interesantes para aplicaciones tecnológicas ¹²⁵.

Las NP magnéticas ofrecen algunas posibilidades atractivas para la biomedicina. En primer lugar, tienen tamaños controlables que van desde unos pocos hasta decenas de nanómetros, lo que las coloca en dimensiones más pequeñas que las comparables a las de una célula (10-100 μm), un virus (20-450 nm), una proteína (5-50 nm), o un gen (2 nm de ancho y 10-100 nm de largo). Esto significa que pueden "acercarse" a una entidad biológica de interés. De hecho, pueden ser recubiertas con moléculas biológicas, para aumentar la interacción con células microbianas, proporcionando de este modo un medio controlable y selectivo ¹²⁶.

Las superficies de estas NP se modifican generalmente a través de la creación de pocas capas atómicas de polímero orgánico o metálico inorgánico (por ejemplo, oro), o de óxido de las superficies (por ejemplo, sílice o alúmina). De esta manera, las NP magnéticas son aptas para ser funcionalizadas por la unión a diversas moléculas bioactivas ¹²⁷. Debido a las propiedades magnéticas de las NP, las mismas obedecen la ley de Coulomb, por lo que pueden ser manipuladas por un gradiente de campo magnético externo.

La investigación sobre este tipo de NP se ha llevado a cabo, en gran medida, en la administración de fármacos, imágenes médicas, la focalización de células, y la terapia de hipertermia. Las NP magnéticas se sintetizan, por lo general, mediante dos métodos diferentes. Por un lado, se utiliza, en la mayoría de los casos, el método de coprecipitación de sales ferrosas y férricas, en solución acuosa alcalina. En este proceso, la inhibición de la nucleación adicional durante el crecimiento, es fundamental para la síntesis exitosa de nanocristales monodispersos¹²⁸. Por otro lado, se utiliza el método de descomposición térmica¹²⁹.

La forma y el tamaño de NP en general, pueden estudiarse mediante las técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM), dispersión dinámica de la luz (DLS), microscopía electrónica de barrido (SEM)¹³⁰, entre otras. Mientras que la presencia de los sustituyentes en el sólido pueden ser analizadas por FIT-IR, reacciones químicas simples de identificación, espectroscopía UV-visible (si el sustituyente es un cromóforo), etc.¹³¹⁻¹³².

Por otro lado, las NP magnéticas han sido propuestas para la distribución específica en sitios de acción de las drogas y agentes de diagnóstico mediante la aplicación de un campo magnético externo¹³³. Estudios *in vivo* de PDT en ratones, utilizando dichas NP unidas covalentemente a un PS, mostraron una destrucción efectiva del tumor¹³⁰.

Sin embargo, no hay prácticamente trabajos referidos al aprovechamiento de los conjugados NP magnética-PS para la reutilización del PS.

I.4.2. Conjugados NP magnéticas-PS para la PDI de microorganismos

Además del enorme número de enfermedades infecciosas difíciles de erradicar, causadas por diferentes factores, nombrados inicialmente, la desinfección de agua contaminada es un gran desafío mundial, debido al gran número de enfermedades que causa¹³⁴. En todo el mundo, alrededor de 800 millones de personas carecen de acceso a agua potable. En los países en desarrollo, 1,8 millones de niños mueren cada año de diarrea¹³⁵, mientras que en los países desarrollados se hace frente a la necesidad urgente de proporcionar un tratamiento eficaz de las aguas residuales, a medida que crecen las poblaciones.

Los métodos tradicionales para la desinfección del agua que se utilizan actualmente son eficaces contra las bacterias y los virus, pero tienen sus inconvenientes. La desinfección con cloro puede producir subproductos cancerígenos cuando los compuestos orgánicos están presentes en el agua¹³⁶, mientras que el uso de ozono es caro y requiere la generación *in situ*

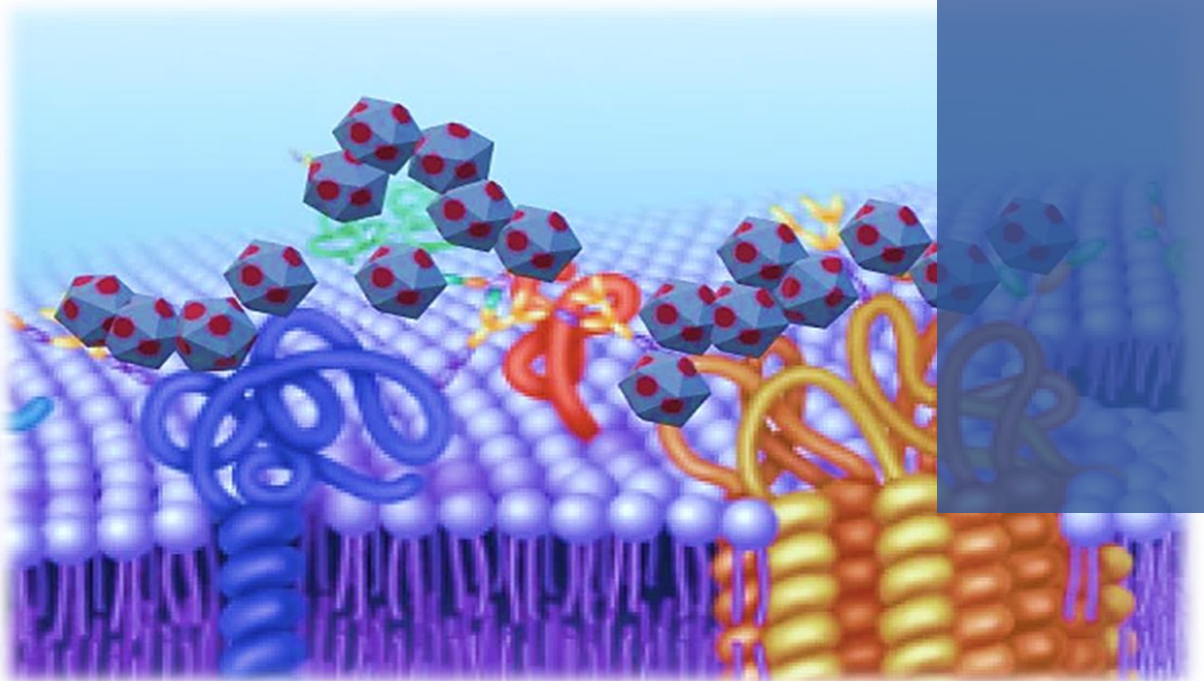
debido a su naturaleza inestable ¹³⁷⁻¹³⁹. Desinfecciones térmicas ¹⁴⁰ y por radiación ultravioleta ¹⁴¹ requieren cantidades excesivas de energía, y por lo tanto son caras y no ecológicas.

Deben buscarse alternativas al tratamiento de aguas y garantizar el acceso de agua potable al mayor porcentaje de la población mundial. Por otro lado, aprovechando la información aportada por diferentes investigadores, respecto al uso de conjugados NP magnética PS en PDT ¹³³, podría indagarse su uso en la PDI en tejidos. En este sentido, la inmovilización de PS en superficies, con el fin de recuperar el antimicrobiano, se presenta como herramienta prometedora para el tratamiento de infecciones. En particular, los conjugados NP magnéticas-PS ofrecen la ventaja de recuperar el PS mediante la aplicación de un campo magnético y a la vez, localizar el tratamiento.

Por esta razón, en el presente trabajo de tesis, se propone a los conjugados NP magnéticas-PS (Porfirina o BODIPY) como herramienta prometedora para la innovación en la PDI de microorganismos.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS



CAPÍTULO II

II. OBJETIVOS

II. 1. Objetivos generales

Desarrollar agentes fototerapéuticos formados por derivados de porfirinas y unirlos covalentemente a nanopartículas magnéticas, para aplicaciones biomédicas y/o medioambientales en el tratamiento de infecciones microbianas.

II. 2. Objetivos específicos

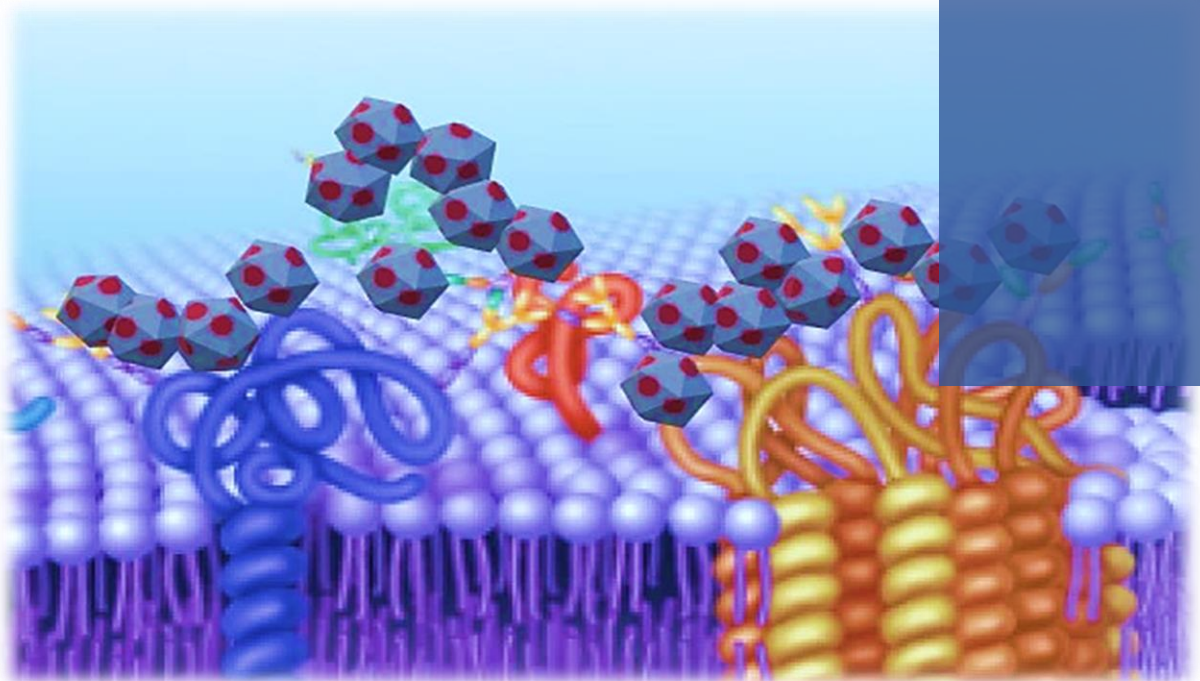
- a) Sintetizar NP magnéticas de Fe_3O_4 (MNP) y funcionalizarlas con grupos amino (MNPNH₂)
- b) Analizar el tamaño y forma de las NP mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM).
- c) Sintetizar conjugados NP magnéticas-porfirina unidos por enlaces amida, estudiar sus propiedades espectroscópicas, analizar la actividad fotodinámica en presencia de sustratos fotooxidables y determinar la actividad fotoinactivante en la levadura *C. albicans* y en las bacterias *E. coli* y *S. aureus*.
- d) Estabilizar el núcleo magnético Fe_3O_4 mediante la cobertura con sílica, funcionalizarlo con grupos amino y formar nuevos conjugados.
- e) Estudiar las propiedades espectroscópicas de los nuevos conjugados NP magnéticas-porfirina, analizar la actividad fotodinámica, fotoinactivante y la reutilización en la PDI de microorganismos.
- f) Sintetizar derivados de porfirinas con simetría ABAB y A₃B, conteniendo grupos precursores de cargas positivas y grupos apolares en la periferia del macrociclo.
- g) Determinar las propiedades espectroscópicas de absorción y fluorescencia de ABAB y A₃B, estudiar los efectos fotooxidativos y la producción de O_2 ($^1\Delta_g$) en medios homogéneos, y la actividad fotodinámica *in vitro*.
- h) Sintetizar nuevos conjugados NP magnéticas-porfirina mediante reacción de sustitución nucleofílica aromática entre MNPSINH₂ y A₃B o ABAB, estudiar la actividad fotodinámica en solución y en *S. aureus*.
- i) Sintetizar un nuevo conjugado con una porfirina de simetría A₄, que permita la modificación *in situ* de la misma, generando en el macrociclo grupos precursores de cargas positivas.

- j) Estudiar las propiedades espectroscópicas, la actividad fotodinámica y fotoactivante de los conjugados formados y modificados *in situ*.
- k) Desarrollar conjugados NP magnética con estructuras derivadas de porfirinas (BODIPYs) como fluoróforos o PS.
- l) Estudiar las propiedades espectroscópicas de los nuevos conjugados sintetizados en k), analizar la actividad fotodinámica en presencia de sustratos fotooxidables y determinar la actividad fotoactivante en bacterias

CAPÍTULO III

MATERIALES Y

MÉTODOS



CAPÍTULO III

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Equipamiento general

Los espectros UV-visible y de fluorescencia se registraron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC (Shimadzu Corporation, Tokio, Japón) y en un fluorómetro *Spex Fluoro Max* (Horiba Jobin Yvon, Edison, NJ, Estados Unidos) respectivamente. Los espectros se midieron a $25,0 \pm 0,5$ °C utilizando una celda de cuarzo con un paso óptico de 1 cm. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H NMR) se obtuvieron en un espectrómetro multinuclear FT-NMR Bruker Avance DPX400 a 400 MHz. Los espectros de masa (MS) se tomaron con un Bruker MicroQTOFII (Bruker Daltonics, MA, E.E.U.U.) equipado con una fuente de ionización por *electrospray* (ESI). Los espectros IR (FT-IR) se midieron con un Bruker Tensor (Ettlingen, Alemania).

Las fotografías de microscopía de transmisión electrónica (TEM) se obtuvieron utilizando un *Hitachi Modelo H-7500* a 120 kV. Una gota de solución coloide se colocó sobre una rejilla de cobre recubierta con Formvar y se evaporó el solvente bajo presión reducida.

La cromatografía gaseosa acoplada a masa se realizó en un *GC-MS 5890 Series Gas Chromatograph Hewlett Packard* equipado con una columna *HP-5 Crosslinked 5% PH ME Silicone* (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm) o *HP-1 Crosslinked ME Silicone Gum* (25 x 0,32 mm x 0,17 μm) Film Thickness, *Hewlett Packard*. Para las cromatografías en columna *flash* se utilizó gel de sílice (70-230 mesh, Merck Darmstadt, Alemania). Las cromatografías en capa fina (TLC) se corrieron en Uniplate Silica gel GHLF de 250 μ de Analtech (Newark, DE, E.E.U.U.). La sonicación se ejecutó en un equipo Branson 1210 (Danbury, Connecticut, Estados Unidos).

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave (Allamerican, Model 25X-2, Manitowoc, E.E. U.U.) a 20 psi y aproximadamente 115-121 °C durante 20 min. Las suspensiones celulares se cultivaron en estufa de cultivo F.A.L (Argentina), a $37,0 \pm 0,5$ °C. La densidad óptica (D.O) de las suspensiones celulares se determinó en un espectrofotómetro *Barnstead Turner SP-830* (Dubuque, IA, E.E. U.U.) a 660 nm.

Los lavados, diluciones y manipulación en general de las NP magnéticas, se llevaron a cabo con la ayuda de un campo magnético externo, aportado por un imán de neodimio (2 cm de diámetro por 1 cm de alto).

III.2. Reactivos y materiales

Los reactivos cloruro de hierro (II) tetrahidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), cloruro de hierro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 3-aminopropiltriethoxisilano (APTS), *N*-hidroxisuccinamida (NHS), *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida, 2,4-dinitrotrifluorobenceno, *n*-butilamina, 2,2'-(antraceno-9,10-diil) bis (ácido metilmalónico) (ABMM), L-triptófano (Trp), bromuro de potasio (KBr), bicarbonato de sodio (NaHCO_3), hidróxido de amonio (NH_4OH), los fotosensibilizadores 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxifenil)porfirina (TCPP) y 5,10,15,20-tetra(4-sulfonatofenil)porfirina (TPPS_4^{4-}), se adquirieron de *Aldrich* (Milwaukee, WI, E.E. U.U.) y se utilizaron sin purificación adicional.

Los solventes tolueno, tetrahidrofurano (THF) y etanol se obtuvieron de *Sintorgan*. Para síntesis y lavados de las NP magnéticas, se utilizaron solventes de grado GR. El agua ultra pura se obtuvo de un equipo *Labconco* (Kansas, MO, Estados unidos) modelo 90901-01.

Los siguientes materiales se utilizaron en los ensayos biológicos: caldo Sabouraud (CS), caldo tripticasa soya (CTS) y agar-agar de Britania (Bs. As., Argentina), *buffer* fosfato salino 10 mM (PBS, pH=7,0) (1,5 mM KH_2PO_4 y 8,0 mM Na_2HPO_4), cajas de Petri descartables (10 cm de diámetro), tubos de ensayo y policubetas de poliestireno de 96 pocillos (Deltalab, Barcelona, España).

III.3. Sistemas de irradiación

La irradiación de las suspensiones celulares se realizó con un proyector de diapositivas *Novamat 130 AF Braun Photo Technik* (Nürnberg, Alemania) equipado con una lámpara halógena de 150 W. Se utilizó como filtro una cubeta de agua de 2.5 cm para absorber el calor. El intervalo de longitud de onda de trabajo entre 350-800 nm, se ajustó mediante filtros ópticos ¹⁴². Para la irradiación de sustratos con luz monocromática se utilizó un monocromador de alta intensidad (Photon Technology Instruments, Birmingham, Wi, E.E. U.U.).

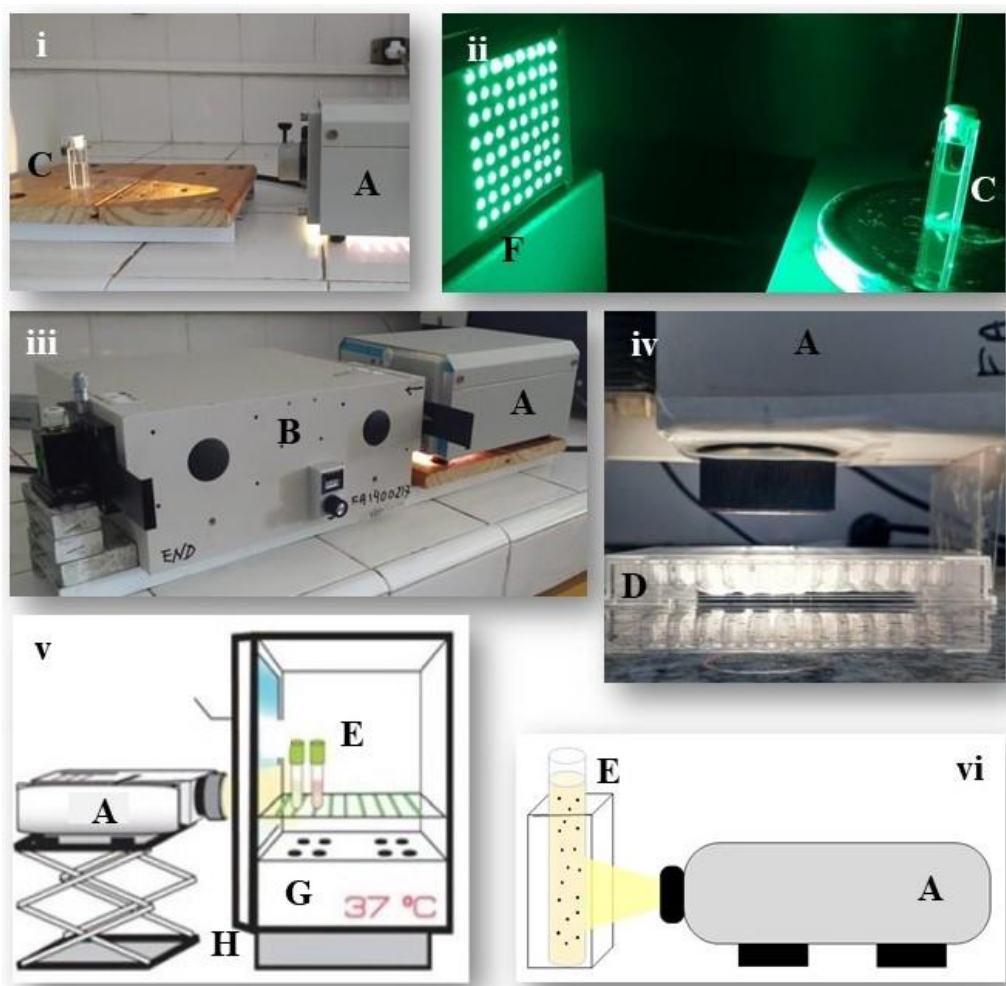


Figura 11. Diferentes arreglos de irradiación. A. Proyector. B. Monocromador. C. Celda. D. Policubeta. E. Tubo de ensayo con suspensión microbiana. F.LED. G. Estufa. H. Soporte.

La disposición del iluminador se realizó de acuerdo al experimento en estudio. Como se observa en la Figura 11, se utilizaron cinco arreglos diferentes. La fotodescomposición sensibilizada de los sustratos se realizó mediante la irradiación con luz visible en estado estacionario como se muestra en *i*), *ii*) y *iii*), según el PS utilizado. El rango de longitud de onda en *i*) se seleccionó entre 455-800 nm por medio de filtros ópticos (GG455 cutoff filter) y se utilizó una cubeta transparente de 2,5 cm conteniendo de agua para absorber el calor. La intensidad de la luz en el sitio de tratamiento fue de 44 mWcm⁻². En *ii*) se muestra una matriz de diodos emisores de luz (LED), la cual emitió luz verde a una longitud de onda central de 510 nm con una intensidad de 1 mW/cm². Por otro lado, para realizar la fotosensibilización de los cultivos celulares, se adoptó la metodología mostrada en *iv*) para estudios de inactivación, y *v*) para estudios de retardo en la curva de crecimiento. La intensidad de la luz en el sitio de tratamiento de los cultivos fue de 90 mW/cm².

III.4. Síntesis de MNP

III.4.1. Síntesis de MNP de Fe₃O₄. Método de coprecipitación

Las NP de óxido de hierro (Fe₃O₄) (MNP), se sintetizaron por el método de coprecipitación convencional con algunas modificaciones ¹⁴³. FeCl₂·4H₂O (0,55 g, 2,7 mmol) y FeCl₃·6H₂O (1,50 g, 5,5 mmol) se disolvieron en 1,5 ml de agua. Dicha mezcla se calentó a 80°C y se adicionó a la misma NH₄OH (1,75 ml, 25% V/V) gota a gota. El color de la solución pasó de naranja a negro inmediatamente. Se verificó un pH=9 y la mezcla se dejó reaccionando 30 min a 80°C, con agitación continua en atmósfera de argón. Luego, se realizaron varios lavados con agua pura por decantación magnética. Posteriormente, se resuspendieron las NP en 20 ml de agua pura y se centrifugaron (1600 rpm, 5 min) alícuotas de 1 ml, con el fin de utilizar las NP más pequeñas. Por último, éstas se lavaron y se resuspendieron en agua pura (5 ml) quedando una suspensión stock de concentración aproximadamente 100 mg de NP por mililitro de suspensión (100 mg MNP/ml).

III.4.2. Síntesis de nanopartículas magnéticas con una cobertura de sílica (MNPSI)

Una alícuota de 50 mg/ml de las MNP, sintetizadas en la sección anterior, se hicieron reaccionar con Na₂SiO₃·5H₂O. Para ello, en primer lugar, se preparó una solución de metasilicato de sodio en agua, con concentración 0,9 M. Luego se agregaron gotas de HCl concentrado para llevar dicha solución a un valor de pH=12. Posteriormente, se mezcló con la suspensión de MNP, se aplicó ultrasonido durante 30 min y se calentó a 80 °C. Luego de ser alcanzada la temperatura ambiente, se agregan gotas de HCl concentrado hasta llevar el medio de reacción a un pH=6-7, produciéndose la formación de un precipitado color blanco ¹⁴⁴. Finalmente, por decantación magnética, se realizan varios lavados con agua para eliminar el precipitado que no forma parte de la cobertura de las MNP. De esta manera se obtuvieron las MNPSI. Se prepara un stock con alrededor de 50 mg de MNPSI/ml.

III.4.3. Funcionalización de nanopartículas magnéticas con grupos propilamino (MNPNH₂ y MNPSINH₂)

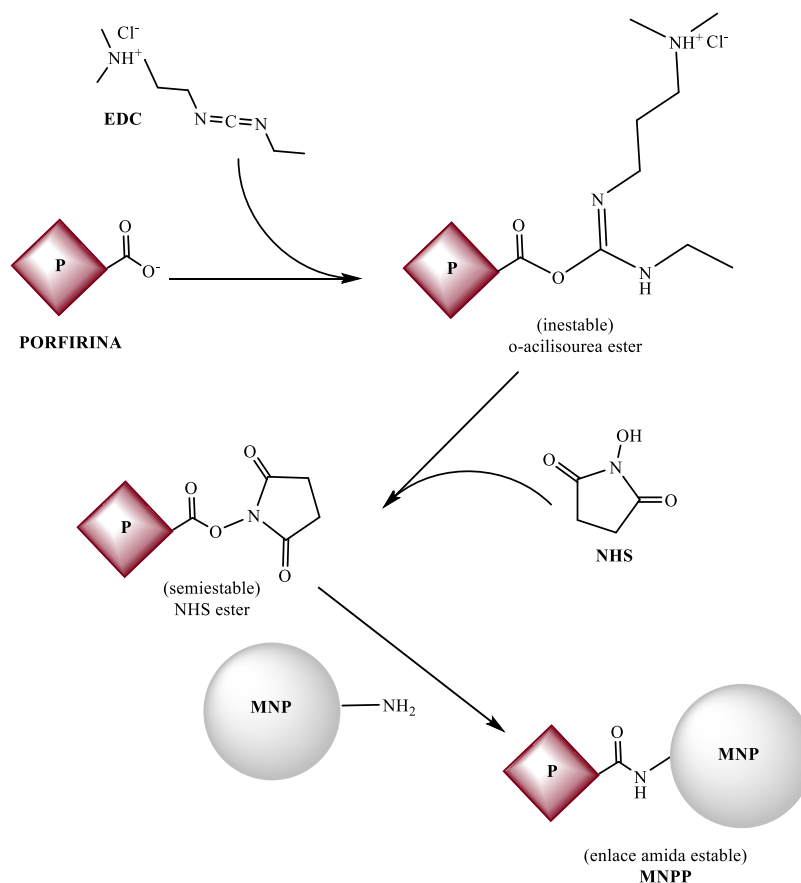
Las MNP se lavaron con acetona por decantación magnética, se dejaron resuspendidas en dicho solvente y se trataron con ultrasonido por 45 min. Luego se adicionó una solución de APTS en tolueno (0,3 M) ¹⁴⁵. La mezcla se calentó a 60 °C durante 4 h, y se dejó reaccionando 12 h a 37°C con agitación continua, en atmósfera de argón. Las MNPNH₂ se purificaron mediante sucesivos lavados con tolueno y etanol, por decantación magnética.

Luego, se resuspendieron en 5 ml de agua, quedando una concentración ~50 mg/ml de MNPNH₂.

El mismo procedimiento se realizó con MNPSI para funcionalizarlas con grupos amino. Finalmente, se preparó una suspensión con una concentración aproximada de 50 mg de MNPSINH₂/ml.

III.5. Síntesis de los conjugados MNPNH₂-TCPP y MNPSINH-TCPP

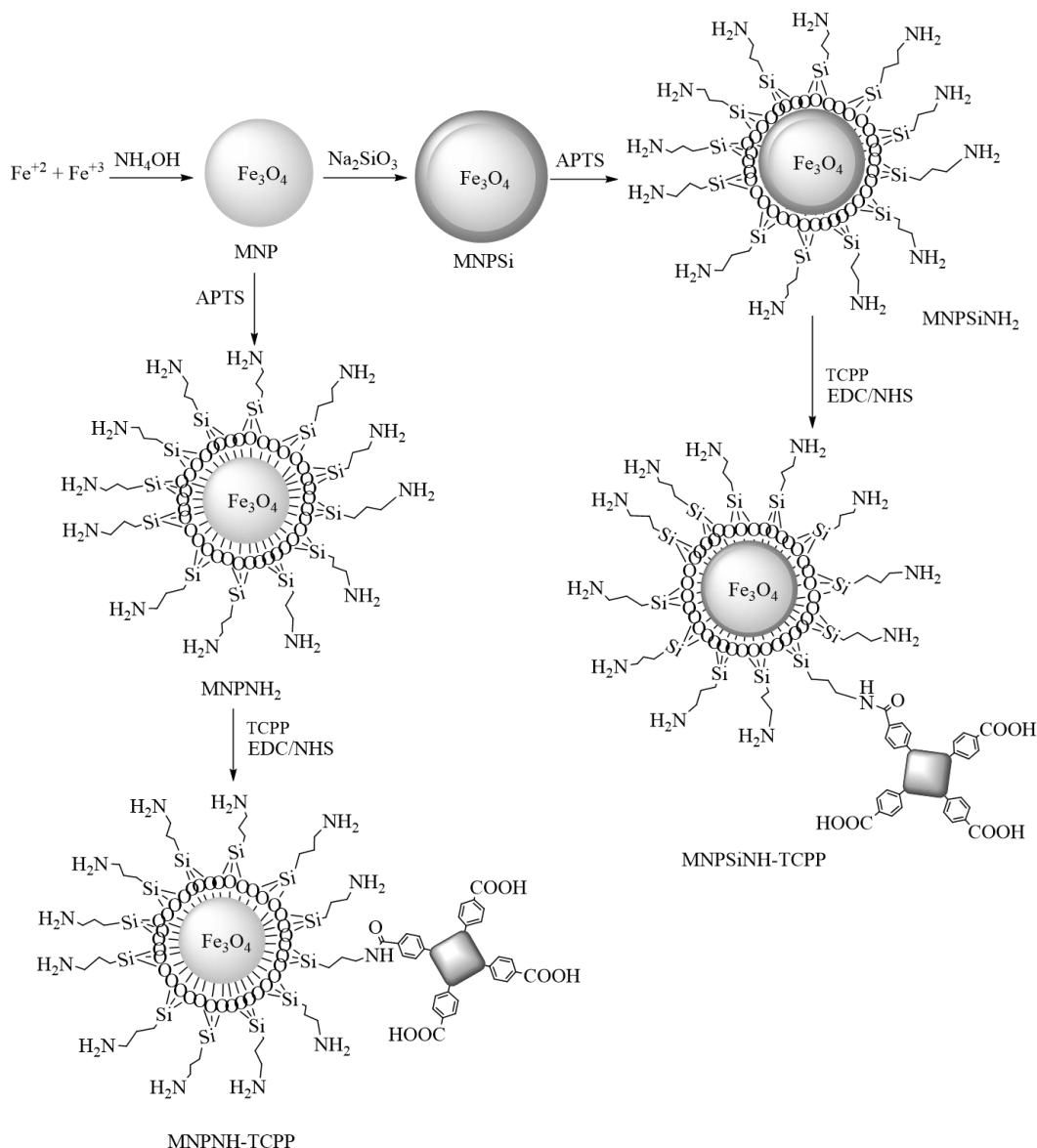
Aproximadamente 15 mg de MNPNH₂ resuspendidos en agua se hicieron reaccionar con una solución de TCPP activada (Esquema 7). Dicha solución se preparó mezclando TCPP (5 μmol, disuelta en 1 ml de DMF), EDC (20 μmol, en 1,5 ml de H₂O) y NHS (20 μmol, en 1,5 ml de H₂O) (EDC: NHS, 1:1) ¹⁴⁶, a 25°C durante 2 h con agitación continua.



Esquema 7. Reacción de porfirina monocarboxílica con EDC y NHS.

Posteriormente se descartó el agua de la suspensión de las NP mediante decantación magnética, y se añadió la solución de TCPP. La reacción se llevó a cabo a 25 °C durante 24 h con agitación continua y en atmósfera de argón. El mismo procedimiento se realizó para la reacción entre MNPSINH₂ y TCPP, por lo que se preparó un stock con la misma concentración (3 mg MNPSINH-TCPP/ml, 3 nmol TCPP/mg).

En ambos casos, el producto de reacción contiene grupos *amino* libres ($-\text{NH}_2$) y grupos *amida*, sustituidos por la porfirina tetraácida ($-\text{NH}-\text{CO}-$) (Esquema 8).



Esquema 8. Síntesis de MNPNH-TCPP y MNPSiNH-TCPP.

Determinación de sitios activos $-\text{NH}_2$

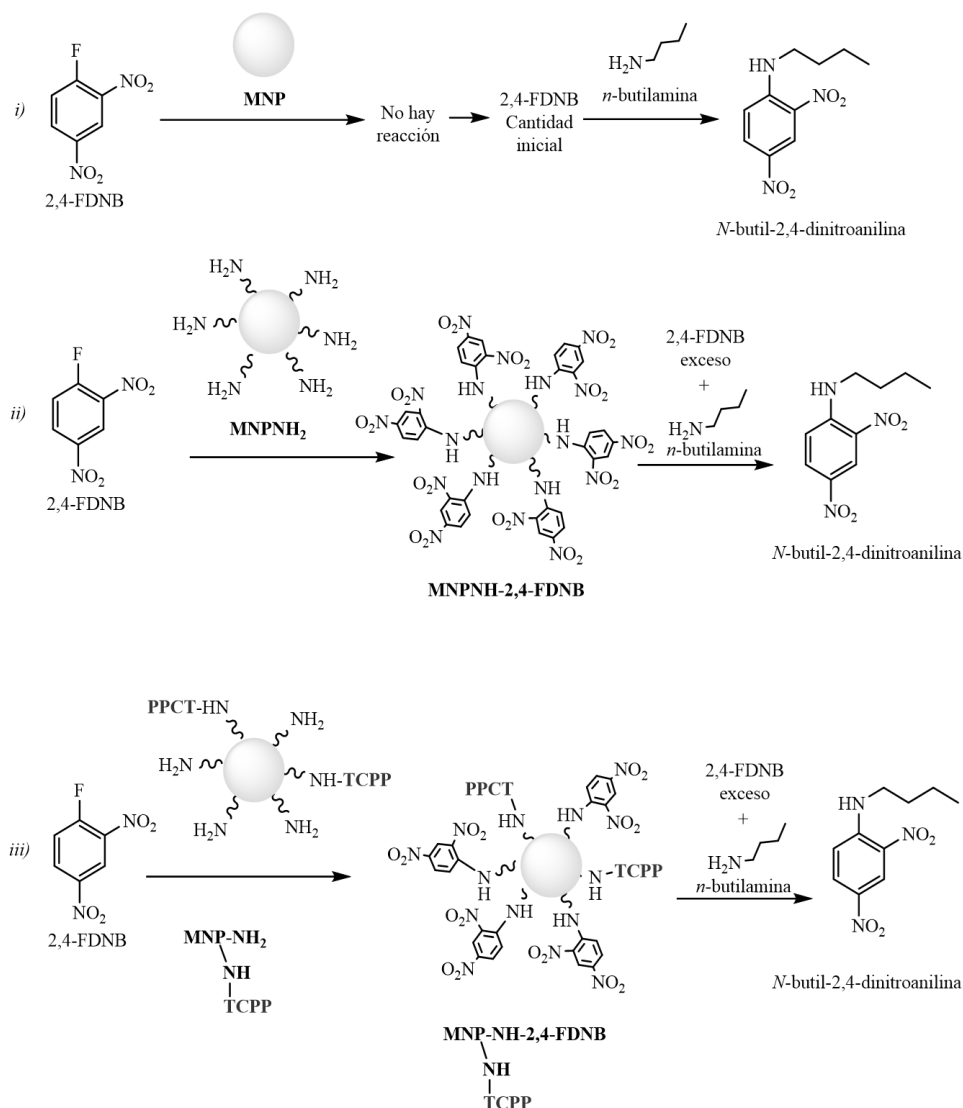
La determinación de la cantidad de grupos *amino* ($-\text{NH}_2$) presentes por miligramo de NP, se llevó a cabo mediante reacciones de identificación de dichos grupos¹⁴⁷. En primer lugar, una solución de 2,4-dinitrofluorobenceno (2,4-FDNB) en THF (5×10^{-4} M), se hizo reaccionar con tres stocks de suspensiones de NP magnéticas: MNP (70 mg), MNPNH₂ (70 mg) y MNPNH-TCPP (70 mg); a temperatura ambiente, durante 6 h. El exceso de 2,4-FDNB se separó del producto formado, mediante decantación magnética, y se hizo reaccionar con *n*-butilamina (5×10^{-2} M), para formar *N*-butil-2,4-dinitroanilina (Esquema 9). Este

compuesto, de color amarillo, presenta una banda de absorción en el espectro UV-visible ($\lambda_{\text{Máx}}=350$ nm, $\epsilon = 5500$ cm⁻¹M⁻¹). Por lo tanto, mediante la Ley de *Lambert-Beer* ($A^{350} = \epsilon^{350} \cdot b \cdot C_{\text{celda}}$, siendo $C_{\text{celda}} = (V_0 \cdot C_0) / V_{\text{celda}}$), es posible calcular la concentración aproximada de grupos -NH₂ que hay por miligramo de nanopartícula magnética.

Como experimento control negativo se utilizó el stock de NP magnéticas sin grupos -NH₂, correspondiente a las MNP. Mientras que como medida del blanco, se utiliza la cantidad de 2,4-FDNB inicial. Cuando esta cantidad reacciona con *n*-butilamina, se obtiene el producto con mayor concentración, lo que debería verse reflejado en una mayor absorbancia a $\lambda_{\text{máx}}=350$ nm.

Determinación de la cantidad de porfirina unida covalentemente a las NP magnéticas

Los resultados de la experiencia anterior permiten realizar un cálculo aproximado de la cantidad de porfirina que se enlaza covalentemente a las NP. Con el valor de la absorbancia de *N*-butil-2,4-dinitroanilina (reacción iii), mostrada en el Esquema 9 ($A^{\lambda=350} = 0,954$), puede obtenerse la concentración de grupos amino libres (-NH₂) por miligramo de NP. Esta concentración se refiere a los grupos -NH₂ presentes en las NP que no formaron enlace covalente con la porfirina. Realizando la diferencia entre la concentración de grupos -NH₂ obtenidos en ii) y en iii), puede obtenerse la concentración aproximada de grupos amida formados (-NH-CO-), lo que es proporcional a la concentración aproximada de porfirina enlazada.



Esquema 9. Reacciones de identificación de grupos amino

Medida de la adsorción de la porfirina en las nanopartículas magnéticas

Para determinar si la porfirina presente en el conjugado MNP-NH-TCPP corresponde a TCPP unida covalentemente y/o TCPP adsorbida, se llevaron a cabo las siguientes experiencias. En primer lugar, se preparó una solución de TCPP en DMF (20 μ mol en 8 ml de DMF), la cual se separó en cantidades iguales en recipientes diferentes (A y B). A la TCPP en A se le agregaron los activantes EDC y NHS (en 2 ml de H₂O), y se sonicó durante 30 min. Luego, se mezcló con ~20 mg de MNP-NH₂. Por otro lado, a la TCPP en B se la mezcló con una suspensión de MNP-NH₂ conteniendo ~20 mg de NP en 2 ml de agua. En ambos casos, la concentración de TCPP fue de 3,3 mM. Ambas mezclas se dejaron a temperatura ambiente durante 24 h. Transcurrido dicho tiempo, se procedió a los lavados por decantación magnética, eliminando de esta forma la TCPP que no se haya unido covalentemente y/o

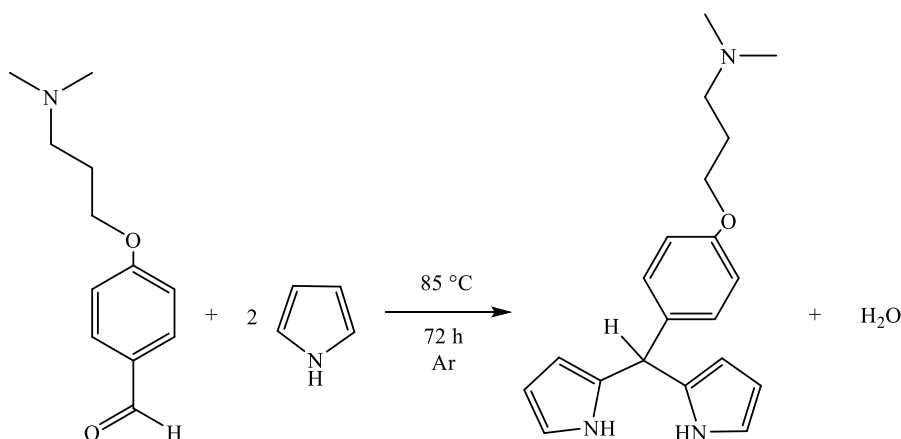
adsorbido a las MNPNH₂. Los lavados se realizaron con agua y etanol, hasta obtener sobrenadantes translúcidos. Por último, se calculó la concentración de TCPP obtenida en los lavados, correspondientes a cada mezcla, y se comparó con la concentración de TCPP inicial.

Los mismos procedimientos detallados anteriormente se realizaron con el conjugado MNPSINH-TCPP.

III.6. Síntesis de porfirinas que contienen grupos amino alifáticos básicos

III.6.1. Síntesis de *meso*-(4-(3-*N,N*-dimetilaminopropoxi)fenil)dipirrometano (ADPM)

Se preparó una solución de 4-(3-*N,N*-dimetilaminopropoxi)benzaldehído (4,0 ml, 20 mmol) y pirrol (30,0 ml, 432 mmol). La mezcla de reacción se agitó por 72 h a 85 °C en atmósfera de Ar. El exceso de pirrol se eliminó por destilación a vacío. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna *flash* (sílica gel, acetato de etilo/metanol 5-10% gradiente/TEA 1%). La muestra se analizó por CG-MS a lo largo de la reacción, utilizando una columna HP-1 bajo las siguientes condiciones: T_{inyector}: 270 °C, T_{detector}: 280 °C, T_{horno}: gradiente escalonado T_{inicial}: 60°C (5 min), 250°C, P_{cabeza} de columna: 15 psi, t_{retención}: 11,28 min. Se obtuvo un rendimiento de 3,79 g (59 %) del dipirrometano puro. TLC (sílica gel, acetato de etilo/metanol 5%/TEA 1%), R_f= 0,22. MS (m/z) 323,2 (M⁺) (323,1998 calculado para C₂₀H₂₅N₃O) (Esquema 10). Los datos espectroscópicos coinciden con los informados previamente ¹⁴⁸.



Esquema 10. Síntesis de ADMP.

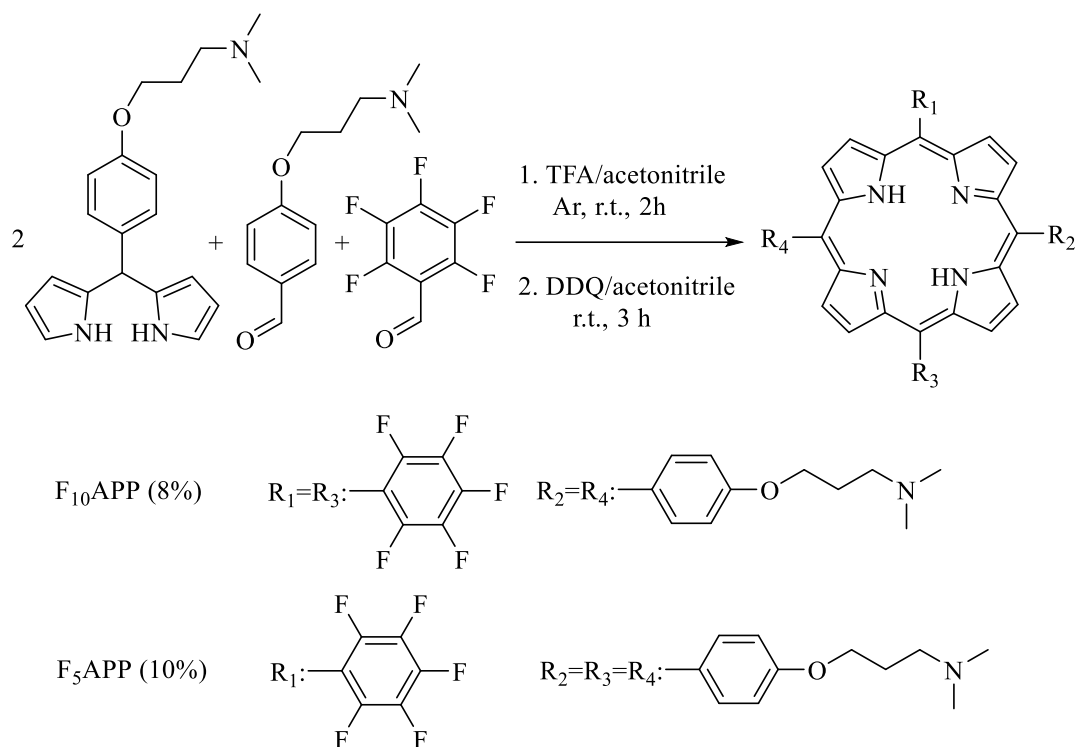
III.6.2. Síntesis de 5,15-bis(perfluorofenil)-10,20-bis(4-(3-*N,N*-dimetilamino propoxi)fenil)porfirina (F₁₀APP)

Una solución de 4-(3-*N,N*-dimetilamiopropoxil)benzaldehído (373 μ l; 1,86 mmol), pentafluorbenzaldehído (0,46 g; 2,35 mmol) y ADPM (1,53 g; 4,73 mmol) disueltos en 464,1 ml de acetonitrilo, se desgasó con Ar por 15 min. Luego se agregó TFA (2,6 ml; 33,81 mmol) lentamente y se agitó la solución por 2 h a temperatura ambiente.³⁰ Se adicionó TEA (14 ml; 99,01 mmol) para neutralizar la mezcla y a continuación se agregó DDQ (2,11 g; 9,22 mmol) y se mantuvo dicha mezcla en agitación, durante 3 h bajo atmósfera oxigenada. Por último, se adicionó metanol (15 ml) para consumir el DDQ en exceso. El solvente se removió bajo presión reducida y luego la mezcla de reacción se purificó por columna de cromatografía *flash* (sílica gel, CH₂Cl₂/CH₃OH gradiente 1-7%/TEA 3%). La F₁₀APP (Esquema 11) es la primera mancha menos polar de color púrpura eluída. Dicha porfirina se obtiene pura con un rendimiento de 8%. TLC (sílica gel, CH₂Cl₂/CH₃OH 10%/TEA 3%), R_f^{F₁₀APP}=0,66. El análisis de dicha porfirina mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón, arrojó los siguientes datos: ¹HNMR (CDCl₃, TMS) δ [ppm]: -2.87 (br, 2H, pirrol NH), 1.98 (m, 4H), 2.26 (s, 12H, -NCH₃), 2.45 (t, 4H, J = 7.0 Hz), 4.03 (t, 4H, J = 6.2 Hz), 7.14 (d, 4H, 10,20-Ar 2,6-H, J = 8.0 Hz), 7.92 (d, 4H, 10,20-Ar 3,5-H, J = 8.0 Hz), 8.70-8.85 (m, 8H, pirrol). ESI-MS [m/z] 997.3288 [M+H]⁺ (996.3210 calculado para C₅₄H₄₂F₁₀N₆O₂).

III.6.3. Síntesis de 5-(perfluorofenil)-10,15,20-tris-(4-(3-*N,N*-dimetilaminopropoxi)fenil)porfirina (F₅APP)

La porfirina F₅APP (Esquema 11) se obtuvo como la segunda mancha color púrpura eluída en la columna cromatográfica descrita anteriormente, utilizando una mezcla de CH₂Cl₂/CH₃OH gradiente 10-15%/TEA 3%, como solvente de elusión. De esta manera se obtuvo F₅APP de forma pura con 10 % de rendimiento. TLC (sílica gel, CH₂Cl₂/CH₃OH 10%/TEA 3%), R_f^{F₅APP}=0,50. ¹HNMR (CDCl₃, TMS) δ [ppm]: -2.86 (br, 2H, pirrol NH), 1.99 (m, 6H), 2.27 (s, 18H, -NCH₃), 2.48 (t, 6H, J = 7.0 Hz), 4.02 (t, 6H, J = 6.2 Hz), 7.12 (d, 6H, 10,20-Ar 2,6-H, J = 8.0 Hz), 7.90 (d, 6H, 10,20-Ar 3,5-H, J = 8.0 Hz), 8.70-8.85 (m, 8H, pirrol). ESI-MS [m/z] 1008.4600 [M+H]⁺ (1007.4521 calculado para C₅₉H₅₈F₅N₇O₃).

Además de F₅APP y F₁₀APP se obtuvo 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N*-dimethylaminopropoxy)phenyl]porphyrin (TAPP) con un rendimiento del 6 %. Esta porfirina fue sintetizada y caracterizada previamente¹⁴⁸

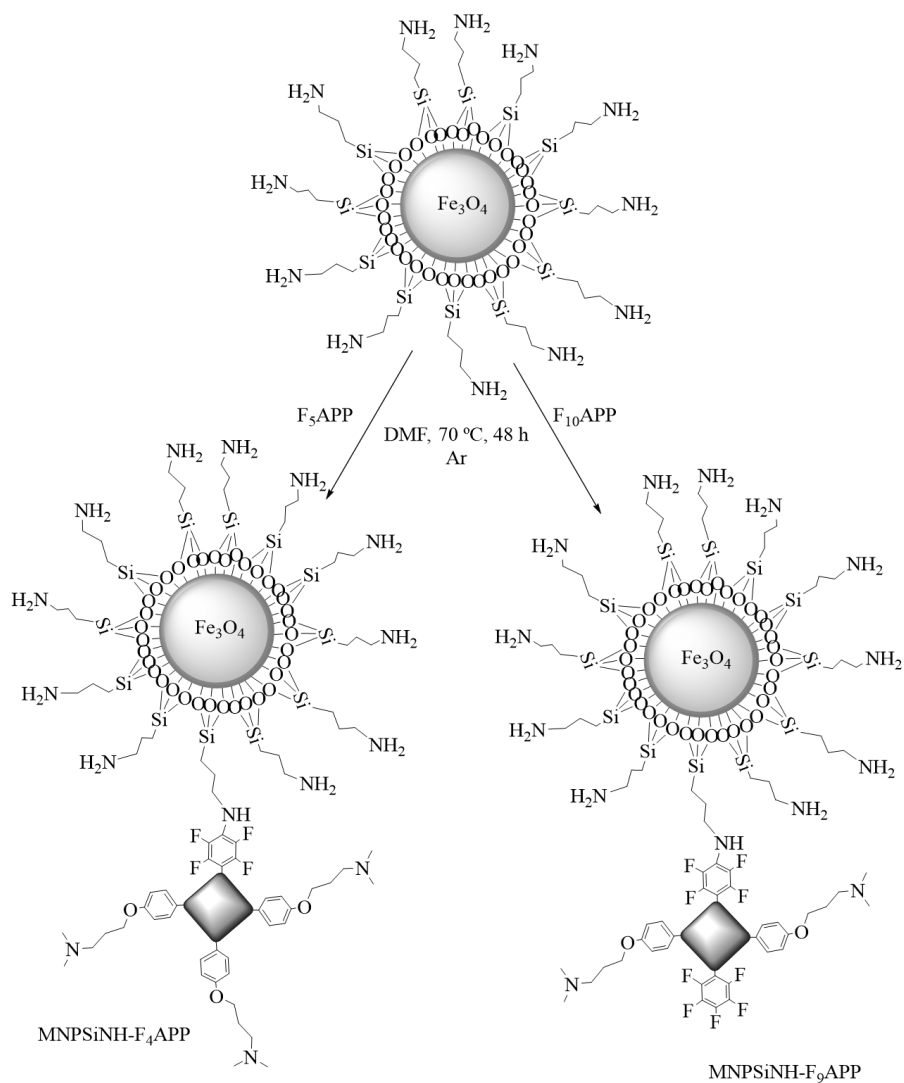


Esquema 11. Síntesis de F_5APP y $F_{10}APP$.

III.7. Síntesis de los conjugados MNPSINH- F_4APP y MNPSINH- $F_{10}APP$

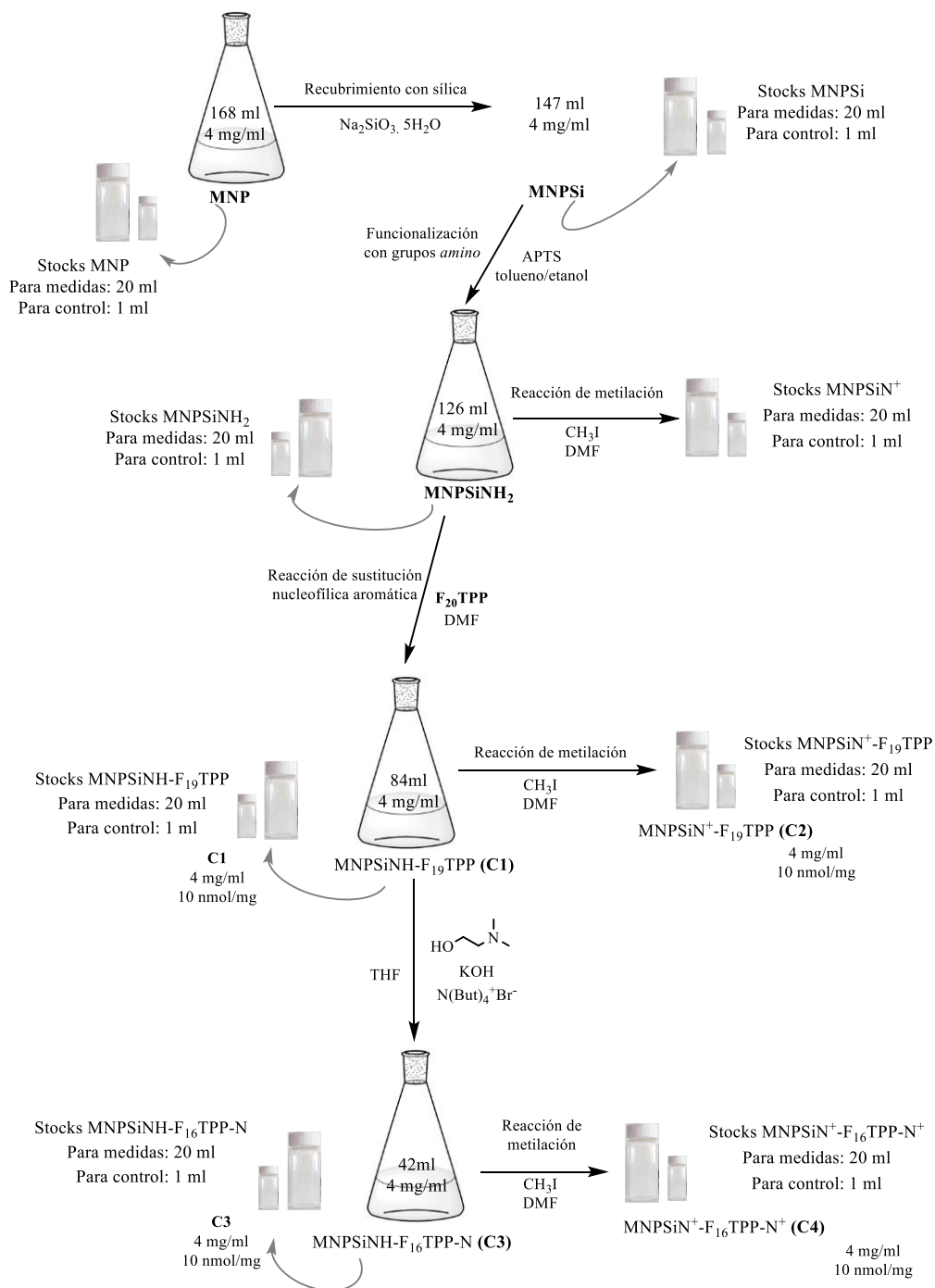
La formación de los conjugados se llevó cabo en DMF, a 70 °C, en atmósfera de argón, durante 48 h con agitación continua. Se utilizaron 5 mg de MNPSINH₂ y 1,5 mM de F_5APP y $F_{10}APP$ para la formación de cada conjugado.

Posteriormente, se realizaron lavados con DMF y etanol, para eliminar el excedente de porfirina. Finalmente, los conjugados sintetizados (Esquema 12) se resuspendieron en agua (10 nmol/mg, 1 mg/ml en ambos casos).



Esquema 12. Representación de los conjugados MNPSiNH-F₄APP y MNPSiNH-F₉APP.

III.8. Síntesis de los conjugados MNPNH₂-F₁₉TPP, MNPN⁺-F₁₉TPP, MNPNH₂-F₁₉TPP-N y MNPN⁺-F₁₉TPP-N⁺



Esquema 13. Metodología de trabajo para la obtención de los diferentes conjugados derivados de MNPSiNH-F₁₉TPP.

La síntesis de nuevos conjugados se llevó a cabo mediante una serie de pasos, como puede observarse en el Esquema 13, con el objetivo de obtener la misma concentración en todos los stocks. En el Esquema 13 se representan los pasos de síntesis y los conjugados obtenidos.

Síntesis del conjugado MNPSINH- F₁₉TPP (conjugado 1, C1)

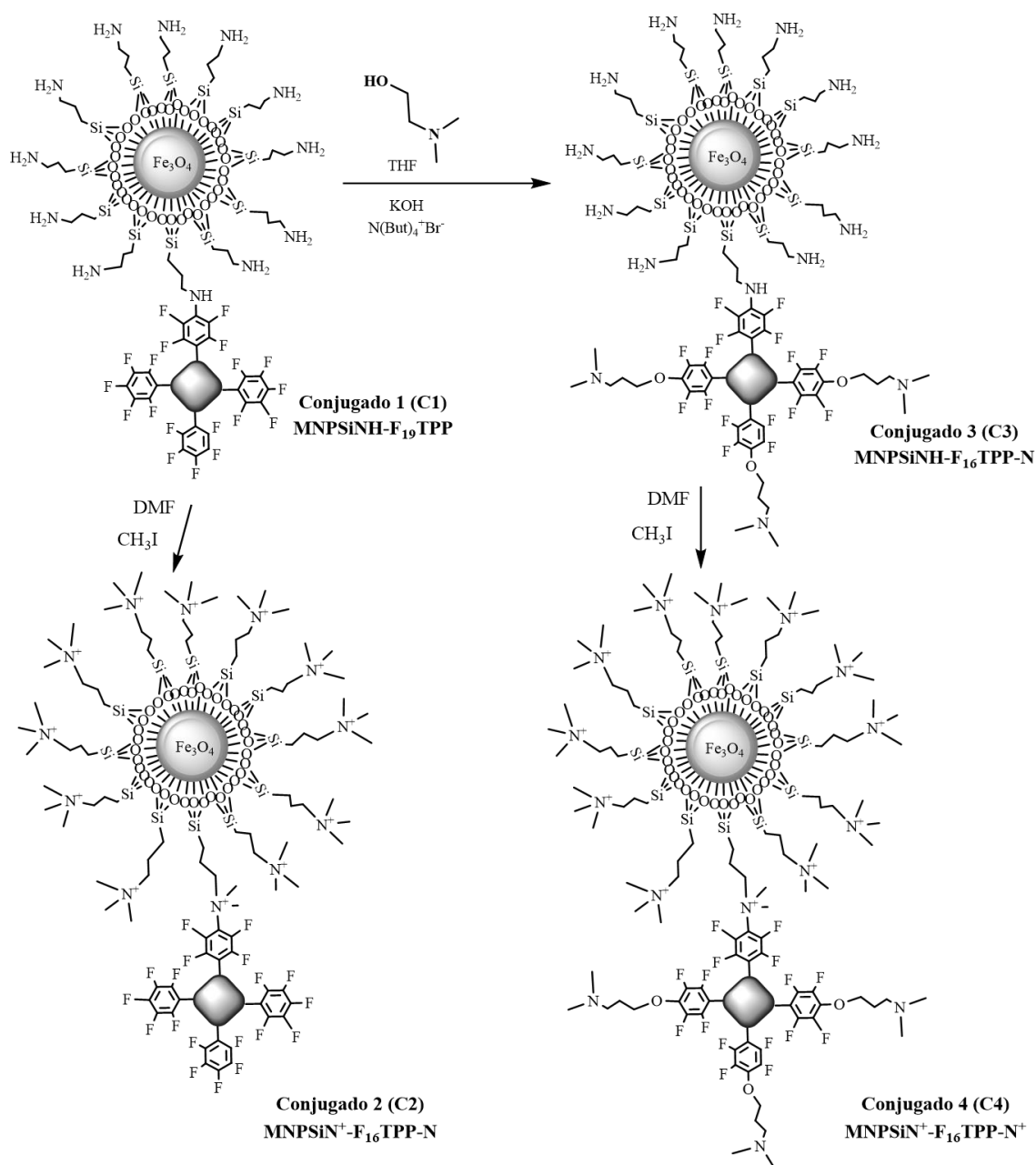
Un volumen de 84 ml de la suspensión de MNPSINH₂ se hizo reaccionar con la porfirina TPPF₂₀ de la siguiente manera. En primer lugar se descartaron los 84 ml de agua mediante decantación magnética y se resuspendieron las NP en 10 ml de DMF. Por otro lado se preparó una solución 3 mM de TPPF₂₀ en DMF. Finalmente dicha solución se agregó a la suspensión y se dejó reaccionar a temperatura ambiente y agitación continua durante 48 h. Las MNPSINH-F₁₉TPP obtenidas se lavaron mediante decantación magnética y se resuspendieron en 84 ml de agua. Por conveniencia de abreviación se llama a este conjugado, conjugado 1 o simplemente C1. La concentración de C1 es 10 nmol/mg (TPPF₂₀ inmovilizada en 1 mg de NP, 4 mg/ml (NP/suspensión).

Metilación de MNPSIN⁺- F₁₉TPP (síntesis del conjugado 2, C2)

Una alícuota de 21 ml de la suspensión del conjugado 1 se somete a metilación (*ver III.9*). Luego de realizar los lavados necesarios, se obtiene así el conjugado 2 (C2), MNPSIN⁺-F₁₉TPP, en el cual las NP unidas a la porfirina están metiladas.

Síntesis del conjugado MNPSIN⁺- F₁₉TPP-N (conjugado 3, C3)

Un volumen de 42 ml (168 mg) de la suspensión del conjugado 1 se utiliza para añadir a la porfirina TPPF₂₀ (unida a las NP) grupos *etildimetilamino*. Para ello, en primer lugar, se descartó el volumen de la suspensión mediante decantación magnética. Luego, se resuspendieron las NP en THF (10 ml) y *N,N*-dimetiletanolamina e hidróxido de potasio anhidro se agregaron a la suspensión. Para que la reacción sea exitosa, la relación estequiométrica respecto a la concentración de TPPF₂₀ en el conjugado 1 es la siguiente: TPPF₂₀ (1): OH-C₂H₄-N(CH₃)₂ (20): KOH (16) ¹⁴⁹. Debido a que TPPF₂₀ unida a las NP tiene al menos dos grupos sustituibles, se duplica la relación estequiométrica anterior. Por lo tanto, 2 μmoles de TPPF₂₀ (168 mg de conjugado 1), se hicieron reaccionar con 80 μmoles de *N,N*-dimetiletanolamina y 64 μmoles de KOH. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 12 h, con agitación continua y utilizando bromuro de tetrabutilamonio (100 μl) como catalizador. El conjugado 3 (C3) obtenido, MNPSIN⁺- F₁₆TPP-N, se purificó mediante decantación magnética con lavados con agua. Finalmente se resuspendió dicho conjugado en 42 ml de agua.



Esquema 14. Síntesis de los conjugados C1, C2, C3 y C4.

Metilación de las MNPSiN⁺-F₁₉TPP-N⁺ (síntesis del conjugado 4, C4)

Una alícuota de 21 ml de la suspensión del conjugado 3 se somete a metilación. Se obtiene así el conjugado 4 (C4), MNPSiN⁺-F₁₉TPP-N⁺, en el cual tanto las NP como la porfirina están metiladas.

Al finalizar cada paso de síntesis se extrae una alícuota de 20 ml para utilizar como suspensión stock en diferentes estudios y otra de 1 ml, para controlar que se haya mantenido la misma concentración en mg/ml a lo largo de todo el proceso de reacciones. De esta

manera, todos los conjugados contienen una similar concentración de porfirina inmovilizada por mg de NP (10 nmol/mg).

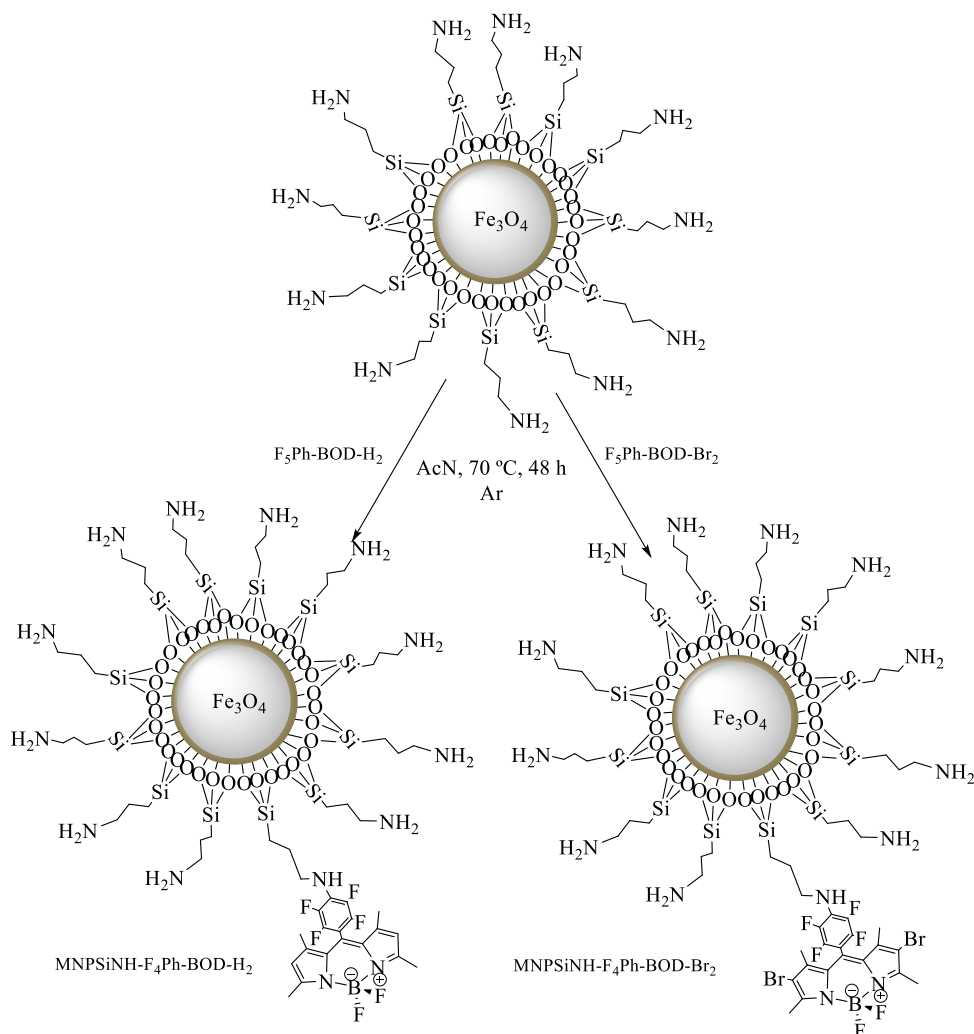
III.9. Metilación de grupos amino

La reacción de metilación se llevó a cabo en DMF, por lo que en primer lugar, se descartó el agua de la suspensión de NP correspondiente, mediante decantación magnética. Luego de sucesivos lavados con DMF, se resuspendieron en dicho solvente y se adicionaron 2 ml de CH₃I. La reacción se llevó a cabo durante 16 h, a 40 °C con agitación continua. Los lavados se realizaron con DMF y agua, mediante decantación magnética.

III.10. Síntesis de los conjugados MNPNH₂-F₄Ph-BOD-H₂ y MNPNH₂-F₄Ph-BOD-Br₂

Los BODIPYs AcO-BOD-Br₂, F₅Ph-BOD-H₂ y F₅Ph-BOD-Br₂ fueron previamente sintetizados siguiendo la metodología descrita en la literatura.¹⁵⁰ AcO-BOD-Br₂ se utilizó como molécula referencia.

La síntesis de los conjugados se realizó en condiciones similares que en *III.7*. Se prepararon soluciones de los bodipys F₅Ph-BOD-H₂ y F₅Ph-BOD-Br₂ en acetonitrilo. Cada una de ellas se mezcló con una suspensión 10 mg/ml de MNPSINH₂, quedando una concentración 1 mM de los BODIPYs inmovilizados en las NP, en ambas suspensiones. La reacción se llevó a cabo a 70 °C, en atmósfera de argón, durante 48 h con agitación continua. Transcurrido el tiempo de reacción, se realizaron lavados con acetonitrilo y etanol, para eliminar el excedente de bodipy. Finalmente, los conjugados sintetizados (Esquema 15) se resuspendieron en agua (6 nmol/mg, 2 mg/ml en ambos casos).



Esquema 15. Síntesis de los conjugados $\text{MNPSiNH-F}_4\text{Ph-BOD-Br}_2$ y $\text{MNPSiNH-F}_4\text{Ph-BOD-H}_2$.

III.11. Caracterización de las NP y los conjugados

La síntesis del núcleo magnético de Fe_3O_4 y su funcionalización con grupos amino, se estudió inicialmente mediante FT-IR y TEM. Las Np recubiertas con sílica y posteriormente funcionalizadas con grupos amino, se estudiaron mediante TEM. Por otro lado, los diferentes conjugados Np-PS, se caracterizaron por TEM y espectroscopía UV-vis. Medidas de Potencial Z se utilizaron para caracterizar las Np luego de los procesos de metilación correspondientes.

III.12. Síntesis de 2,2'-(antraceno-9,10-diil)bis(tetrasodiometilmalonato) (ABMM)

El sustrato derivado de dimetilantraceno, se sintetizó a partir de 2,2'-(antraceno-9,10-diil)bis(ácido metilmalónico) (ABMA, 19 mg, 0,046 mmol) y NaOH (14 mg, 0,275 mmol) en 1,5 ml de agua. La mezcla de reacción se sonicó durante 10 min y se añadieron 3 mL de

etanol para precipitar el producto. El sólido obtenido se lavó tres veces con alcohol etílico absoluto y se secó bajo presión reducida. ABMM se obtuvo con un rendimiento del 83% (19 mg). Los datos espectroscópicos coinciden con los informados previamente ¹⁵¹.

III.13. Decantación magnética

La decantación magnética consiste en orientar las NP hacia alguna zona deseada del recipiente que las contiene, mediante el acercamiento al mismo de un imán. En este trabajo el imán utilizado es de neodimio. El propósito de dicha decantación es, principalmente, lavar a las NP con un solvente diferente al que se encuentran resuspendidas. Generalmente también se utiliza para concentrar la suspensión, ya sea en mg/ml como en moles de fotosensibilizador/mg. La Figura 12 muestra el proceso de decantación magnética.

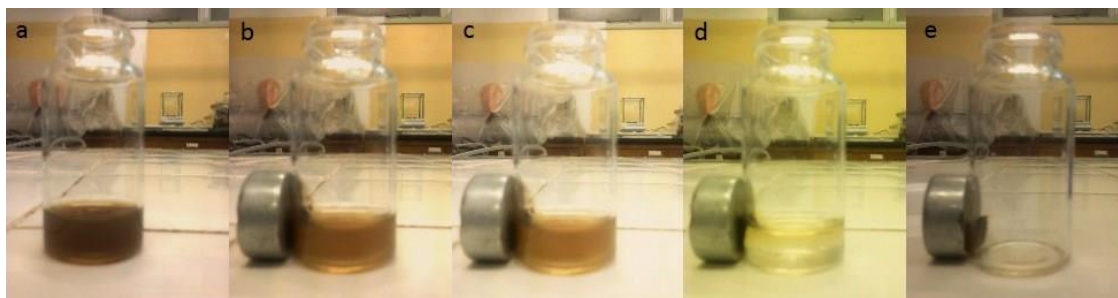


Figura 12. Secuencia de lavado por decantación magnética con imán de neodimio de 20 mm de diámetro x 10 mm de alto. Tiempo de migración de MNP hacia el imán (a-d)= 2 min (en agua).

III.14. Estudios espectroscópicos

Los estudios espectroscópicos, tanto de los diferentes conjugados como de los PS sintetizados, se realizaron usando una celda de cuarzo con sus cuatro caras transparentes y con un paso óptico de 1 cm, a $25,0 \pm 0,5$ °C. Los espectros de absorción se tomaron usando una concentración del fotosensibilizador entre 1-2 μ M. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) se calcularon según la ecuación 1, comparando el área obtenida debajo del espectro de emisión, de cada PS en el rango de 500-800 nm, con respecto al área del PS de referencia, según corresponda.

$$\Phi_F^{PS} = \frac{A^{ref} I^{PS}}{A^{PS} I^{ref}} \Phi_F^{ref} \quad (1)$$

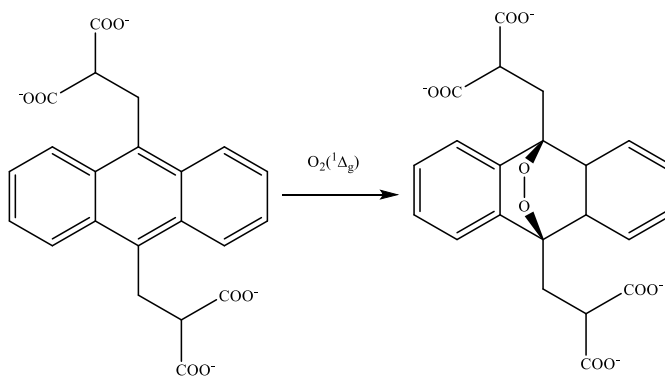
Donde A corresponde a la absorbancia medida ($A < 0,05$) a la longitud de onda de excitación e I es el área debajo del espectro de emisión para el PS en estudio y el de referencia (ref) en el mismo solvente. Estas áreas se determinaron utilizando un programa de cálculos

(Microcal Origin, Northampton, MA) a partir de los gráficos de intensidad de fluorescencia vs. frecuencia.

III.15. Estudios de fotodescomposición de sustratos en estado estacionario

III.15.1. Fotooxidación de derivado del antraceno (ABMM)

ABMM es una molécula que reacciona específicamente con el $O_2(^1\Delta_g)$ mediante una cicloadición 4+2, dando lugar a un endoperóxido en su estructura, formado por la oxidación de los dobles enlaces en el anillo central (Esquema 16).¹⁵¹ De esta manera, el sustrato ABMM desactiva $O_2(^1\Delta_g)$ por una reacción química exclusivamente¹⁵¹.



Esquema 16. Reacción de ABMM con $O_2(^1\Delta_g)$.

Soluciones de ABMM y los conjugados que correspondan (MNPSI-TCPP, MNPSINH-TCPP, MNPSINH-F₁₉TPP, MNPSIN⁺-F₁₉TPP, MNPSINH-F₁₉TPP-N, MNPSIN⁺-F₁₉TPP-N⁺) o ABMM y la porfirina de referencia, se irradiaron con luz visible, utilizando un proyector *Novamat 130 AF Braun Photo Technik* (Nürnberg, Alemania) equipado con una lámpara halógena de 150 W. El intervalo de longitud de onda se seleccionó entre 455-800 nm por medio de filtros ópticos (GG455 cutoff filter). Se utilizó una cubeta transparente de 2,5 cm conteniendo de agua para absorber el calor. La intensidad de la luz en el sitio de tratamiento fue de 44 mW/cm².

La concentración de ABMM se mantuvo en 35 μ M, mientras que la de los conjugados y la porfirina de referencia en 3-5 μ M, según corresponda. Las soluciones y suspensiones se prepararon en agua y se irradiaron en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. El valor de absorbancia a la longitud de onda de irradiación, tanto de la porfirina inmovilizada en las NP como el de la referencia, se mantuvieron en $\sim 0,1$. Las cinéticas de fotooxidación de ABMM se estudiaron siguiendo la disminución de la absorbancia (A) de una de las bandas más intensas de este sustrato ($\lambda_{m\acute{a}x} = 379$ nm, en H₂O). En estas condiciones experimentales,

la reposición de oxígeno en la solución es más rápida que la reacción de fotooxidación¹⁵², por lo que la concentración de $O_2(^1\Delta_g)$ se mantiene prácticamente constante durante el tiempo en el cual transcurre la reacción.

Las constantes de velocidad observadas (k_{obs}^{ABMM}) se obtuvieron del ajuste lineal de $\ln(A_0/A)$ vs. tiempo (s). Para la reacción de ABMM con $O_2(^1\Delta_g)$ en estado estacionario (ecuación 2), la velocidad de desaparición del sustrato se expresa mediante la ecuación 3.



$$\frac{\delta[ABMM]}{\delta t} = -k_r [ABMM][O_2(^1\Delta_g)] = -k_{obs} [ABMM] \quad (3)$$

$$\text{donde } k_{obs} = k_r [O_2(^1\Delta_g)]$$

integrando la ecuación 3, se obtiene:

$$\ln \frac{[ABMM]_0}{[ABMM]_t} = k_{obs} t \quad (4)$$

Donde $[ABMM]_0$ y $[ABMM]_t$, representan las concentraciones de ABMM a tiempo de reacción cero y a un determinado tiempo de reacción t , respectivamente. Reemplazando las concentraciones de $[ABMM]$ inicial y a un tiempo de reacción determinado, por las correspondientes absorbancias a 379 nm (Ley de Lambert-Beer, $A_0^{379} = \epsilon 379 \cdot b \cdot [ABMM]_0$ y $A_t^{379} = \epsilon^{379} \cdot b \cdot [ABMM]_t$, se obtiene la ecuación 5:

$$\ln \frac{A_0}{A} = k_{obs} t \quad (5)$$

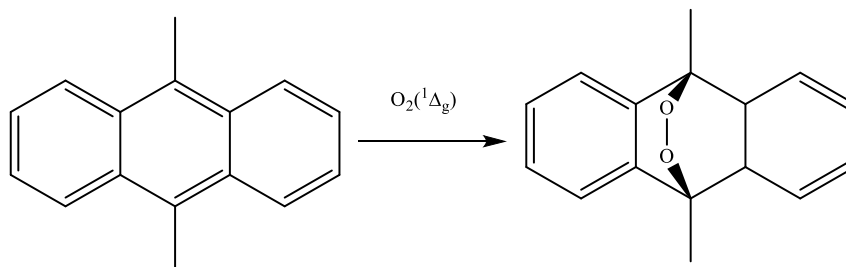
Graficando linealmente el avance de la reacción, de forma tal que el término de la izquierda es la variable dependiente y el tiempo t la variable independiente, se obtiene el valor de k_{obs}^{ABMM} de la pendiente del gráfico.

La fotooxidación de ABMM se utilizó para determinar el rendimiento cuántico de producción de $O_2(^1\Delta_g)$ de los conjugados (Φ_{Δ}^{Ci}) nombrados anteriormente, utilizando el fotosensibilizador TPPS₄⁴⁻ como referencia ($\Phi_{\Delta}^{ref} = 0,71$ ¹⁵³), en el mismo solvente (H_2O). El valor de Φ_{Δ}^{Ci} , se obtuvo por comparación directa de las pendientes en la región lineal del gráfico de ajuste mediante la ecuación 6, para una misma absorbancia de los dos compuestos (conjugado y referencia).

$$\Phi_{\Delta}^{Ci} = \frac{\Phi_{\Delta}^{ref} \cdot k_{obs}^{Ci}}{k_{obs}^{ref}} \quad (6)$$

III.15.2. Fotooxidación de 9,10-dimetilantraceno (DMA)

El sustrato DMA, de manera similar que ABMM, desactiva al $O_2(^1\Delta_g)$ exclusivamente por una reacción química (Esquema 17).¹⁵⁴⁻¹⁵⁵



Esquema 17. Reacción de DMA con $O_2(^1\Delta_g)$.

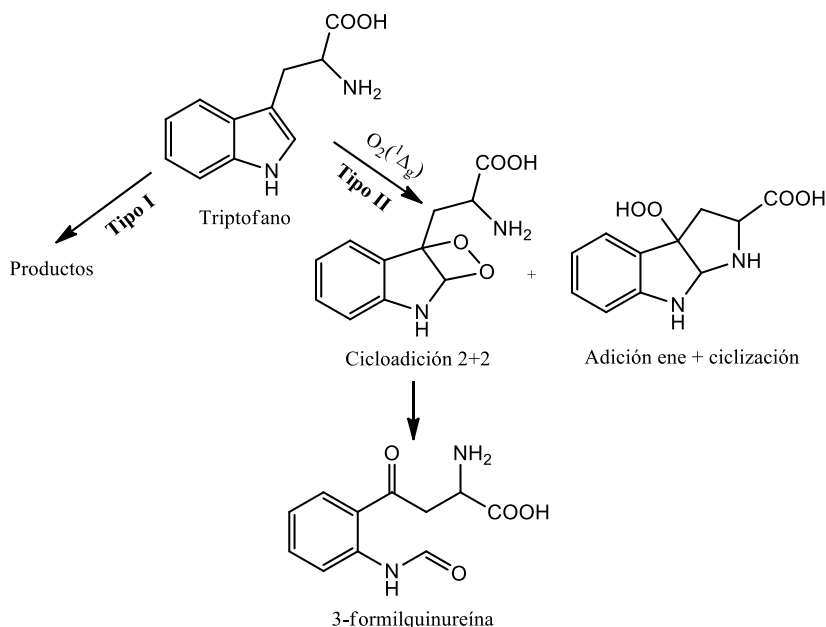
Soluciones de DMA (35 μ M) en el solvente orgánico (DMF o ACN) (2 ml), se prepararon con F₅APP, F₁₀APP, los BODIPYs y también con los diferentes conjugados a fin de determinar el rendimiento cuántico de producción de $O_2(^1\Delta_g)$ de cada uno (Φ_{Δ}^P y Φ_{Δ}^{Ci}). Se utilizaron los PS de referencia TAPP, AcO-BOD-Br₂ y TPPS₄⁴⁻ respectivamente ($\Phi_{\Delta}^{TAPP}=0,53$ en DMF ¹⁵¹, $\Phi_{\Delta}=0,79$ AcO-BOD-Br₂ en ACN ¹⁵⁰, Φ_{Δ} TPPS₄⁴⁻=0,71 en agua ¹⁵⁶). La absorbancia en la longitud de onda de irradiación de los PS se mantuvo en ~ 0.3 . La irradiación se llevó a cabo en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. La irradiación se llevó a cabo de tres maneras diferentes según el PS utilizado:

- La disposición *i* de la Figura 11 para la fotooxidación de DMA con los conjugados derivados de MNPSINH-F₁₉TAP.
- La disposición *ii* de la Figura 11 para la fotooxidación de DMA con los conjugados MNPSINH-BODIPYs.
- La disposición *iii* de Figura 11 la para la fotooxidación de DMA con las porfirinas F₅TAP y F₁₀TAP.

Las cinéticas de fotooxidación de DMA en a) y c) se estudiaron siguiendo la disminución de la absorbancia a $\lambda_{max}= 378$ nm. Mientras que en b) la cinética se monitoreó mediante la disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia a $\lambda= 426$ nm. Luego se procedió de la misma manera que con el sustrato ABMM, descrito anteriormente.

III.15.3. Fotooxidación de L-triptófano (Trp)

El aminoácido Trp se utilizó para analizar la eficiencia de los agentes fotosensibilizadores debido a que puede ser fotooxidado eficientemente por un mecanismo tipo I o II (Esquema 18) ¹⁵⁷⁻¹⁵⁸



Esquema 18. Reacción de Trp con el oxígeno $O_2(^1\Delta_g)$.

Soluciones de Trp (20 μ M) y el conjugado correspondiente (o el PS de referencia, en las mismas concentraciones que la experiencia con ABMM), disuelto en 2 ml de H_2O , se irradiaron en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico ($\lambda_{irr} > 455$ nm) ($A^{\lambda=515\text{ nm}} \sim 0,1$ tanto del conjugado como del PS referencia), según la disposición *i* de la Figura 11. Las cinéticas de fotooxidación de Trp se estudiaron siguiendo la disminución de la fluorescencia a $\lambda_{m\acute{a}x} = 347$ nm. Los espectros de fluorescencia se obtuvieron excitando las muestras a $\lambda_{exc} = 290$ nm ($A^{290}_{Trp} \approx 0,1$). En estas condiciones experimentales, la intensidad de fluorescencia del Trp es lineal con la variación de la concentración. Para la reacción de Trp con $O_2(^1\Delta_g)$ en estado estacionario (ecuación 7), la velocidad de desaparición del sustrato es expresada por la ecuación 8.



$$\frac{d[\text{Trp}]}{dt} = -k_r [^1O_2][\text{Trp}] = -k_{obs}[\text{Trp}] \quad (8)$$

Integrando ecuación 8 se obtiene:

$$\ln \frac{[\text{Trp}]_0}{[\text{Trp}]_t} = k_{obs} t \quad (9)$$

Donde $[\text{Trp}]_0$ y $[\text{Trp}]_t$ representan las concentraciones de Trp a tiempo de reacción cero y a un determinado tiempo t de reacción, respectivamente. Si se reemplazan estas concentraciones por las intensidades de fluorescencia correspondientes, a $\lambda = 347$ nm, se obtiene:

$$\ln \frac{I_0}{I_t} = k_{obs} t \quad (10)$$

Graficando de forma lineal el avance de la reacción, de modo tal que el término $\ln(I_0/I)$ es la variable dependiente y el tiempo t la variable independiente, se obtiene el valor de k_{obs} de la pendiente de dicho gráfico.

III.16. Estudios con microorganismos

Los microorganismos seleccionados para llevar a cabo los experimentos *in vitro* fueron la levadura *C. albicans*, la bacteria Gram positiva, *S. aureus* y la Gram negativa, *E. coli*.

III.16.1. Condiciones de crecimiento

Una cepa de *Candida sp* (PC31) se aisló a partir de una muestra clínica de lesión en piel humana y se caracterizó de acuerdo a los procedimientos convencionales¹⁵⁹. La primera caracterización del cultivo se basó sobre las características de las colonias (pigmentación y forma), su modo de reproducción vegetativa, la formación de hifas o pseudohifas y la producción de ascosporas.

La identificación de la levadura se realizó por el método automatizado mini API ID 20C AUX (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia), el cual es un sistema estandarizado para la identificación de levaduras que se basa en la asimilación de carbohidratos⁶². La lectura de estos resultados indicó que la cepa en estudio pertenecería a la especie *Candida albicans*.

El cultivo de las levaduras se realizó en aerobiosis durante toda la noche (*overnight*, ON) en CS a 37 °C hasta alcanzar la fase estacionaria. Las células se cosecharon por centrifugación del caldo de cultivo (3000 rpm por 15 min) y se resuspendieron en 4 ml de PBS correspondiente a $\sim 10^7$ unidades formadoras de colonias (UFC/ml). Las células se diluyeron diez veces para obtener $\sim 10^6$ UFC/ml en PBS. Las células viables de *C. albicans* se contaron según el número de UFC sobre placas de Petri con agar Sabouraud (AS), luego de 48 h de incubación a 37°C.

La cepa de referencia *S. aureus* ATCC 25923 se cultivó en agitador rotatorio (100 rpm) a 37 °C en CTS durante 24 h ¹⁶⁰. De este cultivo se transfirieron asépticamente alícuotas de 60 µl a 4 ml de medio fresco y se incubaron con agitación constante a 37 °C, hasta llegar a la mitad de la fase logarítmica (D.O (densidad óptica) ~0,3 a $\lambda=660$ nm). Las células se recogieron por centrifugación de los caldos de cultivo en la fase logarítmica de crecimiento (3000 rpm durante 15 min) y se resuspendieron en 4 ml de PBS. A continuación, se diluyeron las células 1/1000 en PBS, lo que corresponde a $\sim 10^6$ UFC/ml. Las bacterias viables se determinaron en placas de agar tripticosa soya (ATS) luego de ~ 24 h de incubación a 37 °C.

La bacteria *E. coli* (EC7) se aisló de una muestra de material urogenital clínico y se identificó por el método tradicional y por el test mini API ID 32E (BioMérieux), un sistema estandarizado para la identificación de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos *Gram* negativos no exigentes ¹⁶¹. La cepa *E. coli* se cultivó a 37 °C en CTS, ON. Posteriormente, se transfirieron de forma aséptica, alícuotas de 40 µl de este cultivo a 4 ml de medio fresco y se incubaron a 37°C hasta la mitad de la fase logarítmica (D.O= 0,6 a $\lambda=660$ nm). Las células en fase logarítmica de crecimiento se recogieron por centrifugación (3000 rpm, 15 min) de los caldos de cultivo y se resuspendieron en PBS (4 ml). Luego, se realizó una dilución de las células en PBS para obtener una densidad celular de $\sim 10^6$ UFC/ml. El número de UFC/ml se determinó en placas de ATS luego de ~ 24 h de incubación a 37 °C.

III.16.2. Unión de los PS a las células microbianas

Suspensiones de células microbianas (2 ml, $\sim 10^8$ UFC/ml de bacterias y $\sim 10^6$ UFC/ml de levadura) en PBS, fueron tratadas con diferentes concentraciones de los PSs F₅APP, F₁₀APP y TAPP (1,0–5,0 µM para *S. aureus* y 2,5–7,5 µM para *E. coli* y *C. albicans*) y tiempos de incubación (2–15 min), en la oscuridad a 37 °C, en tubos de cultivo de Pyrex (13 x 100 mm). El PS se agregó desde una solución madre ($\sim 0,5$ mM) en DMF. Las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min. Luego se descartó el sobrenadante y se agregaron 2 ml de SDS acuoso al 2%. Las células fueron incubadas durante la noche a 4 °C y luego se sonicó durante 30 min. La concentración de porfirina en el sobrenadante se determinó por espectrofluorimetría ($\lambda_{exc}= 420$ nm, $\lambda_{em}= 653$ nm). Las intensidades de fluorescencia de cada muestra fue referida al número total de células. La concentración del PS en la solución se calculó por comparación con una curva de calibración, la cual fue obtenida con soluciones estándar (0,05-0,2 µM) del PS en 2% SDS.

III.16.3. Fotoinactivación de microorganismos

Suspensiones celulares de *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus* en PBS, se incubaron con los diferentes conjugados y PS en tubos de cultivo Pyrex (13x100 mm) durante 30 min en la oscuridad a 37 °C. Posteriormente, 200 µl de las suspensiones celulares se transfirieron a microplacas de 96 pocillos. Los cultivos se expusieron a la luz visible por diferentes intervalos de tiempo (Figura 11.iv). Luego, se diluyeron en forma consecutiva con PBS y se sembró cada dilución (por triplicado) en placas de AS (*C. albicans*), ATS (*E. coli* y *S. aureus*) (Figura 13). Pasadas las 48 h (*C. albicans*) y 24 h (*E. coli* y *S. aureus*) de incubación a 37 °C, se procedió al recuento de UFC/ml. La experiencia se realizó también utilizando concentraciones diferentes de los conjugados y PS.

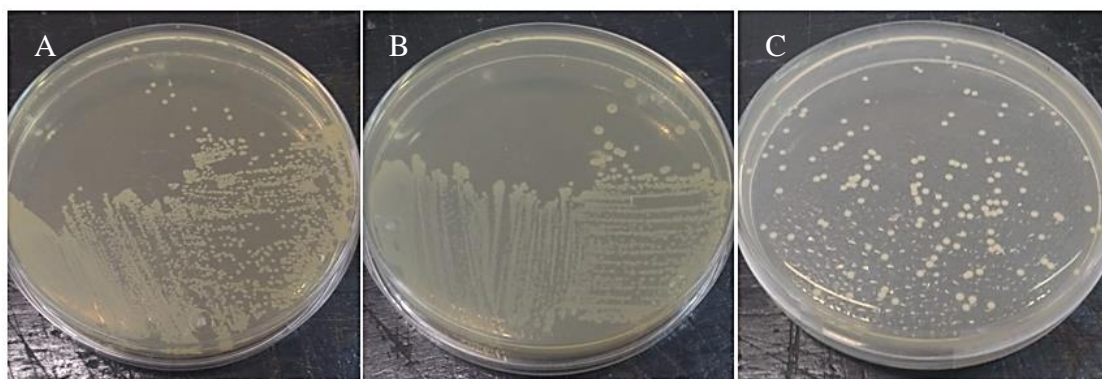


Figura 13. Colonias de células A) *S. aureus*, B) *E. coli* y C) *C. albicans*

III.16.3.1. Inactivación fotodinámica de *C. albicans*

El estudio en *C. albicans* se realizó con los siguientes conjugados y condiciones experimentales.

- MNPNH-TCPP y MNPSINH-TCPP (1,5 mg, 2,5 mg y 5,0 mg –equivalente a 3,0 µM, 5,0 µM y 10 µM de TCPP inmovilizada). 30 min de irradiación. Volumen de la suspensión celular: 1,5 ml.
- MNPNH-TCPP y MNPSINH-TCPP (2,5 mg, 5,0 µM de TCPP inmovilizada). Tiempos de irradiación: 5, 15 y 30 min. Volumen de suspensión celular: 1,5 ml.
- MNPSIN-F₁₉TPP, MNPSIN⁺-F₁₉TPP, MNPSIN-F₁₆TPP-N y MNPSIN⁺-F₁₆TPP-N⁺ (0,4 mg, 2,0 µM de porfirina inmovilizada). Tiempo de irradiación: 30 min. Volumen de suspensión celular: 2 ml.

Se estudió también *C. albicans* con las siguientes porfirinas y condiciones:

F₅APP, F₁₀APP, TAPP:

- Estudio de unión celular. Concentraciones de las porfirinas: 2,5 μ M, 5,0 μ M y 7,5 μ M.
- Estudio de inactivación fotodinámica. Concentraciones de las porfirinas: 2,5 μ M, 5,0 μ M y 7,5 μ M. Tiempos de irradiación: 5, 15 y 30 min.
- Estudio del mecanismo de acción fotodinámica. Concentración de las porfirinas: 5,0 μ M. Tiempo de irradiación: 15 min.

III.16.3.2. Inactivación fotodinámica de *E. coli*

El estudio en *E. coli* se realizó con los siguientes conjugados y condiciones experimentales.

- MNPNH-TCPP y MNPSINH-TCPP (0,5 mg, 1,5 mg y 2,5 mg –equivalente a 1,0 μ M, 2,0 μ M y 5,0 μ M de TCPP inmovilizada). 30 min de irradiación. Volumen de la suspensión celular: 1,5 ml.
- MNPNH-TCPP y MNPSINH-TCPP (2,5 mg, 5,0 μ M de TCPP inmovilizada). Tiempos de irradiación: 5, 15 y 30 min. Volumen de suspensión celular: 1,5 ml.
- MNPSIN-F₁₉TPP, MNPSIN⁺-F₁₉TPP, MNPSIN-F₁₆TPP-N y MNPSIN⁺-F₁₆TPP-N⁺ (0,4 mg, 2,0 μ M de porfirina inmovilizada). Tiempo de irradiación: 30 min. Volumen de suspensión celular: 2 ml.
- MNPSINH-F₄Ph-B-Br₂ y MNPSINH-F₄Ph-B-H₂ (0,5 mg, equivalente a 3,0 μ M de BODIPY inmovilizado). Tiempos de irradiación: 5 y 15 min. Volumen de suspensión celular: 1 ml.

Se estudió también *E. coli* con las siguientes porfirinas y condiciones:

F₅APP, F₁₀APP, TAPP:

- Estudio de unión celular. Concentraciones de las porfirinas: 2,5 μ M, 5,0 μ M y 7,5 μ M.
- Estudio de inactivación fotodinámica. Concentraciones de las porfirinas: 2,5 μ M, 5,0 μ M y 7,5 μ M. Tiempos de irradiación: 5, 15 y 30 min.
- Estudio del mecanismo de acción fotodinámica. Concentración de las porfirinas: 5,0 μ M. Tiempo de irradiación: 5 min.

III.16.3.3. Inactivación fotodinámica de *S. aureus*

El estudio en *S. aureus* se realizó con los siguientes conjugados y condiciones experimentales.

- MNPNH-TCPP y MNPSINH-TCPP (0,5 mg, 1,5 mg y 2,5 mg –equivalente a 1,0 μM , 2,0 μM y 5,0 μM de TCPP inmovilizada). 30 min de irradiación. Volumen de la suspensión celular: 1,5 ml.
- MNPNH-TCPP y MNPSINH-TCPP (2,5 mg, 5,0 μM de TCPP inmovilizada). Tiempos de irradiación: 5 y 15 min. Volumen de suspensión celular: 1,5 ml.
- MNPSIN-F₁₉TPP, MNPSIN⁺-F₁₉TPP, MNPSIN-F₁₆TPP-N y MNPSIN⁺-F₁₆TPP-N⁺ (0,4 mg, 2,0 μM de porfirina inmovilizada). Tiempo de irradiación: 15 min. Volumen de suspensión celular: 2 ml.
- MNPSINH-F₄APP y MNPSINH-F₉APP (0,5 mg y 1,0 mg, equivalente a 2,5 μM y 5,0 μM de porfirina inmovilizada). Tiempos de irradiación: 5 y 15 min. Volumen de suspensión celular: 2 ml.
- MNPSINH-F₄Ph-B-Br₂ y MNPSINH-F₄Ph-B-H₂ (0,5 mg, equivalente a 3,0 μM de BODIPY inmovilizado). Tiempos de irradiación: 5 y 15 min. Volumen de suspensión celular: 1 ml.

Se estudió también *S. aureus* con las siguientes porfirinas y condiciones:

F₅APP, F₁₀APP, TAPP:

- Estudio de unión celular. Concentraciones de las porfirinas: 1,0 μM , 2,5 μM y 5,0 μM .
- Estudio de inactivación fotodinámica. Concentraciones de las porfirinas: 2,5 μM , 5,0 μM y 7,5 μM . Tiempos de irradiación: 5, 15 y 30 min.
- Estudio del mecanismo de acción fotodinámica. Concentración de las porfirinas: 1,0 μM . Tiempo de irradiación: 5 min.

III.16.4. Curva de crecimiento

III.16.4.1. Curva de crecimiento de *C. albicans*

Las células en fase estacionaria se cosecharon por centrifugación del caldo de cultivo (3000 rpm, 15 min) y se resuspendieron en 4 ml de PBS 10 mM, correspondiente a $\sim 10^7$ UFC/ml. Una porción (1 ml) del cultivo se transfirió asépticamente a 20 ml de medio fresco

de CS. La suspensión homogeneizada se fraccionó en tubos tipo Pyrex (2 ml) y se adicionó la cantidad apropiada del conjugado MNPNH-TCPP (10 mg, 15 μ M de TCPP inmovilizada). Los cultivos se incubaron a 37°C e irradiaron con luz visible (disposición v, Figura 11). En intervalos de 30 min se determinó la D.O ($\lambda= 660$ nm). Las curvas de crecimiento se representaron en un gráfico de absorbancia vs. tiempo de irradiación.

III.16.4.2. Curva de crecimiento de *E. coli*

Una alícuota (60 μ l) de cultivo ON en CTS fue transferido a 20 ml de este mismo caldo fresco. A continuación, la suspensión se homogeneizó y se añadieron a alícuotas de 2 ml de cultivo, 10 mg de MNPNH-TCPP. Los tubos tratados fueron inmediatamente irradiados con luz visible a 37°C. En este experimento, la irradiación se realizó sin incubación previa porque este protocolo se utilizó para evaluar la capacidad del PS de atenuar el crecimiento del cultivo celular. El crecimiento del cultivo celular se midió, en intervalos de 60 minutos, por D.O a 660 nm. Las curvas de crecimiento se representaron en un gráfico de absorbancia vs. tiempo de irradiación.

III.16.4.3. Curva de crecimiento de *S. aureus*

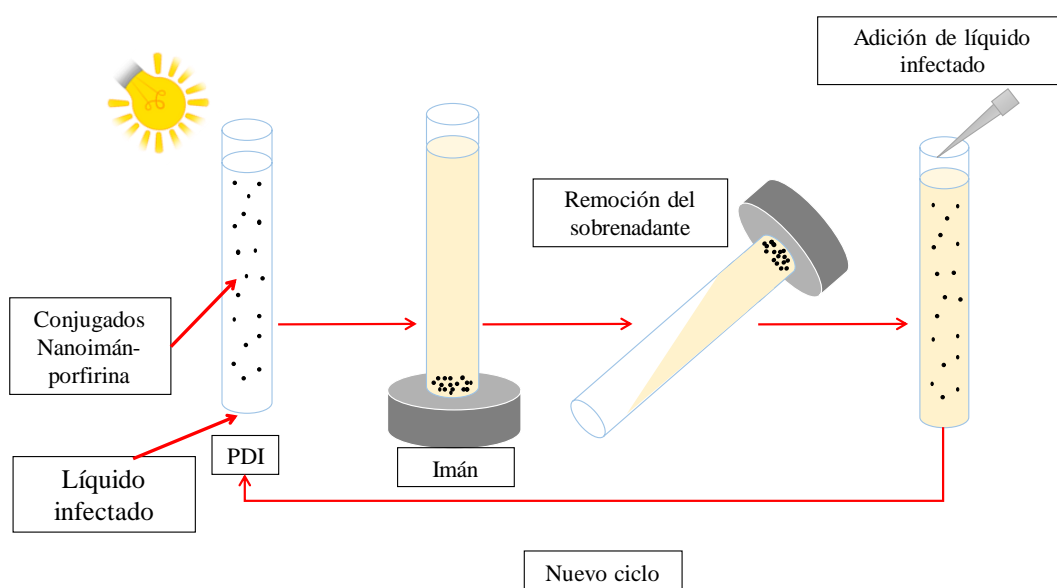
Se procedió de manera similar a *E. coli*. Sin embargo, la cepa de *S. aureus* utilizada, en las condiciones óptimas de crecimiento, produce agentes endógenos PS de especies reactivas que provocan la autoinactivación de las células evitando el crecimiento microbiano¹⁶².

III.16.5. Reutilización de conjugados nanopartícula magnética-porfirina en la PDI de microorganismos

Las suspensiones celulares de microorganismos en PBS se incubaron con los conjugados correspondientes durante 30 min en la oscuridad a 37 °C. Posteriormente, 200 μ l de las suspensiones celulares se transfirieron a microplacas de 96 pocillos. Luego, las células fueron expuestas a luz visible durante 30 min. A continuación, se procedió a la recuperación de los conjugados mediante decantación magnética. El líquido remanente se diluyó en forma seriada con PBS, y cada dilución se sembró por triplicado en placas con los medios correspondientes a cada microorganismo. Por otra parte, los conjugados recuperados se resuspendieron en una nueva suspensión celular en PBS, se mantuvieron 30 min en oscuridad y se procedió a irradiar de igual manera a lo explicado anteriormente. Este procedimiento (Figura 19) se realizó dos veces más, obteniendo como resultado el número de colonias contadas en cada etapa de recuperación.

El estudio de reutilización se realizó con los siguientes conjugados y sus correspondientes concentraciones, en los tres microorganismos seleccionados.

- MNPNH-TCPP y MNPSINH-TCPP (1,5 mg, 4,5 μ M de TCPP inmovilizada). Tiempos de irradiación: 30 min en *C. albicans* y *E. coli*, 15 min en *S. aureus*. Volumen de suspensión celular: 1 ml.
- MNPSIN⁺-F₁₆TPP-N⁺ (0,2 mg, 2,0 μ M de porfirina inmovilizada). Tiempos de irradiación: 30 min en *C. albicans* y *E. coli*, 15 min en *S. aureus*. Volumen de suspensión celular: 2 ml.



Esquema 19. Método de recuperación de los conjugados nanopartícula magnética-porfirina para su posterior reutilización.

III.16.6. Estudio del mecanismo de fotoinactivación de las porfirinas F₅APP, F₁₀APP y TAPP

Suspensiones celulares de *C. albicans* (2 ml, $\sim 10^6$ UFC/ml), *E. coli* (2 ml, $\sim 10^7$ UFC/ml) y *S. aureus* (2 ml, $\sim 10^7$ UFC/ml) en PBS se trataron de diferentes maneras. Por un lado se estudiaron en presencia de azida o D-manitol (50 mM). Los microorganismos en las condiciones antes descritas, se incubaron en agitación durante 30 min a 37 °C en la oscuridad con las porfirinas F₅APP, F₁₀APP y TAPP (1 μ M en *S. aureus*, 5 μ M en *C. albicans* y *E. coli*). Luego, los cultivos se irradiaron con luz visible durante 5 min en *S. aureus* y *E. coli*, mientras que el tiempo de irradiación para *C. albicans* fue de 15 min.

Por otro lado, se realizaron ensayos de fotoinactivación en D₂O. Para ello, las células se centrifugaron (3000 rpm durante 15 min), se resuspendieron en 2 ml de PBS en D₂O y se incubaron 30 min con el nuevo medio para permitirle al microorganismo adaptarse al mismo. Posteriormente, se incubó con la cantidad correspondiente de las porfirinas como se describió anteriormente.

Las suspensiones celulares se diluyeron en forma consecutiva con PBS y se sembró cada dilución (por triplicado) en placas de AS (*C. albicans*), ATS (*E. coli* y *S. aureus*). Luego de 48 h (*C. albicans*) y 24 h (*E. coli* y *S. aureus*) de incubación a 37 °C, se procedió a contar las UFC.

III. 16. 7. Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia se utilizó para observar el poder citotóxico de los conjugados C2, C4, MNPSINH-F₄Ph-BOD-Br₂ y MNPSINH-F₄Ph-BOD-H₂ en las bacterias *E. coli* y *S. aureus*. También mediante esta técnica se observó la fluorescencia de bacterias marcadas con el conjugado MNPSINH-F₄Ph-BOD-H₂.

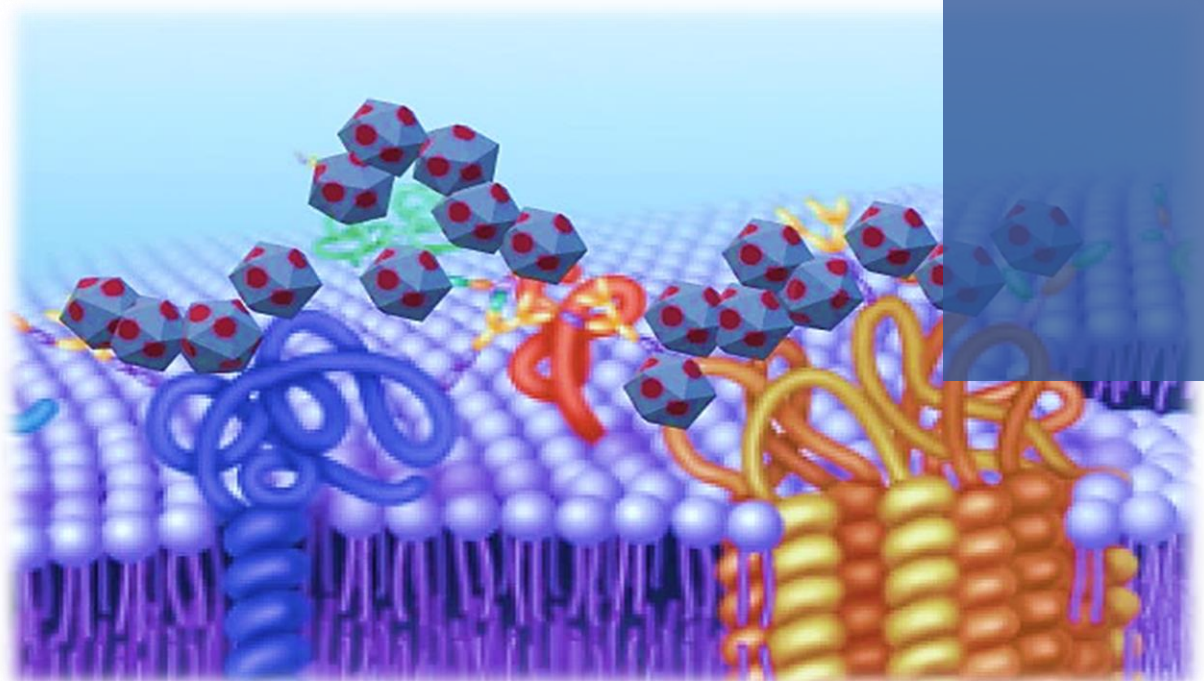
Para llevar a cabo los experimentos, las cepas de *E. coli* se cultivaron por 24 h a 37°C en agar TS. Los cultivos se prepararon a partir de una única colonia aislada proveniente de un cultivo puro. La cepa *E. coli* C7 se cultivó en agar TS durante 24 h a 37°C, luego se adicionaron 2 ml de una solución amortiguadora de fosfato salino (PBS, pH=7,4) a la placa de cultivo y se recogió la suspensión bacteriana fresca. El cultivo se centrifugó a 3000 rpm por 10 min y el pellet se lavó con PBS 3 veces. El mismo procedimiento se llevó a cabo para cepas de *S. aureus*.

Para los ensayos por microscopia de fluorescencia, se diseñó una cámara de vidrio compuesta por un cilindro de plástico adherido a un cubreobjetos de vidrio (20 x 20 mm). La cámara se inmovilizó a la platina del microscopio y se ajustó la temperatura a 37°C. Las muestras se trataron con 1 µM de yoduro de propidio (PI, fluorocromo rojo que interacciona con el ADN y nos permite observar la morfología nuclear) y 3 µM del conjugado correspondiente. Posteriormente, las muestras se irradiaron en un microscopio de fluorescencia invertido con un filtro azul (filtro de excitación de paso de banda, $\lambda_{exc} = 410-500$ nm, 0,4 mW/cm²) y se observó la emisión en el rojo ($\lambda_{em} >530$ nm).

III.17. Análisis estadísticos

Todos los experimentos fueron repetidos separadamente tres veces. Fue utilizada la prueba t-Student o Test-T para establecer diferencias significativas entre grupos, mediante el método ANOVA. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95 % ($p < 0.05$). Los datos fueron representados como la $\text{media} \pm \text{desviación estándar}$ de cada grupo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



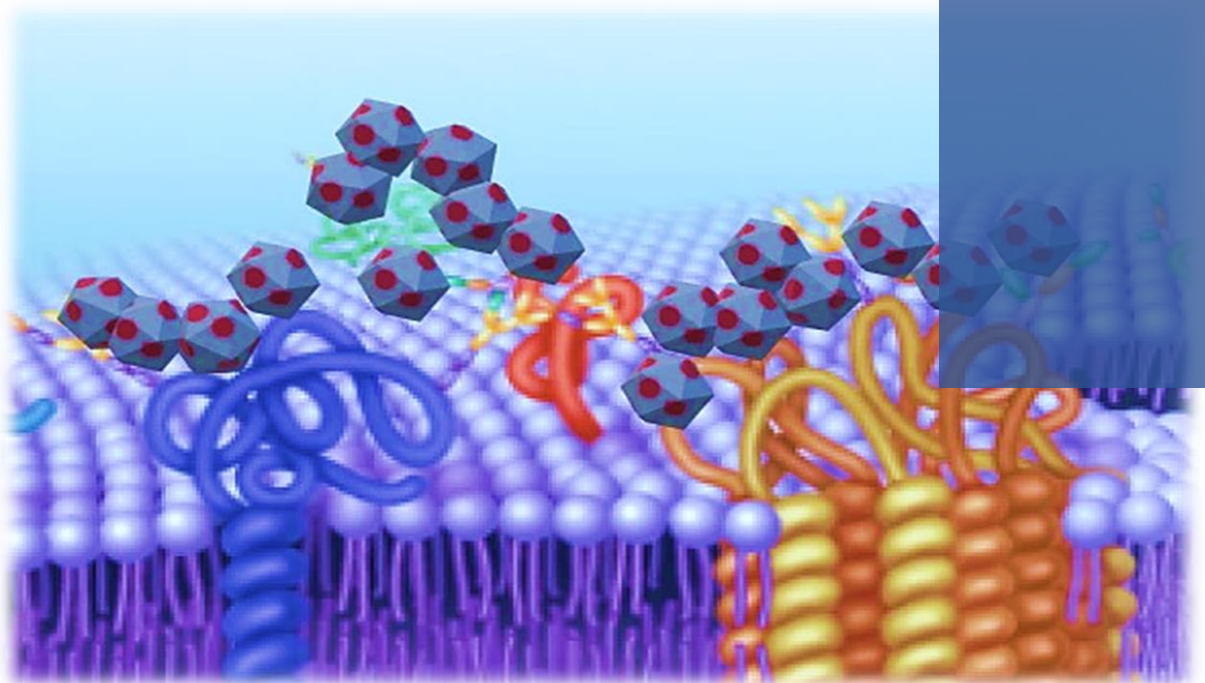
CAPÍTULO IV

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se muestran las discusiones respecto a los resultados que se fueron obteniendo en el proceso de estudio y obtención de NP magnéticas, que van desde la síntesis del núcleo magnético, Fe_3O_4 , hasta la obtención de diferentes conjugados con porfirinas. Se llegó a estudiar además, la conjugación con BODIPYs.

Los resultados corresponden al uso de diferentes técnicas de caracterización que permiten conocer la morfología de las NP y sus conjugados, las propiedades espectroscópicas de absorción y emisión de fluorescencia y las propiedades fotofísicas. Además, se utilizaron tres microorganismos de diferente susceptibilidad a la muerte, para el estudio de la capacidad fotoinactivante de cada uno de los conjugados desarrollados.

***IV.1. Conjugados nanopartículas magnéticas-
porfirina tetraácida, MNPNH-TCPP***



En el presente subcapítulo se muestran los resultados de la síntesis del núcleo magnético Fe_3O_4 , la funcionalización del mismo con grupos propilamino y la conjugación con una porfirina tetraácida, mediante uniones amida. Se muestran también las diferentes técnicas de caracterización de las etapas de síntesis, estudios de actividad e inactivación fotodinámica.

IV.1.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas

IV.1.1.1 Síntesis de NP de Fe_3O_4 . Método de coprecipitación.

Las NP de óxido de hierro (Fe_3O_4) (MNP), se sintetizaron por el método de coprecipitación convencional con algunas modificaciones ¹⁴³. A una solución de $FeCl_2$ y $FeCl_3$ en agua se adicionó NH_4OH a $80^\circ C$. El color de la solución pasó de naranja a negro inmediatamente y se comprobó que el pH fuera 9. Las MNP se lavaron con agua pura por decantación magnética. Luego, se resuspendieron y centrifugaron con el fin de utilizar las NP más pequeñas (NP del sobrenadante).

IV.1.1.2. Síntesis de MNP de Fe_3O_4 con terminaciones amino (MNP NH_2)

Las NP magnéticas sintetizadas en el punto anterior se lavaron con acetona por decantación magnética y se resuspendieron en dicho solvente. Luego de tratarse con ultrasonido por 45 min, se adicionó una solución de APTS en tolueno (0,3 M). La reacción se llevó a cabo con agitación continua a $60^\circ C$ por 4 h, y se dejó reaccionando 12 h a $37^\circ C$ (Esquema 8)¹⁴⁵. Las NP recubiertas con grupos amino (MNP NH_2) se purificaron mediante sucesivos lavados con etanol, por decantación magnética.

Se intentó sintetizar las MNP NH_2 mediante el mismo procedimiento anteriormente mencionado con la diferencia del medio de reacción, utilizando etanol¹⁶³ en lugar de la mezcla tolueno:acetona. Sin embargo, se obtuvieron resultados negativos. Al realizar los lavados por decantación magnética, se observó, tanto por espectroscopía IR como UV-visible, que el producto contenía las mismas características que las MNP en lugar de las recubiertas con grupos amino.

IV.1.1.3. Síntesis del conjugado MNP NH_2 -TCPP

La síntesis del conjugado MNP NH_2 -TCPP (Esquema 8) se llevó a cabo mediante dos procedimientos diferentes, utilizando una porfirina que contiene cuatro grupos carboxilos terminales. Los carbonilos presentes en dicha porfirina, fueron el centro de ataque nucleofílico

de los grupos amino que contienen las nanopartículas magnéticas recubiertas, formándose uniones amida (-COONH-) entre $MNPNH_2$ y TCPP, dando como producto el conjugado. La unión covalente, en ambos procedimientos, se realizó en presencia de NHS y EDC (Esquema 7).

En ambos casos, las $MNPNH_2$ se hicieron reaccionar con una solución de TCPP “activada”¹⁴⁵. La diferencia en los procedimientos consistió en la utilización de determinados solventes y cantidades en la activación de TCPP. Por un lado, TCPP se mezcló con EDC y NHS en 20 ml de agua (TCPP: EDC: NHS, 1:90:18)¹⁴⁵. Por otro lado, TCPP se disolvió en DMF y luego se mezcló con una solución de EDC/NHS en H_2O (TCPP: EDC: NHS, 1:4:4) durante 2 h a 25 °C. Finalmente, ambas soluciones de TCPP activadas se mezclaron con las $MNPNH_2$, calentando a 60 °C, durante 24 h en atmósfera de Ar. El conjugado formado en ambos casos se lavó con agua y etanol por decantación magnética. Al comparar la concentración de TCPP aproximada unida a las $MNPNH_2$, se observó que la concentración de TCPP por mg de nanopartícula magnética obtenida, es unas 150 veces mayor cuando TCPP se activa en el solvente orgánico. Esto puede deberse a la buena solubilidad que presenta la TCPP en DMF, acompañado de un mejor proceso de activación del grupo carboxilo utilizando cantidades equimolares de EDC y NHS.

IV.1.2. Caracterización de las MNP

IV.1.2.1. Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

La Figura 14 muestra fotografías de TEM de MNP y $MNPNH_2$. En dichas imágenes se observa la presencia de sistemas nanométricos. No se encontró un aumento considerable en el tamaño de las NP luego de ser recubiertas con APTS. Este resultado coincide con trabajos publicados previamente por otros autores¹⁶⁴⁻¹⁶⁵. En las fotografías pueden verse también, la formación de agregados entre las MNP y las $MNPNH_2$.

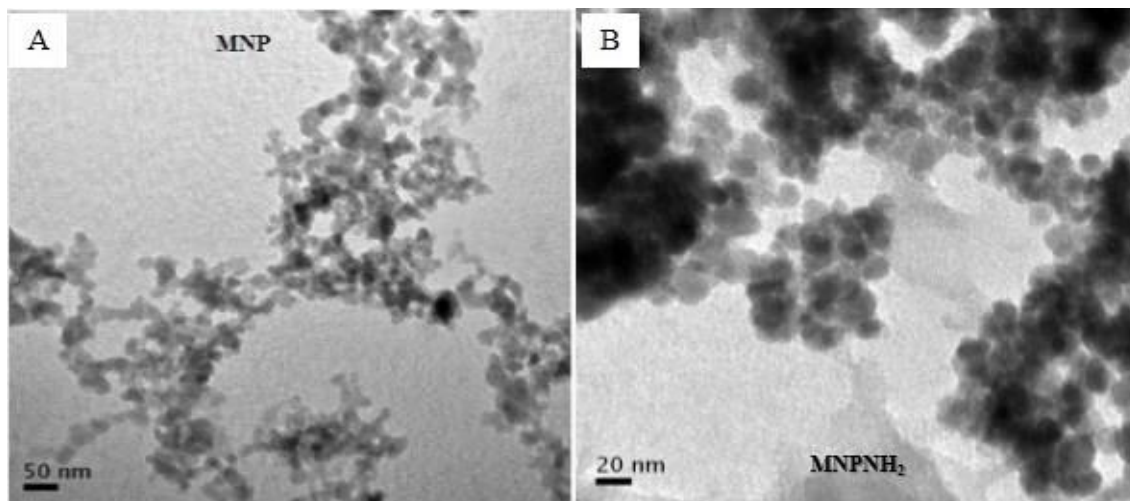


Figura 14. Imágenes típicas de TEM de (A) MNP, (B) MNPNH₂.

IV.1.2.3 Espectroscopía infrarroja por transformada de *Fourier* (FT-IR)

La espectroscopía infrarroja se ha usado para determinar cualitativamente si se produjo el recubrimiento de las MNP por los grupos amino, luego del agregado de APTS. La Figura 15 muestra los espectros FT-IR de las NP magnéticas sin recubrir, MNP, del compuesto de cobertura, APTS y de las NP magnéticas recubiertas, MNPNH₂.

Como principales picos característicos de MNP (Fe₃O₄) se pueden observar el de 590-575 cm⁻¹, correspondiente al estiramiento Fe-O y el de 3600-3200 cm⁻¹, banda ancha del estiramiento O-H en interacción puente hidrógeno. Por otro lado, el reactivo APTS presenta picos característicos de estiramientos C-H a 2930 cm⁻¹ y 2850 cm⁻¹, y los de flexión C-H a 2850 cm⁻¹. También pueden observarse bandas correspondientes a los estiramientos C-N y N-H a 1360-1180 cm⁻¹ y 3400-3200 cm⁻¹, respectivamente. El espectro FT-IR del producto de reacción entre MNP y APTS luego de varios lavados con etanol, muestra los picos característicos del cobertor y de las NP magnéticas. Además, se produce una disminución en el ancho de la banda que aparece a 3530-3240 cm⁻¹, zona en la que absorben y se superponen los estiramientos O-H y N-H. En el compuesto MNPNH₂ la cantidad de grupos -OH es menor que en MNP, razón por la que puede atribuirse la disminución del ancho de dicha banda. Estos resultados coinciden con los encontrados anteriormente por otros autores¹³¹⁻¹³². Es importante destacar que cuando se intentó recubrir a las MNP con APTS utilizando etanol como medio de reacción, el espectro FT-IR del producto coincidía con el de MNP sin ninguna banda adicional correspondiente a APTS,

lo cual era uno de los indicios de que las NP magnéticas no estaban siendo funcionalizadas con grupos amino.

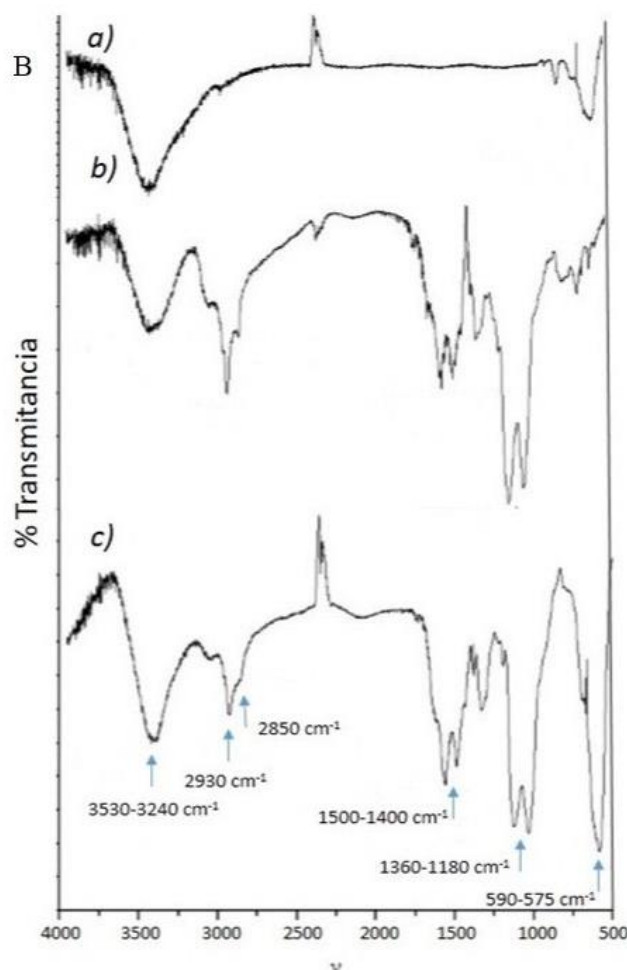


Figura 15. Espectros FT-IR de a) MNP, b) APTS y c) MNPNH₂

IV.1.2.4 Determinación de sitios activos –NH₂

Una solución de 2,4-FDNB se hizo reaccionar con tres stocks de suspensiones de NP magnéticas: MNP (control negativo), MNPNH₂ y MNPNH-TCPP; a temperatura ambiente, durante 6 h. El exceso de 2,4-FDNB se separó del producto formado, mediante decantación magnética, y se hizo reaccionar con *n*-butilamina, para formar *N*-butil-2,4-dinitroanilina. Este compuesto, de color amarillo, presenta una banda de absorción en el espectro UV-visible ($\lambda_{\text{Máx}}=350$ nm). Las absorbancias obtenidas se detallan en la Tabla 1.

La diferencia entre las concentraciones de *i*) y *ii*) (Tabla 1) puede dar una medida de la cantidad de 2,4-FDNB que reaccionó con los grupos *amino* de las MNPNH₂. Debido a que la reacción de sustitución nucleofílica aromática es 1:1, respecto a los reactivos, la cantidad de 2,4-FDNB que reaccionó se iguala a la cantidad de grupos *amino* presentes en las NP magnéticas. Realizando la diferencia correspondiente entre la cantidad de ($2 \times 10^{-3} \text{ M} - 1,8 \times 10^{-3} \text{ M}$), se obtiene que la cantidad de grupos *amino* presentes en una muestra de MNPNH₂ es: $2 \times 10^{-4} \text{ M}$. Teniendo en cuenta que se usaron 2 ml de 2,4-FDNB y que éstos se hicieron reaccionar con 70 mg de MNPNH₂, se obtiene que hay alrededor de 5,7 nmoles de grupos amino, por mg de NP magnética (5,7 nmol/mg de -NH₂).

Tabla 1. Absorbancias correspondientes a la relación entre el exceso de 2,4-FDNB y N-butilamina.

Reacción	Absorbancia ($\lambda=350 \text{ nm}$)
(Blanco) 2,4-FDNB + n-butilamina	1,01
i)a) MNPSi + 2,4-FDNB b) Exceso 2,4-FDNB + n-butilamina	1,01
ii)a) MNPSiNH ₂ + 2,4-FDNB b) Exceso 2,4-FDNB + n-butilamina	0,90
iii)a) MNPSiNH-TCPP + 2,4-FDNB b) Exceso 2,4-FDNB + n-butilamina	0,96

IV.1.2.5 Cantidad de porfirina unida covalentemente en el conjugado MNPNH-TCPP

Los resultados de la experiencia anterior permiten realizar un cálculo aproximado de la cantidad de porfirina que se enlaza covalentemente a las NP. Con el valor de la absorbancia de N-butyl-2,4-dinitroanilina (reacción *iii*) mostrada en el Esquema 9, ($A^{\lambda=350} = 0,96$), puede obtenerse que la concentración de grupos amino libres (-NH₂), es ~3 nmol por miligramo de NP (3 nmol/mg). Esta concentración se refiere a los grupos -NH₂ presentes en las NP que no formaron enlace covalente con la porfirina. Debido a que se utilizó la misma cantidad de MNPNH₂ y MNPNH-TCPP para realizar la experiencia (70 mg), es posible calcular la concentración aproximada de porfirina unida covalentemente, mediante la siguiente diferencia:



Por lo tanto, los resultados indican que por mg de NP magnética hay aproximadamente 3 nmol de porfirina inmovilizada.

IV.1.2.6 Medida de la adsorción de la porfirina en las nanopartículas magnéticas

Luego de realizar las experiencias, como se detalla en la sección III.5, se calcularon las concentraciones de TCPP finales, es decir, las que quedan en los lavados (cantidad de TCPP sin unirse a las NP). Cada lavado se realizó con agua y etanol, luego de sonicar las correspondientes mezclas durante 5 min. Mediante espectroscopía UV-vis se corroboró que el sobrenadante del lavado final no tuviera porfirina disuelta.

Por un lado, la concentración final de TCPP en los lavados de la mezcla TCPP/EDC/NHS+MNPNH₂, es 3,2±0,1 mM (teniendo en cuenta que se usaron 20 mg, implicaría que posiblemente alrededor de 3 nmol de TCPP/mg de NP, están unidos covalentemente). Por otro lado, la concentración final de TCPP en los lavados de la mezcla TCPP+MNPNH₂, es 3,4±0,1 mM. Esta diferencia implicaría que la TCPP no se adsorbe en las NP. Además de estos cálculos, se midieron los espectros UV-visible correspondientes a las NP magnéticas involucradas en cada mezcla. El espectro de las MNPNH₂ mezcladas con la TCPP sin activantes, no muestra rastros (banda Soret) correspondiente a adsorción de TCPP (línea discontinua Figura 16). Por el contrario, el espectro de las NP que fueron mezcladas con TCPP/EDC/NHS, muestran una banda, correspondiente a la unión covalente de la TCPP a las MNPNH₂ (línea continua Figura 16).

IV.1.2.4 Espectroscopía de absorción UV-visible

La Figura 16 muestra los espectros de absorción del producto de reacción de MNPNH₂ con TCPP, la dispersión de luz de MNPNH₂, la diferencia de absorbancias entre estos dos y el espectro de absorción de TCPP que quedó sin reaccionar. Se puede observar una banda *Soret* a $\lambda_{\text{máx}} = 437 \text{ nm}$ y cuatro bandas *Q* (en la región 500-650 nm) ($Q_x(0,0)$, $Q_x(1,0)$, $Q_y(0,0)$ y $Q_y(1,0)$),

asociadas con una simetría D_{2h} ³⁸⁻³⁹ características de porfirinas base libre⁴⁰. La presencia de dichas bandas indica el éxito del proceso de formación del enlace amida entre $MNP-NH_2$ y TCPP, por lo que podría decirse que el espectro corresponde al conjugado $MNP-NH-TCPP$. Por otro lado, el espectro de la TCPP sin reaccionar coincide con el de TCPP monómero en el mismo solvente.

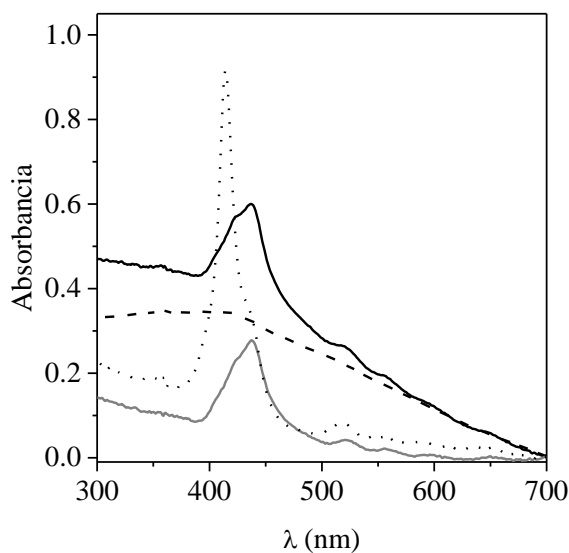


Figura 16. Espectros de absorción de $MNP-NH-TCPP$ (línea continua), $MNP-NH_2$ (línea discontinua), diferencia de absorción ($MNP-NH-TCPP$) – ($MNP-NH_2$) (línea gris) y TCPP (línea discontinua punteada) en agua

En el espectro de $MNP-NH-TCPP$ se observa un corrimiento batocrómico de 24 nm ($\lambda_{m\acute{a}x}=413$ nm TCPP disuelta a $\lambda_{m\acute{a}x}=437$ nm TCPP inmovilizada sobre MNP), junto con un ensanchamiento de la banda *Soret* de la TCPP, respecto a cuando el fotosensibilizador no está unido covalentemente a las MNP. Estos hechos indican la presencia de interacción entre las porfirinas en la estructura de las MNP, efecto que también se observa en porfirinas inmovilizadas sobre una superficie y se lo asocia generalmente a una agregación parcial del fotosensibilizador¹⁶⁶.

En la Tabla 2 pueden observarse las diferencias en los parámetros espectroscópicos, correspondientes al conjugado $MNP-NH-TCPP$ y a la porfirina TCPP libre. Debido a la presencia de interacción entre las moléculas de porfirina, enlazadas a $MNP-NH_2$, se puede afirmar que el valor de absortividad molar (ϵ) de TCPP unida es menor al de TCPP libre, pero no se conoce el valor exacto.

Tabla 2. Propiedades espectroscópicas UV-visible de MNP-TCPP y TCPP libre en agua.

PS	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{Soret}}$ (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
TCPP	413	$3,65 \times 10^{5(a)}$
MNPNH-TCPP	437	---

(a) ¹⁶⁷

IV.1.3. Actividad fotodinámica

IV.1.3.1. Fotooxidación de ABMM

La producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ por el conjugado MNPNH-TCPP se estudió por un método indirecto en presencia de ABMM. Esta molécula reacciona específicamente con el $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, dando lugar a un endoperóxido en su estructura, formado por la oxidación de los dobles enlaces en el anillo central. De esta manera, el sustrato ABMM desactiva $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ por una reacción química exclusivamente (Esquema 16) ¹⁵¹.

La fotooxidación se siguió por espectroscopía de absorción en el visible, monitoreando la disminución de la absorbancia de una de las bandas características de ABMM ($\lambda_{\text{máx}}=379$ nm), como se ilustra en la Figura 17. Esto fue posible debido a que el endoperóxido que se forma, no presenta absorción en el visible.

La descomposición de ABMM (~ 35 μM) fotosensibilizada por MNPNH-TCPP (1 mg, $3\mu\text{M}$ de TCPP inmovilizada) se estudió en agua irradiando la solución a intervalos de tiempo de 5 min ($\lambda_{\text{irr}}=455\text{-}800$ nm, región en la que sólo absorbe el conjugado). Debido a que TCPP libre no es muy soluble en agua, se utilizó como referencia la porfirina aniónica TPPS₄⁴⁻, la cual, además, no interacciona con ABMM (a diferencia de la mayoría de las porfirinas catiónicas), permitiendo una adecuada producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ ¹⁵¹.

La fotooxidación de ABMM sigue una cinética de pseudo primer orden a la longitud de onda 379 nm, con respecto a la concentración de ABMM. La Figura 17 b muestra las gráficas semilogarítmicas típicas que describen el progreso de la reacción estudiada. A partir de las pendientes de estos gráficos, se obtuvieron las constantes de velocidad observadas ($k_{\text{obs}}^{\text{ABMM}}$, Figura 17 b) del conjugado MNPNH-TCPP y de TPPS₄⁴⁻. El rendimiento cuántico de producción (Φ_{Δ}) de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ de MNPNH-TCPP se calculó comparando dichas pendientes.

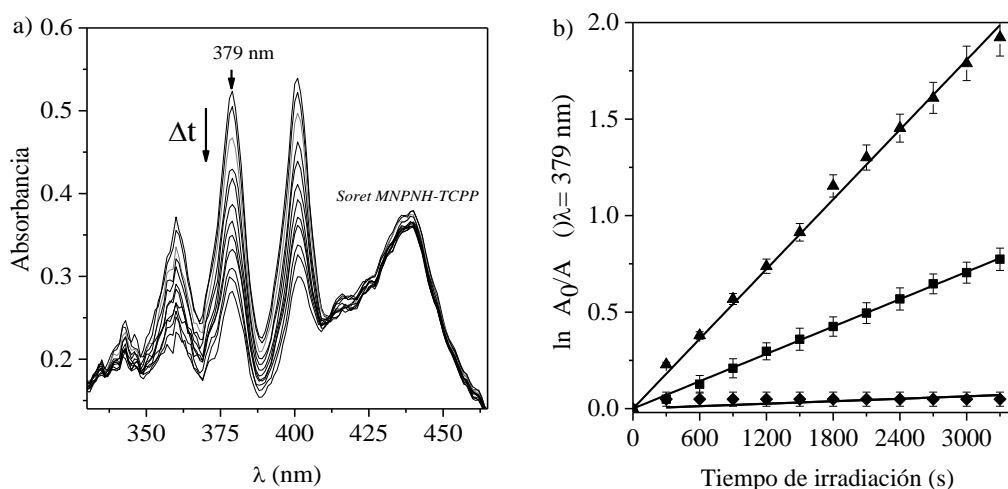


Figura 17. Fotooxidación de ABMM (35 μM). a) Cambios en el espectro de absorción de ABMM sensibilizado por MNPNH-TCPP. b) Gráficos de primer orden para MNPNH₂ (◆), MNPNH-TCPP (■) y TPPS₄⁴⁻ (ref) (▲), en H₂O. $\lambda_{\text{irr}} = 455\text{-}800\text{ nm}$, $\Delta t_{\text{irr}} = 5\text{ min}$.

El conjugado MNPNH-TCPP presenta en agua un valor de Φ_{Δ} relativamente más bajo que la porfirina TCPP libre ($\Phi_{\Delta} = 0,53^{168}$). Este es un valor esperado debido a una agregación parcial de TCPP unida a las NP. Sin embargo, la actividad fotodinámica de TCPP inmovilizada es suficientemente alta para inducir daños en sistemas biológicos.

IV.1.3.2. Fotooxidación de Trp

El Trp es uno de los compuestos de interés biológico que se utiliza para analizar la eficiencia que tiene el PS para descomponerlo. Esta reacción puede ocurrir por un mecanismo Tipo I o Tipo II, como se muestra en el Esquema 18 ¹⁶⁹.

El efecto fotodinámico se analizó monitoreando la descomposición de Trp a través de la disminución en su emisión de fluorescencia a 347 nm en H₂O, utilizando la misma concentración de MNPNH-TCPP usada en la fotooxidación de ABMM, irradiando a $\lambda = 455\text{-}800\text{ nm}$, en intervalos de 5 min.

La fotodescomposición (Figura 10 a) siguió una cinética de pseudo primer orden con respecto a la concentración de Trp. En la Figura 10 b se observan las gráficas semilogarítmicas que describen el progreso de la reacción. A partir del ajuste lineal de estos gráficos, se calcularon los valores de $k_{\text{obs}}^{\text{Trp}}$ para la fotodescomposición de Trp sensibilizada por MNPNH-TCPP y la porfirina usada como referencia, TPPS₄⁴⁻ (Tabla 3).

Debido a que la fotooxidación de ABMM y Trp sensibilizada por MNPNH-TCPP se estudió en el mismo solvente (agua) y se utilizó la misma fuente de irradiación ($\lambda = 455-800$ nm), se pueden comparar directamente las magnitudes de k_{obs}^{ABMM} y k_{obs}^{Trp} . Se observa que k_{obs}^{ABMM} es aproximadamente el doble del valor de k_{obs}^{Trp} . Como se describió anteriormente, ABMM reacciona químicamente de manera específica con $O_2(^1\Delta_g)$. Por lo tanto, la descomposición de Trp se debe al ataque del $O_2(^1\Delta_g)$, por un mecanismo de reacción del Tipo II.

Utilizando ambos valores de k_{obs} se pudo determinar el valor de la constante de velocidad de reacción para Trp. A partir de las ecuaciones ecuación 3 y ecuación 8, se puede escribir la ecuación 11.

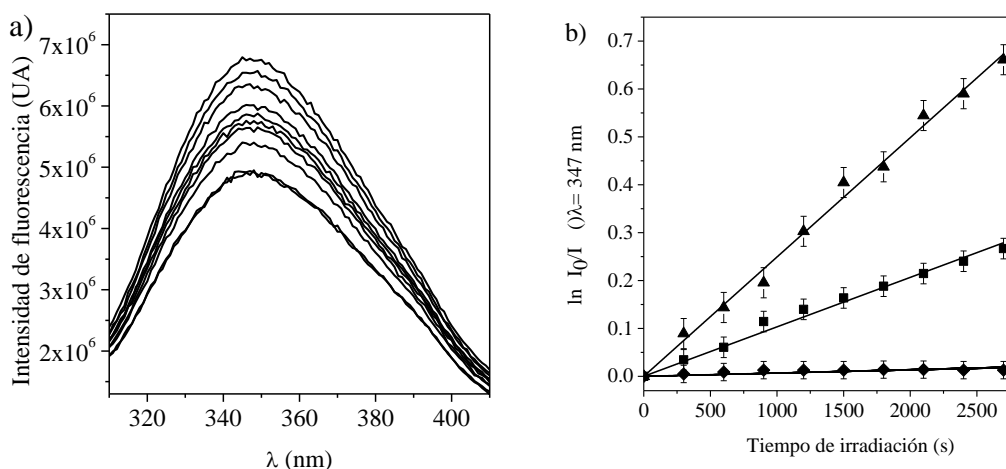


Figura 18. Fotodescomposición de Trp ($\sim 20 \mu M$), en H_2O . a) Cambios en espectro de emisión de Trp sensibilizado por MNPNH-TCPP ($I_{exc}=290$ nm). b) Gráficos de primer orden por MNPNH-TCPP (■), MNPNH₂ (◆) y TPPS₄⁴⁻ (▲). $\lambda_{irr}=455-800$ nm, $\Delta t_{irr}=5$ min.

$$\frac{k_{obs}^{Trp}}{k_{obs}^{ABMM}} = \frac{k_r^{ABMM}}{k_r^{Trp}} \frac{[O_2(^1\Delta_g)]}{[O_2(^1\Delta_g)]} \quad (11)$$

Simplificando y despejando k_r^{Trp} se obtiene,

$$k_r^{Trp} = \frac{k_{obs}^{Trp} k_r^{ABMM}}{k_{obs}^{ABMM}} \quad (12)$$

Suponiendo que ABMM tiene un valor de $k_r^{ABMM} = 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, similar al obtenido para 9,10-antraceno dipropionato (ADPA) en agua (pH=6,8), puede calcularse $k_r^{Trp} = (4,3 \pm 0,2) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Este valor es similar al encontrado para la fotooxidación de Trp inducida por $O_2(^1\Delta_g)$ en

agua a pH=7 ($6,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).⁷⁰ Por lo tanto, la descomposición del aminoácido, inducida por MNPNH-TCPP, es principalmente producida por un fotoproceso Tipo II.

Tabla 3. Parámetros cinéticos para la descomposición de sustratos ($k_{\text{obs}}^{\text{ABMM}}$ y $k_{\text{obs}}^{\text{Trp}}$) y rendimientos cuánticos de producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (Φ_Δ) en agua.

PS	$k_{\text{obs}}^{\text{ABMM}}$ (s^{-1})	Φ_Δ	$k_{\text{obs}}^{\text{Trp}}$ (s^{-1})	$k_{\text{obs}}^{\text{Trp}}/$ $k_{\text{obs}}^{\text{ABMM}}$	k_r^{Trp} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
TPPS ₄ ⁴⁻ (Ref)	(6,02±0,08)×10 ⁻⁴	0,71 ^a	(2,49±0,05)×10 ⁻⁴	0,42	(4,2±0,3)×10 ⁷
MNPNH-TCPP	(2,36±0,05)×10 ⁻⁴	0,28±0,03	(1,03±0,03)×10 ⁻⁴	0,44	(4,4±0,3)×10 ⁷

^a Ref. ¹⁵⁶

IV.1.4. PDI de microorganismos

Para el estudio de PDI se seleccionaron una levadura, *C. albicans*, una bacteria Gram negativa, *E. coli* y una Gram positiva, *S. aureus*, abarcando un amplio espectro de microorganismos patógenos que pueden estar presentes en aguas de consumo y aguas residuales, las cuales podrían ser tratadas con sensibilizadores inmovilizados, unidos químicamente a nanopartículas magnéticas, para su posterior recuperación del medio.

Estas suspensiones celulares se trataron con las MNPNH-TCPP, las cuales presentaron actividad fotodinámica frente a ABMM y Trp, descrito en la sección anterior. Las nanopartículas magnéticas MNP y MNPNH₂ se utilizaron para analizar la toxicidad luego de ser incubadas con las correspondientes suspensiones celulares.

V.1.4.1. PDI de microorganismos en suspensiones celulares en PBS

IV.1.4.1.1. PDI de *C. albicans*

Suspensiones de *C. albicans* en PBS se trataron con la misma cantidad en mg de MNPNH-TCPP, MNP y MNPNH₂, por 30 min a 37°C en oscuridad (MNPNH-TCPP :0,5 mg, 1,5 mg y 2,5 mg –equivalente a 1,0 μM, 2,0 μM y 5,0 μM de TCPP inmovilizada). Luego se las expuso a la luz visible, durante 5, 15 y 30 min. Además, se analizó la acción fotodinámica de diferentes concentraciones de MNPNH-TCPP. Los experimentos de control ponen de manifiesto que la viabilidad celular no se vio afectada por la iluminación de las suspensiones celulares en ausencia del conjugado MNPNH-TCPP, ni por incubación del mismo en la oscuridad durante 30 min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por lo tanto, la disminución de la viabilidad observada después de la irradiación de los cultivos tratados, se debe a la inactivación fotodinámica por la TCPP immobilizada en las NP. En algunos casos, se observa una leve inactivación celular por parte de MNP y MNPNH_2 , en tiempos elevados de irradiación. Esto puede deberse a un posible calentamiento de las nanopartículas magnéticas, ocasionado por la irradiación en longitudes de onda próximas al IR cercano (~ 800 nm), efecto que se conoce como “fototérmico”¹⁷⁰.

Por otro lado, la fotoinactivación de *C. albicans* depende de la concentración de la porfirina immobilizada sobre las NP y de los tiempos de exposición a la luz visible. La Figura 19 a) muestra que la disminución de la viabilidad celular de *C. albicans* aumenta cuando sus cultivos son incubados con concentraciones mayores de MNPNH-TCPP . El mismo efecto se observa cuando son irradiadas por tiempos más prolongados (Figura 19. b).

Las células de *C. albicans* tratadas con 5,0 mg de MNPNH-TCPP y expuestas a la luz visible durante 30 min, reducen su viabilidad celular un 99,999 %. La fotoinactivación se mantuvo elevada aún utilizando 2,5 mg (99,99 %). Sin embargo, disminuye considerablemente cuando las células fueron tratadas con 1,0 mg (99 %). La acción fotodinámica de MNPNH-TCPP también es notablemente mayor cuando se irradia la suspensión celular incubada con 2,5 mg durante 30 min (mayor al 99,9997 %), respecto a cuando los tiempos son 15 y 5 min.

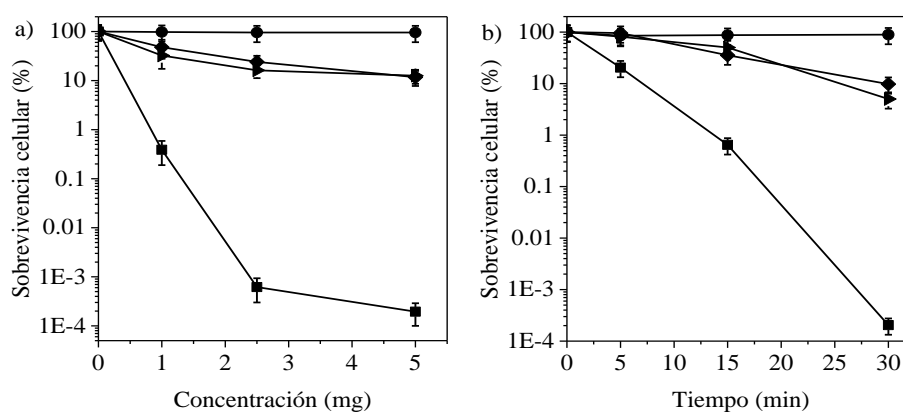


Figura 19. Inactivación fotodinámica de *C. albicans* tratadas con a) diferentes concentraciones de MNPNH-TCPP (■), MNPNH_2 (◆) y MNP (▶) (1,0 mg, 2,5 mg y 5,0 mg) e irradiadas con luz visible durante 30 min y b) 2,5 mg de MNPNH-TCPP (5 μM) (■), MNPNH_2 (◆) y MNP (▶) y expuestas a irradiación con luz visible por diferentes tiempos (5, 15 y 30 min). Las células se incubaron con dichas concentraciones durante 30 min a 37 °C en la oscuridad. Células sin fotosensibilizador irradiadas (●).

IV.1.4.1.2. PDI de *E. coli*

Suspensiones celulares de la bacteria Gram negativa *E. coli* se trataron con el conjugado MNPNH-TCPP de la misma manera que se procedió para la levadura *C. albicans*.

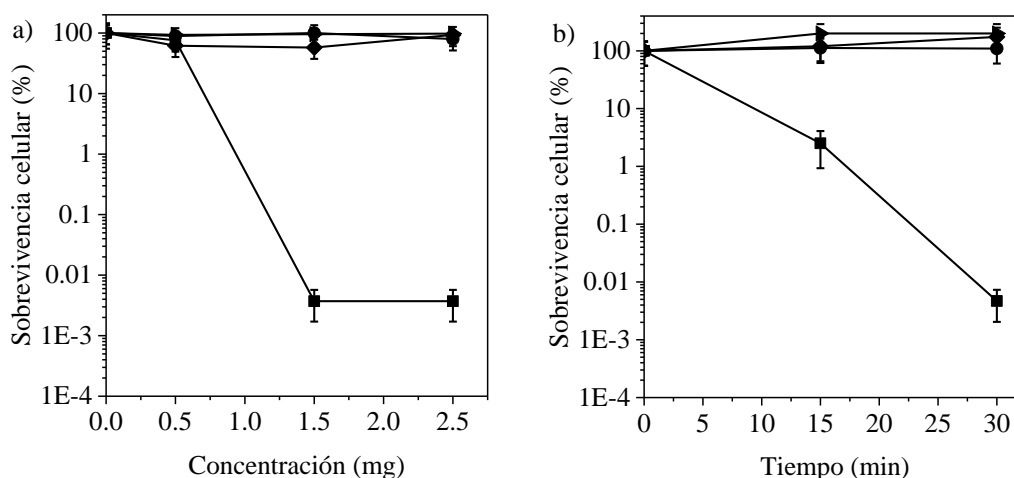


Figura 20. Inactivación fotodinámica de *E. coli* tratadas con a) diferentes concentraciones de MNPNH-TCPP (■), MNPNH₂ (◆) y MNP (▶) (0,5 mg, 1,5 mg y 2,5 mg) e irradiadas con luz visible durante 30 min y b) 2,5 mg de MNPNH-TCPP (5 μM) (■), MNPNH₂ (◆) y MNP (▶) y expuestas a irradiación con luz visible por diferentes tiempos (5, 15 y 30 min). Las células se incubaron con dichas concentraciones durante 30 min a 37 °C en la oscuridad. Células sin fotosensibilizador irradiadas (●).

MNPNH-TCPP no mostró toxicidad en la oscuridad, aún con la cantidad más alta utilizada (2,5 mg). Por otro lado, MNP y MNPNH₂ no mostraron efecto fototérmico. La Figura 20 a) muestra que una concentración de 1,5 mg de MNPNH-TCPP produjo una reducción de la viabilidad de células de *E. coli* del 99,999%, luego de 30 min de irradiación.

Después de 15 min de irradiación con luz visible, el medio celular tratado con MNPNH-TCPP presentó una disminución del 99% en la viabilidad celular, mientras que tras 30 min de irradiación la disminución fue del 99,999% (Figura 20. b)

IV.1.4.1.3. PDI de *S. aureus*

Suspensiones de la bacteria Gram positiva *S. aureus* en PBS se incubaron con MNPNH-TCPP (0,5 mg, 1,5 mg y 2,5 mg –equivalente a 1,0 μM, 2,0 μM y 5,0 μM de TCPP inmovilizada) durante 15 min en la oscuridad a 37 °C. Luego los cultivos se expusieron a la luz visible durante

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

15 min. Por otro lado, suspensiones incubadas con 2,5 mg de MNPNH-TCPP, se expusieron a la luz visible durante 5 y 15 min. Los experimentos control indicaron que la viabilidad celular no se vio afectada por la iluminación de las suspensiones celulares en ausencia del fotosensibilizador ni por la incubación del mismo durante 15 min.

La Figura 21 a) muestra que la suspensión bacteriana que se trató con 2,5 mg de MNPNH-TCPP y se irradió durante 15 min, disminuyó la viabilidad celular 99,999%, mientras que el cambio fue menor, 98% y 97 %, cuando el tratamiento fue con 1,5 mg y 0,5 mg, respectivamente. En la Figura 21 b) se observa que la suspensión celular tratada con 2,5 mg y expuesta a la luz visible durante 15 min, disminuyó 99,9% la viabilidad, mientras que lo hizo en un 98% cuando el tiempo de exposición fue de 5 min.

MNPNH-TCPP en una cantidad de 2,5 mg en las suspensiones celulares (2 ml), se utilizó en la PDI de los tres microorganismos en estudio. Puede observarse que a un tiempo de irradiación de 30 min, la eficiencia del conjugado en la PDI de *C. albicans* con respecto con la de *E. coli*, es similar. Mientras que en *S. aureus*, MNPNH-TCPP es igual de eficiente en PDI pero a la mitad de ese tiempo de irradiación (15 min).

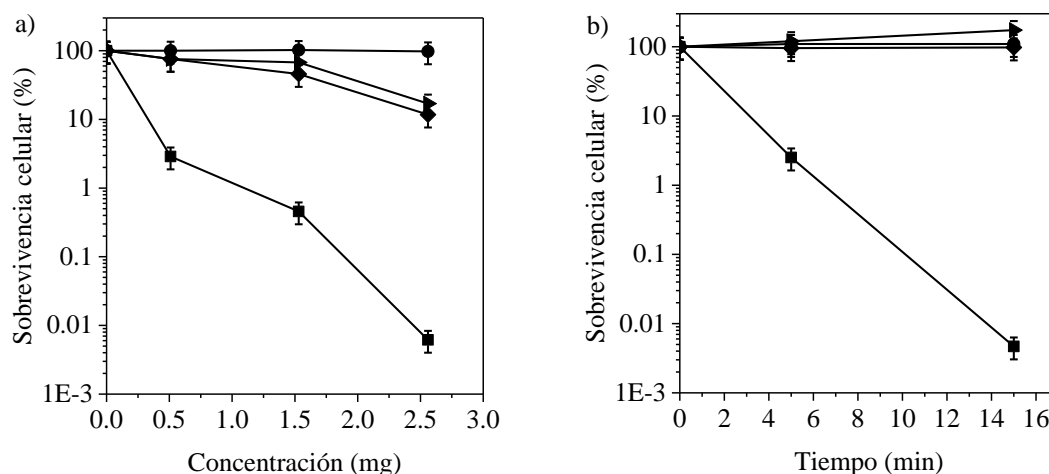


Figura 21. Inactivación fotodinámica de *S. aureus* tratadas con a) diferentes concentraciones de MNPNH-TCPP (■), MNPNH₂ (◆) y MNP (▶) (0,5 mg, 1,5 mg y 2,5 mg) e irradiadas con luz visible durante 30 min y b) 2,5 mg de MNPNH-TCPP (5 μ M) (■), MNPNH₂ (◆) y MNP (▶) y expuestas a irradiación con luz visible por diferentes tiempos (5, 15 y 30 min). Las células se incubaron con dichas concentraciones durante 30 min a 37 °C en la oscuridad. Células sin fotosensibilizador irradiadas (●).

IV.1.4.2. PDI de microorganismos en condiciones de crecimiento

Los cultivos de *C. albicans* y *E. coli* se trataron con MNPNH-TCPP (10 mg, 15 μ M de TCPP inmovilizada) y se incubaron en la oscuridad a 37 °C con agitación constante (100 rpm). A intervalos de 30 min de irradiación se determinó la absorbancia a $\lambda= 660$ nm. Los experimentos control se realizaron en presencia de MNPNH-TCPP en la oscuridad y sin MNPNH-TCPP con irradiación de los cultivos. Realizando un gráfico de absorbancia vs. tiempo irradiado, se obtienen las curvas de crecimiento típicas ¹⁷¹ de la levadura y bacterias correspondientes. En dichas curvas se pueden distinguir claramente tres fases: una fase de latencia (lag), una fase de crecimiento exponencial (log) y una fase estacionaria.

Durante la fase de latencia, tanto *C. albicans* como *E. coli*, se adaptan a las condiciones de crecimiento del medio. Esta fase corresponde al período en el que los microorganismos maduran y aún no se dividen, produciéndose en ella la síntesis de ácido ribonucleico (ARN), enzimas, entre otros metabolitos necesarios para la supervivencia. En la cepa de *C. albicans* (PC31) la fase de latencia se extiende hasta 2 h, mientras que en la cepa de *E. coli* (EC7) llega hasta 1 h (Figura 22 a y b).

La fase de crecimiento exponencial, período caracterizado por la duplicación celular ¹⁷², es un proceso de elevada actividad metabólica que conlleva a un aumento de la masa del microorganismo, de forma exponencial. Durante esta fase las cepas resultan mucho más sensibles a condiciones adversas que pueden presentarse, especialmente a la presencia de antibióticos ¹⁷³, por ejemplo. En *C. albicans* la fase de crecimiento exponencial tiene una duración de 7-8 h aproximadamente, comenzando inmediatamente luego de la fase de latencia. Mientras que en la cepa EC7 la fase de crecimiento exponencial tiene una duración de 3-4 h aproximadamente.

Durante la fase estacionaria, la tasa de crecimiento del microorganismo disminuye, como consecuencia del agotamiento de nutrientes y acumulación de productos tóxicos. Dicha fase se caracteriza por un valor constante de la población de bacterias, debido a que la tasa de crecimiento se iguala con la de muerte microbiana ¹⁷⁴. Para la cepa de *C. albicans*, la fase estacionaria comienza aproximadamente unas 10-11 h después de iniciada la curva. Mientras que, para la cepa *E. coli*, la fase comienza 4-5 h después de iniciada la curva.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las curvas de crecimiento normales de ambos microorganismos no se vieron prácticamente afectadas en los cultivos tratados con MNPNH-TCPP y mantenidas en la oscuridad, lo que demuestra que MNPNH-TCPP no produce efectos citotóxicos que afecten el crecimiento microbiano, cuando no está expuesto a luz visible.

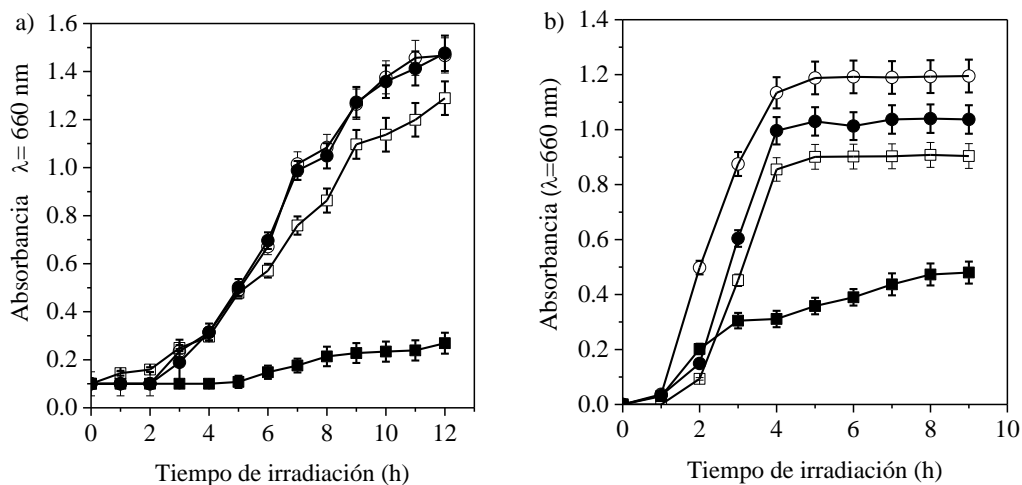


Figura 22. Curva de crecimiento de a) *C. albicans* y b) *E. coli*. Control oscuridad (○), control iluminación (●), MNPNH-TCPP en oscuridad (□) (10,0 mg, 15 μ M) y MNPNH-TCPP iluminado (■) (10,0 mg, 15 μ M). Absorbancia ($\lambda=660$ nm) determinada en intervalos de 30 min.

Por otro lado, se observa que el crecimiento de *C. albicans* y *E. coli* se detuvo cuando se irradiaron los cultivos en presencia de MNPNH-TCPP. Esto demuestra que la actividad fotodinámica inducida por dicho conjugado permite controlar el crecimiento de estos microorganismos y confirma que la fotosensibilización es aún posible cuando las células están bajo condiciones nutritivas o sin los efectos nocivos potenciales del PBS usado en los lavados y diluciones¹⁷⁵. Además, el frenado en el crecimiento es mayor para *C. albicans* que para *E. coli*. Este efecto está principalmente influenciado por la velocidad de crecimiento. Aun cuando la levadura es una célula eucariota de mayor tamaño y estructura más compleja que la bacteria, al crecer más lento permite que la acción fotodinámica predomine sobre el crecimiento produciendo una inactivación más efectiva¹⁵³. Así los resultados obtenidos con MNPNH-TCPP son similares a los determinados en trabajos anteriores usando porfirinas catiónicas en solución en cultivos de bacterias o levadura^{153, 175}.

La curva de crecimiento de *S. aureus* no se muestra junto con la de *C. albicans* y *E. coli*, debido a que no pudo obtenerse. Esta bacteria Gram positiva se ve afectada tras la irradiación sin fotosensibilizador, debido a la generación de porfirina endógena. Un comportamiento similar se encontró previamente en ocho cepas de *S. aureus* de origen clínico y en la referencia *S. aureus* Newman (ATCC 25904) ¹⁶².

IV.1.4.3. Estudio de reutilización del conjugado MNPNH-TCPP en PDI

Debido a las propiedades magnéticas de las NP de Fe₃O₄, junto con la capacidad de formar diferentes conjugados con PS, mediante uniones químicas, aportando una manipulación sencilla y rendimiento eficaz en inactivación fotodinámica, se estudió la posibilidad de reutilización del conjugado MNPNH-TCPP. Dicho estudio, se llevó a cabo en los microorganismos que se vinieron mencionando.

Suspensiones celulares de los microorganismos en PBS se incubaron con MNPNH-TCPP (1,5 mg, 4,5 μM de TCPP inmovilizada) durante 30 min en la oscuridad, a 37 °C. Posteriormente se expusieron a la luz visible por 30 min en el caso de *C. albicans* y *E. coli*, y 15 min en *S. aureus*. Luego, por decantación magnética, se recuperó el conjugado. El líquido sobrenadante se diluyó en forma seriada en PBS y se sembró en placas con el medio correspondiente para cada cepa. Las NP recuperadas se resuspendieron en PBS y se realizó el mismo procedimiento anterior.

La Figura 15 muestra los resultados de la PDI de *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus*. Las experiencias 1 y 2 corresponden a controles de irradiación y en oscuridad con MNPNH-TCPP, respectivamente. La experiencia 3 muestra el resultado de la primera inactivación (primera utilización de MNPNH-TCPP), y las experiencias 4 y 5 muestran los resultados de PDI de las reutilizaciones de MNPNH-TCPP. En dicha Figura los experimentos control ponen de manifiesto que la viabilidad celular no se vio afectada por la iluminación de las suspensiones celulares en ausencia de MNPNH-TCPP, ni por la incubación en la oscuridad del conjugado durante 30 min. La experiencia 3 muestra una efectiva disminución en la viabilidad celular de los tres microorganismos tratados con MNPNH-TCPP e irradiados a 30 min. Las experiencias 4 y 5 muestran un bajo porcentaje de inactivación celular en *C. albicans*, prácticamente nulo en *E. coli*, mientras que en *S. aureus* la viabilidad celular disminuye de igual manera que la primera inactivación.

Estos resultados, principalmente los de *C. albicans* y *E. coli* demuestran que el conjugado MNPNH-TCPP no puede reutilizarse para PDI de dichos microorganismos, bajo las mismas condiciones con las que se inactivaron la primera vez. Esto puede deberse a la inestabilidad de la nanopartícula magnética, generando un desprendimiento de la porfirina, quedando del conjugado sólo MNPNH₂ o simplemente el núcleo magnético MNP.

La Figura 23 muestra los espectros de absorción del conjugado MNPNH-TCPP antes de ser utilizado en la PDI, y luego de ser recuperado para una nueva inactivación. Se observa claramente la ausencia de las bandas *Soret* y *Q* correspondientes a la porfirina del conjugado, posterior a la primera recuperación. El espectro de absorción es muy similar al de la nanopartícula previo a la reacción con TCPP. Se obtuvo el mismo espectro luego de la primera inactivación de los tres microorganismos. El resultado observado en la Figura 23 c) puede deberse al efecto producido por algo de la porfirina TCPP que queda en el recipiente utilizado para la PDI de la suspensión celular. La bacteria Gram positiva, *S. aureus*, es más susceptible y permeable que *E. coli* y *C. albicans* a las ROS generada por el PS.

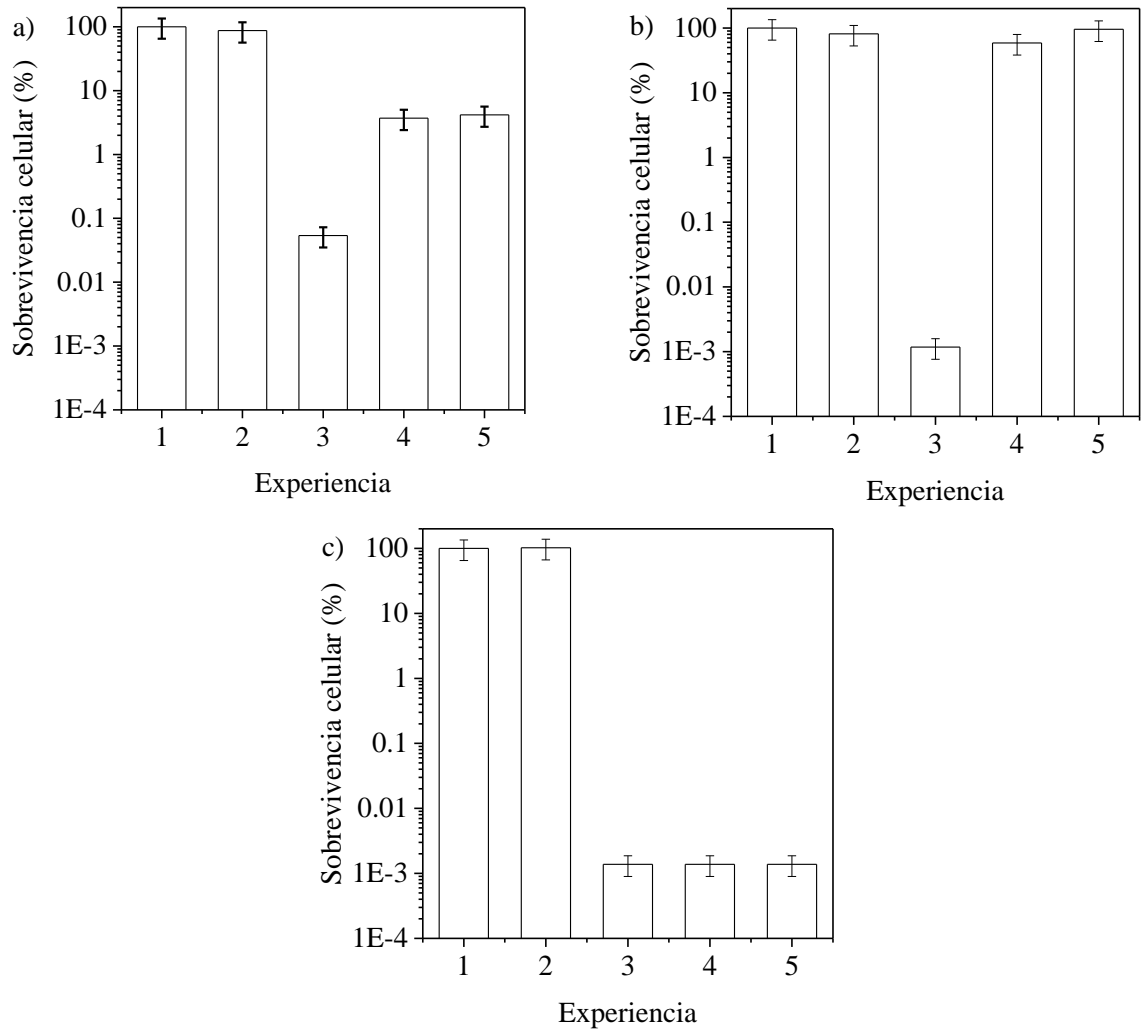


Figura 23. Estudios de reutilización de MNPNH-TCPP en a) *C. albicans*, b) *E. coli* y c) *S. aureus* (200 μ l, $\sim 10^6$ UFC/ml) incubadas con 1,5 mg (4,5 μ M) de MNPNH-TCPP durante 30 min, a 37 °C en la oscuridad, con posterior exposición a la luz visible (30 min en a y b, 15 min en c). Experiencias: (1) células sin MNPNH-TCPP y mantenidas en la oscuridad; (2) células con MNPNH-TCPP en la oscuridad; (3) células con MNPNH-TCPP expuestas a la luz visible; (4) nuevas células tratadas con MNPNH-TCPP recuperado de la experiencia 3 (reutilización 1); (5) nuevas células tratadas con MNPNH-TCPP recuperado de la experiencia 4 (reutilización 2).

Por otro lado, al recuperar las NP por decantación magnética, el sobrenadante quedó con una coloración rojiza, característica de la porfirina. El espectro del conjugado, luego de la reutilización en PDI es igual al de $MNPNH_2$, lo que confirma el desprendimiento de la TCPP luego del proceso de fotoinactivación (Figura 24).

Para obtener un conjugado nanopartícula magnética-porfirina que pueda ser reutilizable en la PDI de microorganismos, es necesario estabilizar el núcleo magnético, con el fin de evitar la disgregación del óxido y conservar la porfirina inmovilizada covalentemente sobre las NP. Es por este motivo que se procedió a estabilizar las NP con una capa de sílica.

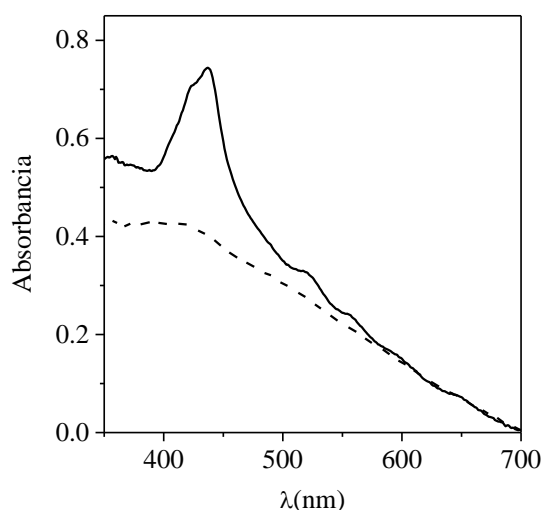
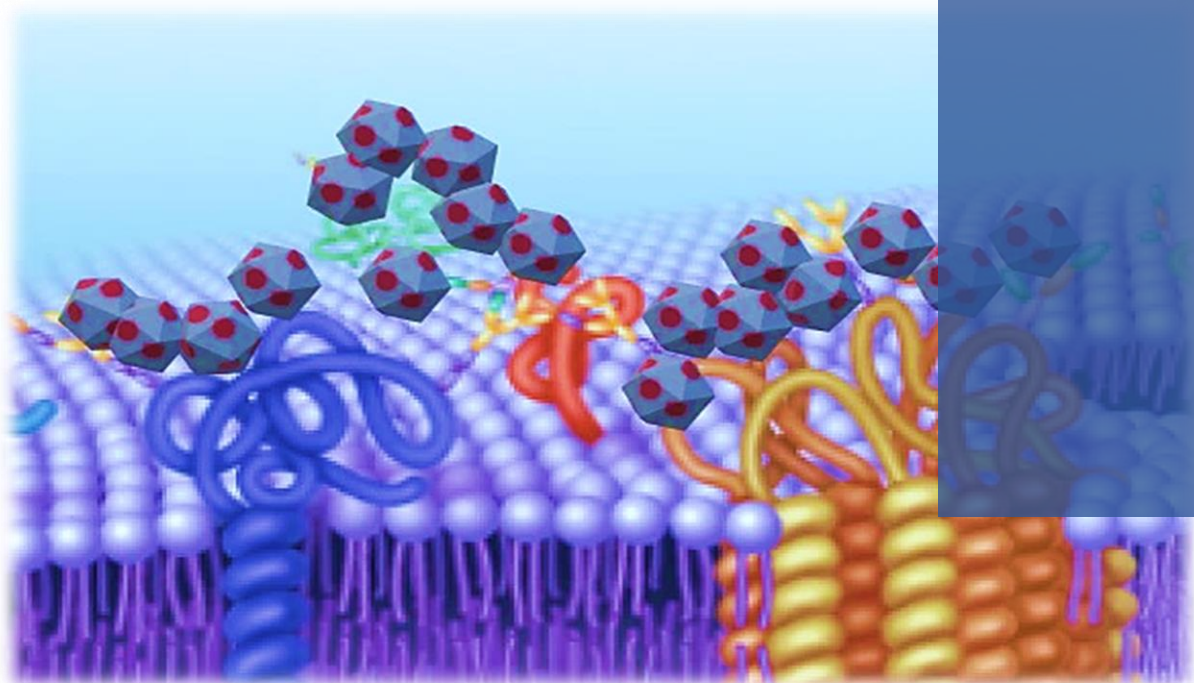


Figura 24. Espectros de absorción de $MNPNH_2$ -TCPP antes de inactivar fotodinámicamente los microorganismos (línea continua) y luego de la PDI (línea punteada).

IV.2. Nanopartículas magnéticas recubiertas con sílica.



Este subcapítulo muestra la síntesis del núcleo magnético Fe_3O_4 recubierto con una capa de sílica, la funcionalización del mismo con grupos propilamino y la conjugación con la misma porfirina tetraácida utilizada anteriormente. Se muestran, además, estudios de actividad e inactivación fotodinámica.

IV.2.1. Síntesis de nanopartículas magnéticas

IV.2.1.1. Síntesis de MNP recubiertas con sílica (MNPSI)

Las MNP se sintetizaron nuevamente mediante el método descrito en *IV.1.1.1*. Las MNP formadas se lavaron con agua pura por decantación magnética, luego se centrifugaron, se descartó el *pellet* y se conservaron las nanopartículas más pequeñas (las que quedan en suspensión). A continuación, las MNP se trataron con $Na_2SiO_3 \cdot 5H_2O$ (*III.4.2.*) para recubrir las mismas con una capa de sílice (MNPSI) (Esquema 8). Dichas NP recubiertas presentan menor magnetización frente a un imán de neodimio. Sin embargo, siguen siendo adecuadas para los lavados y manipulación de las mismas mediante decantación magnética.

IV.2.1.2. Recubrimiento de MNPSI con grupos amino terminales

Las MNPSI sintetizadas se resuspendieron en una mezcla acetona: tolueno (4:1) y se hicieron reaccionar con APTS, para formar las MNPSINH₂.

IV.2.1.3. Síntesis del conjugado nanopartícula magnética-porfirina tetra-ácida (MNPSINH-TCPP)

La síntesis del conjugado MNPSINH-TCPP se llevó a cabo mediante la reacción entre MNPSINH₂ resuspendidas en agua y una solución de porfirina TCPP activada con EDC y NHS, de la misma manera descrita en *III.5* ¹⁴⁶. El conjugado MNPSINH-TCPP (Esquema 8) se lavó por decantación magnética con agua y etanol. Se observó una coloración rojiza en los lavados, correspondiente a la porfirina en exceso.

IV.2.2. Caracterización de las nanopartículas magnéticas

IV.2.2.1. Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

La Figura 25 muestra las fotografías de TEM de MNPSINH₂ y el conjugado MNPSINH-TCPP. En dichas imágenes se observa polidispersidad en el tamaño de las NP. Sin embargo,

muestran que las NP son chicas. En las fotografías puede verse también, la formación de agregados entre las MNPSiNH₂ y MNPSiNH-TCPP.

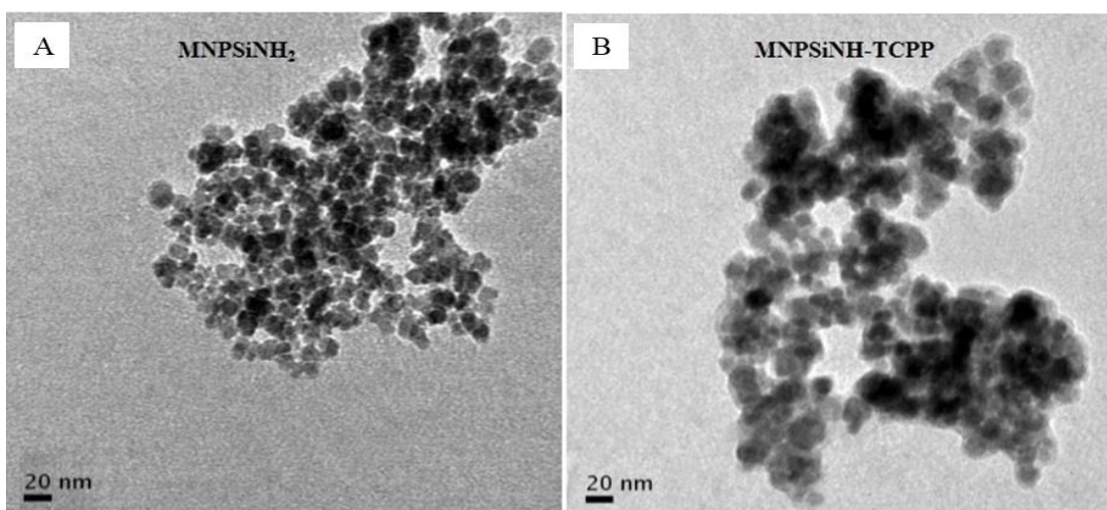


Figura 25. Imágenes típicas de TEM de (A) MNPSiNH₂ y (B) MNPSiNH-TCPP

IV.2.2.2. Espectroscopía UV-visible

La Figura 26 muestra los espectros de absorción del conjugado MNPSiH-TCPP, la dispersión (o *scattering*) generada por las MNPSiNH₂, la diferencia de estos espectros y la absorción de TCPP que quedó en solución sin reaccionar. Se puede observar una banda *Soret* a $\lambda_{\text{máx}}=432$ nm y cuatro bandas *Q* (en la región 500-650 nm). Nuevamente, como en MNPNH-TCPP, se observa un corrimiento batocrómico ($\lambda_{\text{máx}}=413$ nm a $\lambda_{\text{máx}}=432$ nm) junto con un ensanchamiento de la banda *Soret* de la TCPP, respecto a cuando este fotosensibilizador no está unido covalentemente a las nanopartículas magnéticas.

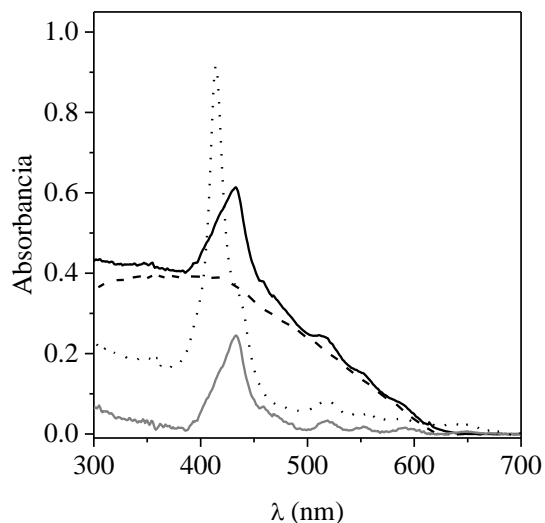


Figura 26. Espectros de absorción de MNPSINH-TCPP (línea continua), MNPNH₂ (línea discontinua), diferencia de absorción (MNPSINH-TCPP) – (MNPNH₂) (línea gris) y TCPP (línea discontinua punteada) en agua.

En la Tabla 4 pueden observarse las diferencias en los parámetros espectroscópicos correspondientes al conjugado MNPSINH-TCPP y a la porfirina TCPP libre. Al igual que MNPNH-TCPP, se considera el valor de ϵ de TCPP unida a MNPSINH₂, menor al de TCPP libre. Sin embargo, se supone un valor de $\epsilon \sim 3,0 \cdot 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ de TCPP inmovilizada, para poder realizar cálculos necesarios.

Tabla 4. Propiedades espectroscópicas UV-visible de MNPSINH-TCPP y TCPP libre, en agua.

PS	$\lambda_{\text{max}}^{\text{Soret}}$	$\epsilon \text{ (M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)}$
TCPP	413	$3,65 \times 10^5$
MNPSINH-TCPP	432	-

IV.2.3. Actividad fotodinámica

IV.2.3.1. Fotooxidación de los sustratos ABMM y Trp

La fotooxidación de los sustratos ABMM y Trp por parte del conjugado MNPSINH-TCPP, se estudió de la misma manera y en las mismas condiciones que fue estudiada con MNPNH-TCPP. En la Figura 27 se muestran las gráficas semilogarítmicas que describen el progreso de cada una de las reacciones. A partir del ajuste lineal de estos gráficos, se calcularon los valores

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de k_{obs}^{ABMM} y k_{obs}^{Trp} para la fotodescomposición de ABMM y Trp, respectivamente, sensibilizadas por MNPSINH-TCPP y la porfirina usada como referencia, TPPS₄⁴⁻ (Tabla 5).

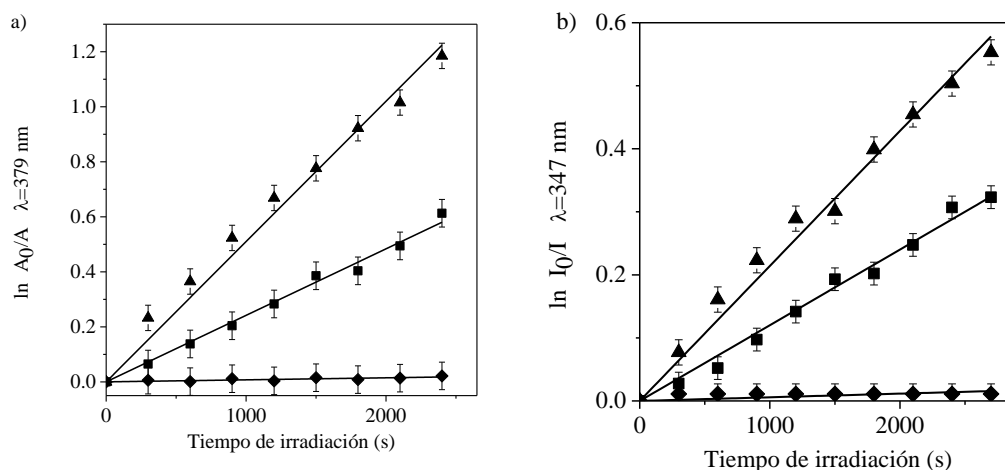


Figura 27. a) Fotooxidación de ABMM (35 μM) y b) Fotodescomposición de Trp (20 μM). Gráficos de primer orden para MNPNHSi (◆), MNPSINH-TCPP (■) y TPPS₄⁴⁻(ref) (▲), en H₂O, λ_{irr}= 455-800 nm, Δt_{irr}=5 min.

MNPSINH-TCPP presenta en agua un valor de Φ_{Δ} relativamente más bajo que la porfirina TCPP libre, de igual manera que en MNPNH-TCPP. Sin embargo, la actividad fotodinámica de MNPSINH-TCPP es suficientemente alta para inducir daños en sistemas biológicos.

Al comparar las magnitudes de k_{obs}^{ABMM} y k_{obs}^{Trp} se observa que k_{obs}^{ABMM} es aproximadamente el doble del valor de k_{obs}^{Trp} . Como se describió anteriormente, ABMM reacciona químicamente de manera específica con O₂(¹Δ_g). Por lo tanto, la descomposición de Trp se debe al ataque del O₂(¹Δ_g), por un mecanismo de reacción del Tipo II. Utilizando ambos valores de k_{obs} se pudo determinar el valor de la constante de velocidad de reacción para Trp, $k_r^{Trp} = (5,0 \pm 0,2) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, de la misma manera que en IV.1.3.2. Este valor es similar al encontrado para la fotooxidación de Trp inducida por O₂(¹Δ_g) en agua a pH=7 ($6,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)⁷⁰. Por lo tanto, la descomposición del aminoácido inducida por TCPP inmovilizada en el núcleo magnético estabilizado (MNPSINH₂), es principalmente producida por un fotoproceso Tipo II.

Tabla 5. Parámetros cinéticos para la descomposición de sustratos ($k_{\text{obs}}^{\text{ABMM}}$, $k_{\text{obs}}^{\text{Trp}}$) y rendimientos cuánticos de producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (Φ_{Δ}) en agua.

PS	$k_{\text{obs}}^{\text{ABMM}} (\text{s}^{-1})$	Φ_{Δ}	$k_{\text{obs}}^{\text{Trp}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{obs}}^{\text{Trp}}/k_{\text{obs}}^{\text{ABMM}}$	$k_r^{\text{Trp}} (\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$
TPPS ₄ ⁻ (Ref)	$(5,1\pm 0,3)\times 10^{-4}$	$0,71\pm 0,05$	$(2,1\pm 0,05)\times 10^{-4}$	0,42	$(4,2\pm 0,03)\times 10^7$
MNPSINH-TCPP	$(2,4\pm 0,2)\times 10^{-4}$	$0,33\pm 0,03$	$(1,2\pm 0,03)\times 10^{-4}$	0,50	$(5,0\pm 0,03)\times 10^7$

IV.2.4. PDI de microorganismos

Para el estudio de PDI se seleccionaron los mismos microorganismos estudiados con MNPNH-TCPP.

V.2.4.1. PDI de microorganismos en suspensiones celulares en PBS

IV.2.4.1.1. PDI de *C. albicans*

Suspensiones de *C. albicans* en PBS se trataron con la misma cantidad de mg de MNPSINH-TCPP, MNPSI y MNPSINH₂, por 30 min a 37°C en oscuridad. Luego se las expuso a la luz visible, durante 15 y 30 min. Los experimentos de control ponen de manifiesto que la viabilidad celular no se vio afectada por la iluminación de las suspensiones celulares en ausencia del conjugado MNPSINH-TCPP, ni por incubación del mismo en la oscuridad durante 30 min. Por lo tanto, la disminución de la viabilidad observada luego de la irradiación de los cultivos tratados, se debe a la inactivación fotodinámica por la TCPP inmovilizada sobre MNPSINH₂.

La Figura 28 a) muestra que las células de *C. albicans* disminuyen en viabilidad celular cuando sus cultivos son incubados con MNPSINH-TCPP e irradiadas por diferentes intervalos de tiempo. Se observa que las células tratadas e irradiadas durante 15 min, reducen su viabilidad en 98 %, mientras que a un tiempo de exposición más prolongado (30 min) produce una disminución de 99 %.

IV.2.4.1.2. PDI de *E. coli*

Suspensiones celulares de la bacteria Gram negativa *E. coli* se trataron con el conjugado MNPSINH-TCPP de la misma manera que se procedió para la levadura *C. albicans*.

MNPSINH-TCPP no fue tóxico en la oscuridad, ni MNPSINH₂ mostró efecto fototérmico. Después de 15 min de irradiación con luz visible, el medio celular tratado con el conjugado

presentó una baja efectividad en la inactivación de *E. coli*. Sin embargo, aumentando el tiempo de irradiación a 30 min la viabilidad celular disminuyó considerablemente (>99,9%) (Figura 28 b). Estos resultados muestran que *E. coli* y *C. albicans* son similarmente susceptibles a la PDI sensibilizada por MNPSINH-TCPP a una concentración de 2,5 mg (5 μ M de TCPP inmovilizada).

IV.2.4.1.3. PDI de *S. aureus*

Suspensiones de la bacteria Gram positiva *S. aureus* en PBS se incubaron con 2,5 mg de MNPNHSi-TCPP durante 15 min en la oscuridad a 37 °C. Luego los cultivos se expusieron a la luz visible durante 5 y 15 min. La viabilidad celular no se vio afectada por la iluminación de las suspensiones celulares en ausencia del fotosensibilizador ni por la incubación del mismo durante 15 min.

La Figura 28 c) muestra que la suspensión bacteriana que se trató con MNPSINH-TCPP y se irradió durante 5 min, disminuyó muy poco la viabilidad celular (98%), mientras que el cambio fue significativamente mayor, de ~99,99% cuando se expusieron a la luz visible por 15 min.

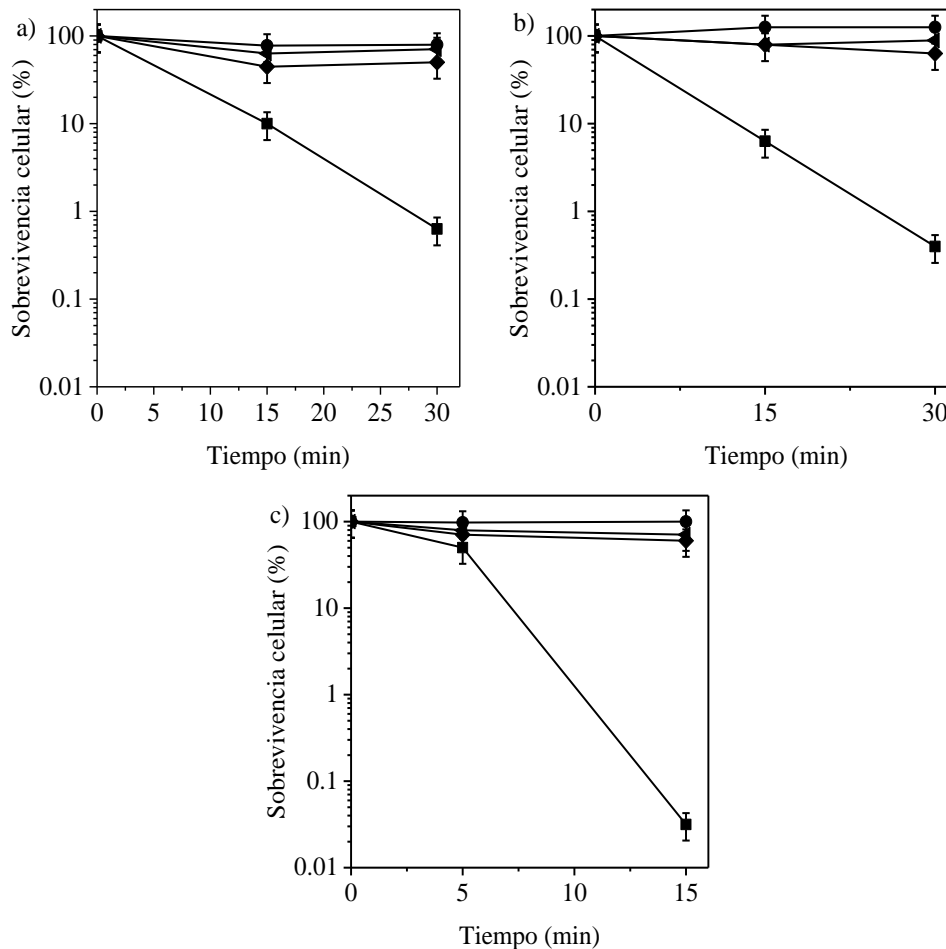


Figura 28. Inactivación fotodinámica de a) *C. albicans*, b) *E. coli* y c) *S. aureus*, tratadas con 2,5 mg de MNPSINH-TCPP (5 μ M) (■), MNPSINH₂ (◆) y MNPSI (◄), y expuestas a irradiación con luz visible por diferentes tiempos (15 y 30 min en a) y b); 5 y 15 en c)). Células sin fotosensibilizador irradiadas (●).

IV.1.4.3. Estudio de reutilización del conjugado MNPSINH-TCPP en PDI

Dicho estudio se llevó a cabo de la misma manera que con MNPNH-TCPP (IV.1.4.3) y utilizando la misma concentración de conjugado (1,5 mg, 4,5 μ M de TCPP inmovilizada).

La Figura 29 muestra los resultados de PDI de *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus* de las 5 experiencias. Puede observarse que la viabilidad celular no se vio afectada por la iluminación de las suspensiones celulares en ausencia de MNPSINH-TCPP, ni por la incubación en la oscuridad del conjugado durante 30 min. La experiencia 3 muestra una efectiva disminución en la viabilidad celular de los tres microorganismos tratados con MNPSINH-TCPP e irradiados a

30 min. Las experiencias 4 y 5 muestran que el porcentaje de inactivación celular es prácticamente igual al de la experiencia 3.

Por otro lado, se tomó un espectro de absorción UV-visible del conjugado reutilizado y se observaron las bandas correspondientes a TCPP en el conjugado.

Estos resultados indican que TCPP se mantiene unida a las NP luego de los lavados realizados mediante decantación magnética, en los que se desecha el medio tratado para agregar una nueva suspensión microbiana. Dicha unión permite la inactivación sucesiva de *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus*.

Por lo tanto, el recubrimiento del núcleo magnético con una capa de sílica, otorga estabilidad a la estructura nanopartícula magnética-porfirina, permitiendo que el PS se mantenga unido, luego de reutilizarse, al menos, dos veces en la PDI de los microorganismos *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus*.

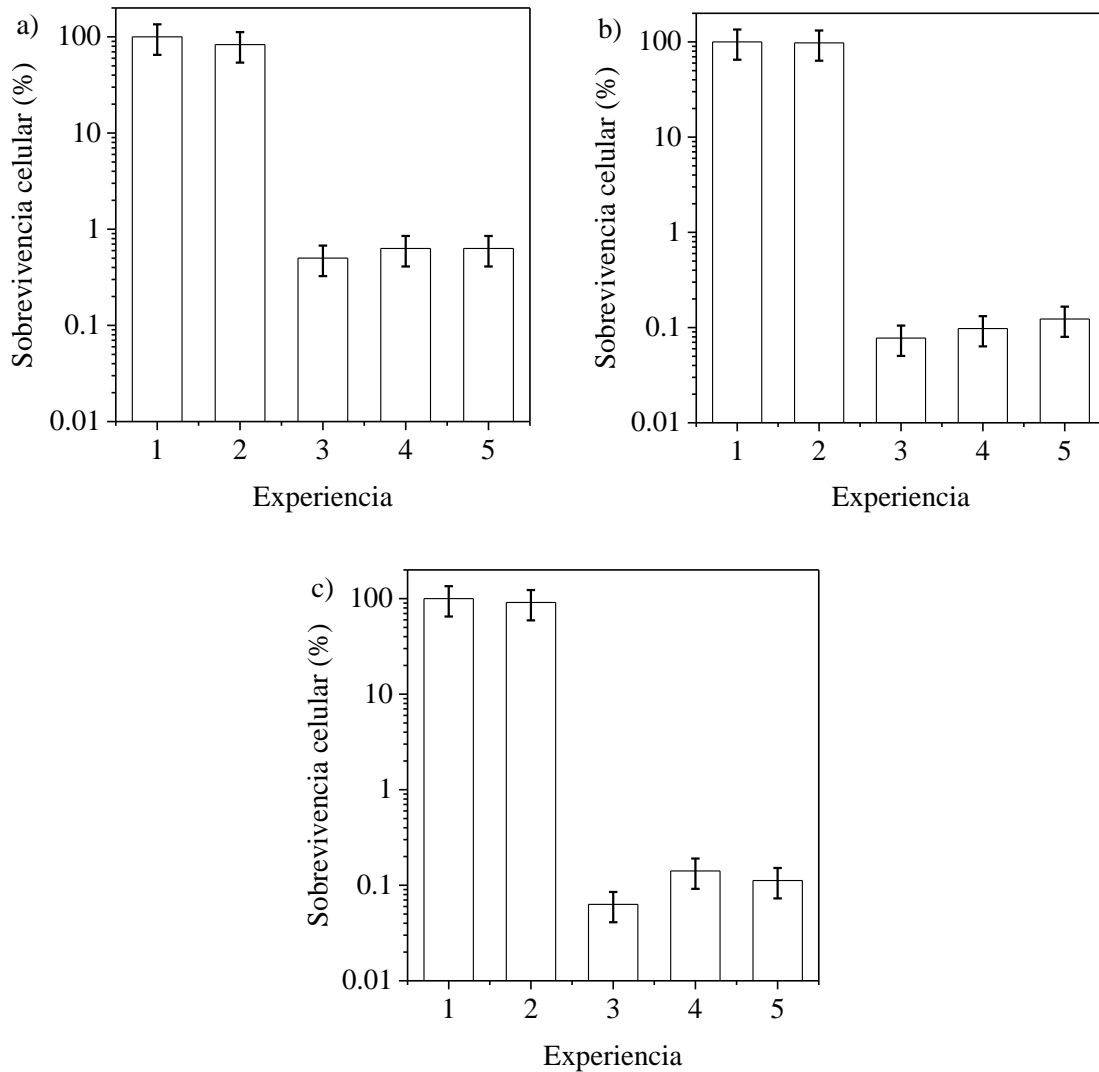
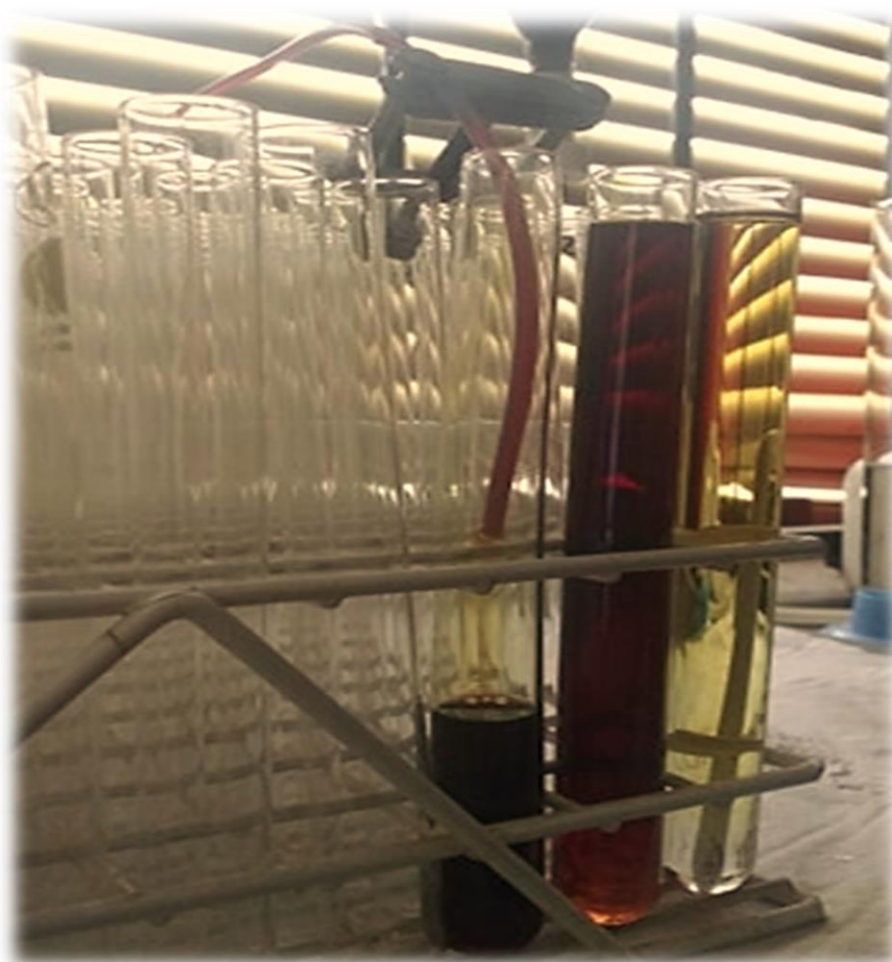


Figura 29. Estudios de reutilización de MNPSINH-TCPP en a) *C. albicans*, b) *E. coli* y c) *S. aureus* (200 μ l, $\sim 10^6$ UFC/ml) incubadas con 2,5 mg (4,5 μ M) de MNPSINH-TCPP durante 30 min, a 37 °C en la oscuridad, con posterior exposición a la luz visible (30 min en a y b, 15 min en c). Experiencias: (1) células sin MNPSINH-TCPP y mantenidas en la oscuridad; (2) células con MNPSINH-TCPP en la oscuridad; (3) células con MNPSINH-TCPP expuestas a la luz visible; (4) nuevas células tratadas con MNPSINH-TCPP recuperado de la experiencia 3 (reutilización 1); (5) nuevas células tratadas con MNPSINH-TCPP recuperado de la experiencia 4 (reutilización 2).

***IV.3. Porfirinas sustituidas con grupos
aminopropoxifenilo y pentafluorofenilo***



Como se explicó en la introducción, los fotosensibilizadores efectivos para la inactivación de bacterias Gram negativas y levaduras, tienen grupos catiónicos para facilitar la interacción con la envoltura celular. Con el fin de aumentar la efectividad de los agentes fotosensibilizadores, en este subcapítulo se muestra el diseño de nuevas porfirinas con grupos precursores de cargas positivas y grupos apolares unidos al mismo macrociclo tetrapirrólico. Además, pueden observarse las caracterizaciones espectroscópicas, así como los estudios de actividad e inactivación fotodinámica.

IV.3.1. Porfirinas que contienen grupos amino alifáticos básicos y perfluorofenilo

En general, se han utilizado como sustituyentes de las porfirinas, aminas, tales como anilina y piridina ^{80, 176}. Estos derivados aromáticos se comportan como bases débiles y las cargas positivas se forman mediante la alquilación exhaustiva para producir aminas cuaternarias ⁸⁹. Sin embargo, prácticamente no se encuentran estudios de fotoinactivación de levaduras utilizando PS sustituidos por aminas alifáticas. Estas aminas son más básicas, de manera tal que podrían protonarse en las condiciones de trabajo, generando cargas positivas intrínsecas ¹⁷⁷. Por otro lado, un grupo apolar, aportaría a la estructura del PS un mayor carácter anfifílico.

La síntesis de PS asimétricamente sustituidos en la periferia del macrociclo permite la combinación de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos en una molécula sensibilizadora, produciendo un eje de polaridad intramolecular ⁸³. Este efecto puede producir una mejor incorporación en los microorganismos, lo cual es un prerequisite para un tratamiento fotodinámico efectivo ⁸⁴. El grupo perfluorofenilo como sustituyente en el macrociclo tetrapirrólico aportaría hidrofobicidad a la molécula.

El mecanismo de acción de los compuestos con actividad terapéutica está influenciado por sus propiedades fisicoquímicas y por las interacciones específicas (puente de hidrógeno, transferencia de carga, interacciones electrón dador-aceptor) y no específicas (causadas por efectos de polaridad-polarizabilidad) en las que puedan participar con el entorno biológico. Además, el grupo perfluorofenilo puede utilizarse para unir el PS a las NP magnéticas y formar así un nuevo conjugado. Esto sería posible mediante la reacción de sustitución nucleofílica aromática entre el flúor y el grupo amino proveniente de MNPSINH₂.

IV.3.2. Síntesis

En general, la síntesis de dipirrometanos y porfirinas se realiza a partir de la condensación de aldehídos catalizada por ácidos. Sin embargo, cuando se emplean aldehídos sustituidos por grupos amino, se presenta la dificultad de que estos neutralizan al catalizador, frenando la reacción⁹¹⁻⁹². Una de las alternativas para solucionar este problema es la protección de grupos amino, formando derivados de amida⁹³. Sin embargo, esta metodología agregaría dos pasos más a la síntesis.

Las porfirinas con diferentes patrones de simetría en las posiciones *meso* pueden sintetizarse convenientemente a partir de una mezcla binaria de aldehídos y un dipirrometano apropiado catalizado por ácido¹⁷⁸. La aplicación de este enfoque a la síntesis de porfirinas requirió la formación previa de ADPM. Este compuesto se sintetizó mediante la condensación de 4-(3-*N,N*-dimetilaminopropoxi)benzaldehído con un gran exceso de pirrol (relación molar de aldehído / pirrol 1:47) y calentando a 85 °C durante 24 h.

La condensación de ADPM con 4-(3-*N,N*-dimetilaminopropoxi)benzaldehído y perfluorobenzaldehído (relación molar 1: 0,4 : 0,5 correspondientemente) permitió obtener la porfirina de interés (A₃B= F₅APP) y también la porfirina con simetría ABAB, F₁₀APP. La reacción se realizó en acetonitrilo, el cual ayuda a promover la reacción y a estabilizar los intermediarios formados⁹². Se llevó a cabo a temperatura ambiente y en presencia del catalizador TFA, en atmósfera de Ar, durante 3 h. Luego, el exceso de ácido se neutralizó con TEA. Dicha condensación produce porfirinógenos reducidos, los cuales se oxidaron con a las correspondientes porfirinas, con el agregado de DDQ. Ambas porfirinas, F₅APP y F₁₀APP, se purificaron por cromatografía *flash*. La F₁₀APP es la primera mancha menos polar de color púrpura eluída. Dicha porfirina se obtiene pura con este procedimiento, con un rendimiento del 8 %. La porfirina F₅APP se obtuvo como la segunda mancha color púrpura eluída en la columna cromatográfica descrita anteriormente, utilizando una mezcla de CH₂Cl₂/CH₃OH gradiente 10-15%/TEA 3%, como solvente de elusión. De esta manera se obtuvo F₅APP de forma pura, con un rendimiento del 10 %. La tercer porfirina eluida correspondió a TAPP, la cual fue sintetizada y estudiada previamente.¹⁴⁸

IV.3.3. Espectroscopía de absorción UV-visible y fluorescencia

En la Figura 30 se muestran los espectros de absorción, de emisión y excitación de las porfirinas F₅APP y F₁₀APP en DMF. El fotosensibilizador TAPP fue utilizado como porfirina de referencia. Los espectros de absorción presentan una banda *Soret* (~420 nm) de mayor intensidad y cuatro bandas *Q* de menor intensidad (515-650 nm), característicos de derivados de *meso*-tetrafenilporfirinas ¹⁷⁹.

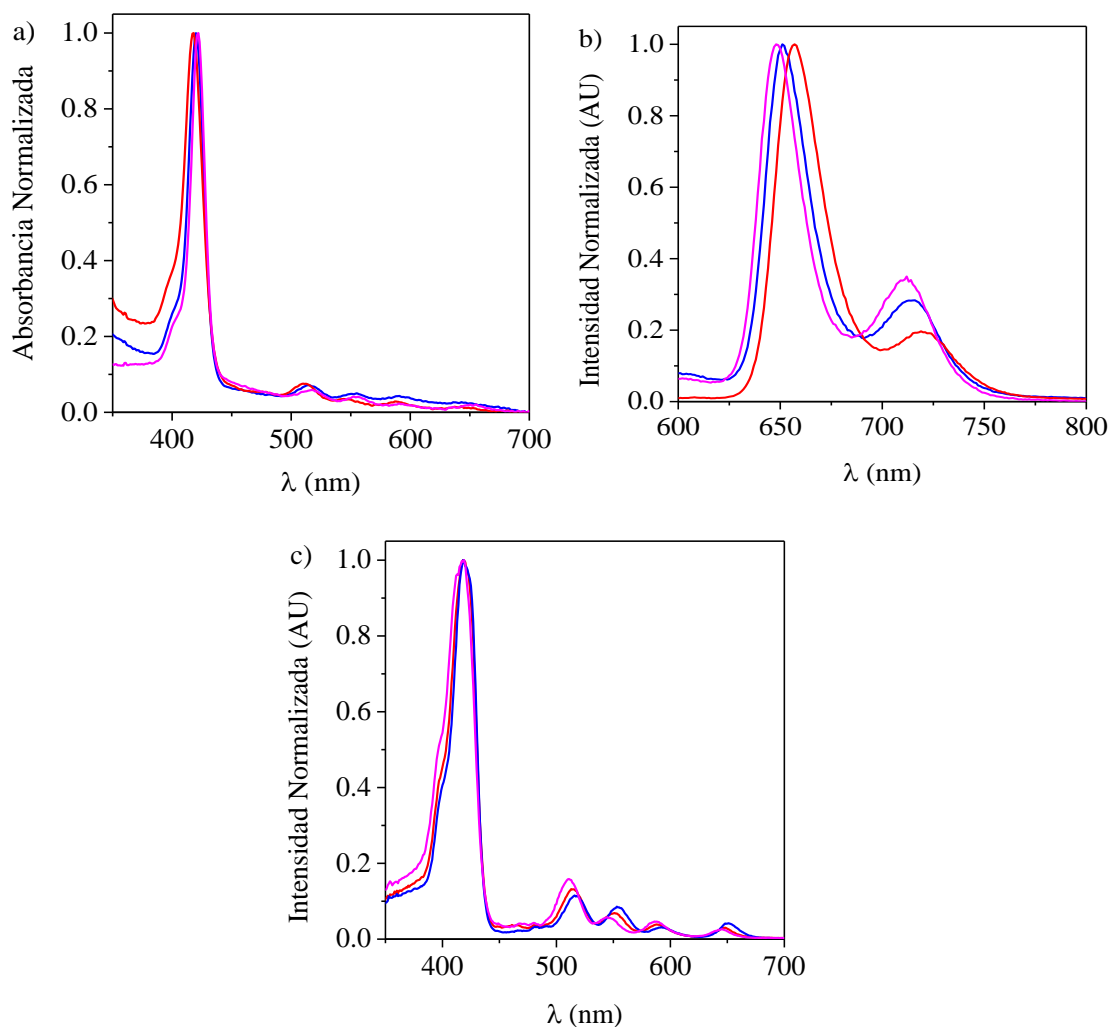


Figura 30. Espectros de a) absorción, b) emisión de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 515$ nm) y c) excitación ($\lambda_{em} = 715$ nm) de F₅APP (línea azul), F₁₀APP (línea roja) and TAPP (línea rosa) en DMF.

Como se mencionó anteriormente, la forma aguda de la banda *Soret* de los espectros, indica que estas porfirinas se encuentran principalmente disueltas en estado monomérico en este solvente.

Se observa un leve corrimiento en los máximos de las bandas *Soret*, lo cual es esperado debido a la similitud en la conjugación de los macrociclos tetrapirrólicos. A medida que aumenta el número de sustituyentes perfluorofenilo (TAPP < F₅APP < F₁₀APP) en la estructura de la porfirina, se produce un corrimiento hipsocrómico, debido a que disminuyen los grupos auxocromos aportados por la función éter del aminopropoxifenilo. En la se indican los máximos de absorción para cada banda de las porfirinas en DMF.

Los espectros de emisión de fluorescencia en DMF muestran dos bandas típicas de derivados de porfirina, centradas alrededor de 650 y 715 nm, las cuales fueron asignadas a transiciones $Q_x(0-0)$ y $Q_x(0-1)$ ¹⁸⁰. Cambios de Stokes de ~ 2 se calcularon a partir de los máximos de absorción y fluorescencia de la banda $Q_x(0-0)$. Este es un comportamiento típico de porfirinas con simetría D_{2h} y significa que solo se producen cambios estructurales menores entre su estado fundamental y sus estados excitados, como se esperaba debido a la rígida estructura plana del sistema macrociclo tetrapirrólico. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia fueron calculados usando TAPP como referencia ($\Phi_F=0,15$ ¹⁵¹). Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 4 y son consistentes con los encontrados previamente para otras porfirinas en diferentes medios¹⁵¹. La emisión de fluorescencia de estas porfirinas es suficiente para evaluar la presencia de los PS en un microentorno celular a las concentraciones utilizadas para la PDI de los microorganismos *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus*¹⁸¹.

Como se puede observar, los espectros de excitación de estas porfirinas fueron similares a los de absorción. Por lo tanto, estos PS se disolvieron principalmente como monómeros en DMF.

IV.3.4. Actividad fotodinámica

IV.3.4.1. Descomposición de DMA

La fotooxidación del DMA inducida por porfirinas se estudió en DMF en condiciones aeróbicas. Las muestras se irradiaron a 419 nm, longitud de onda a la cual absorben las porfirinas F₅APP, F₁₀APP y TAPP. La fotodegradación de DMA se siguió monitoreando su

descomposición a partir de los espectros de absorción. En todos los casos estudiados, la fotooxidación sigue una cinética de pseudo primer orden a una longitud de onda de 379 nm con respecto a la concentración de DMA. A partir de las gráficas semilogarítmicas características (Figura 31), que describen el progreso de la reacción del DMA, se calcularon los valores de k_{obs} para cada fotosensibilizador (Tabla 6). Teniendo en cuenta que este sustrato es un desactivador de $O_2(^1\Delta_g)$ por reacción química exclusivamente, es un método utilizado para evaluar la capacidad de los PS de producir $O_2(^1\Delta_g)$ en solución ¹⁸². Los rendimientos cuánticos de producción de $O_2(^1\Delta_g)$ (Φ_{Δ}) fueron calculados a partir de los valores de k_{obs}^{DMA} , comparando con el valor obtenido para la referencia TAPP ($\Phi_{\Delta}=0,53$ en DMF) ¹⁵¹. En los resultados de la Tabla 6, se observa que F₅APP y F₁₀APP fotodescomponen prácticamente de igual manera al DMA, y que la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ disminuye con respecto a TAPP, la cual no contiene grupos apolares perfluorofenilos. Sin embargo, la actividad fotodinámica de F₅APP y F₁₀APP es suficientemente alta para inducir daños en los sistemas biológicos.

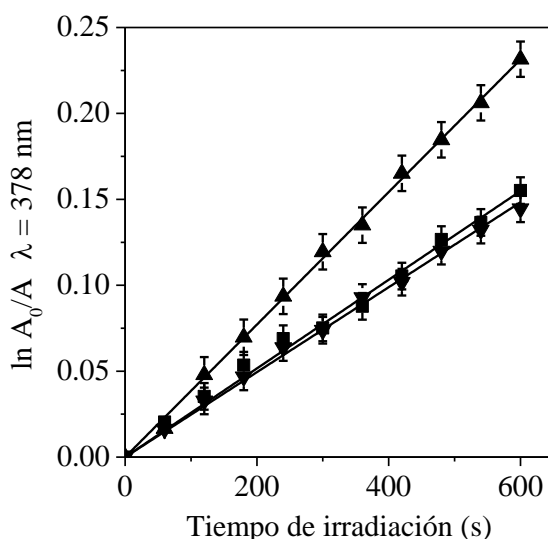


Figura 31. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de DMA fotosensibilizada por F₅APP (■), F₁₀APP (▼) and TAPP (▲) ($\lambda_{irr} = 420$ nm) in DMF.

Tabla 6. Propiedades espectroscópicas y fotodinámicas de F₁₀APP, F₅APP and TAPP en DMF.

PS	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{Soret}}$ (nm)	ϵ^{Soret} M ⁻¹ .cm ⁻¹	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	Φ_{F}	$k_{\text{obs}}^{\text{DMA}}$ (s ⁻¹)	Φ_{Δ}
F ₁₀ APP	418	1,68x10 ⁵	649	0,09 ± 0,01	(2,4±0.1)x10 ⁻⁴	0,33±0,01
F ₅ APP	420	1,67x10 ⁵	651	0,11 ± 0,01	(2,6±0.1)x10 ⁻⁴	0,36±0,01
TAPP	421	1,64x10 ⁵	655	0,15 ± 0,01	(3,8±0.2)x10 ⁻⁴	0,53±0,02

IV.3.5. Estudios con microorganismos

IV.3.5.1. Unión de las porfirinas a células microbianas

La capacidad de estas porfirinas para unirse a células microbianas se investigó en suspensiones de células de *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans* en PBS.

Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de porfirina en la oscuridad a 37 °C. La cantidad de PS unido a las células se determinó mediante fluorescencia. Las Figuras 32, 33 y 34 muestran la cantidad de F₅APP, F₁₀APP y TAPP recuperadas de las células microbianas luego de los tiempos de incubación 2, 5 y 15 min.

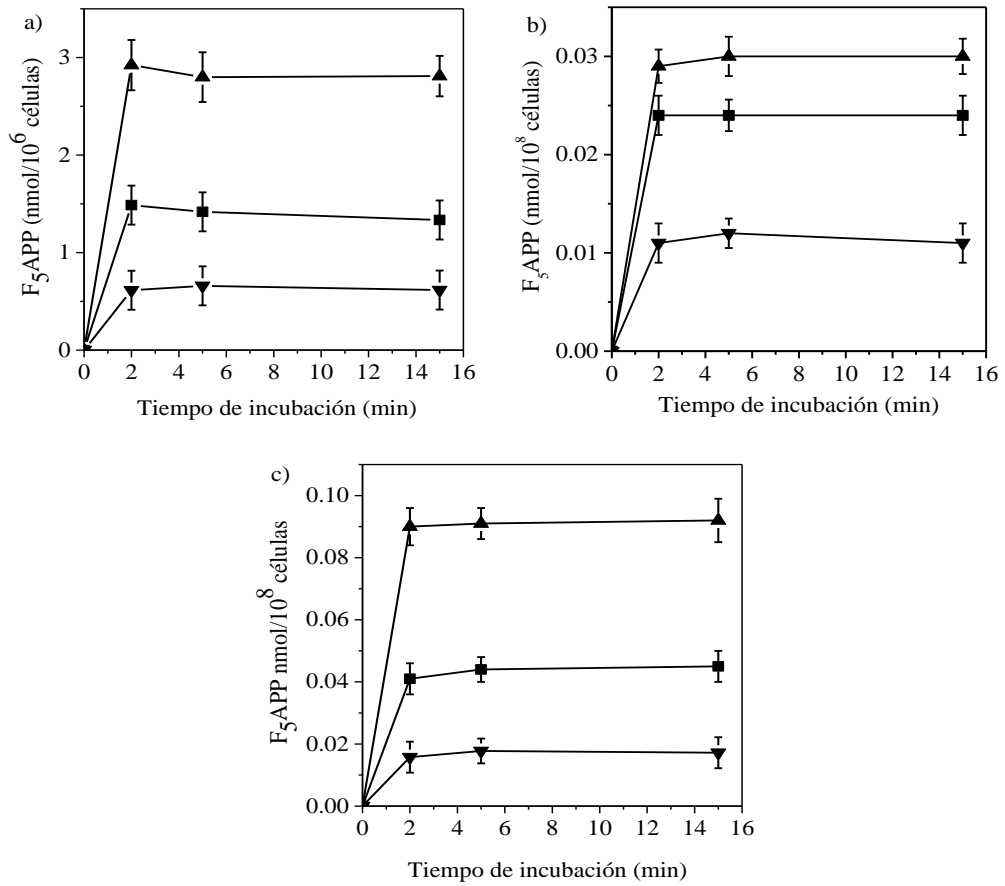


Figura 32. Cantidad de F₅APP recuperada de a) *C. albicans* (~10⁶ UFC/ml) y b) *E. coli* (~10⁸ UFC/ml) tratadas con 2.5 μM (▼), 5.0 μM (■) y 7.5 μM (▲) de PS y c) *S. aureus* (~10⁸ UFC/ml) tratada con 1.0 μM (▼), 2.5 μM (■) y 5.0 μM (▲) de PS, para diferentes tiempos de incubación a 37 °C en oscuridad.

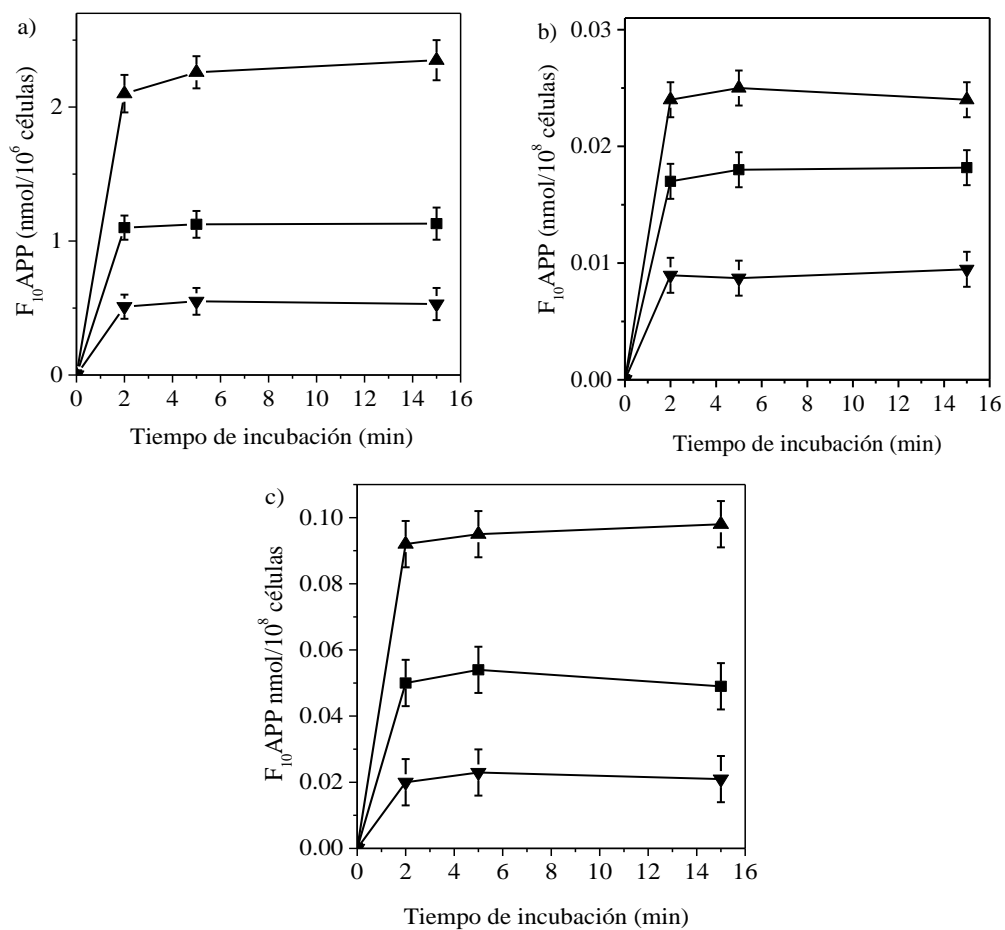


Figura 33. Cantidad de F₁₀APP recuperada de a) *C. albicans* (~10⁶ UFC/ml) y b) *E. coli* (~10⁸ UFC/ml) tratadas con 2.5 μM (▼), 5.0 μM (■) y 7.5 μM (▲) de PS y c) *S. aureus* (~10⁸ UFC/ml) tratada con 1.0 μM (▼), 2.5 μM (■) y 5.0 μM (▲) de PS, para diferentes tiempos de incubación a 37 °C en oscuridad.

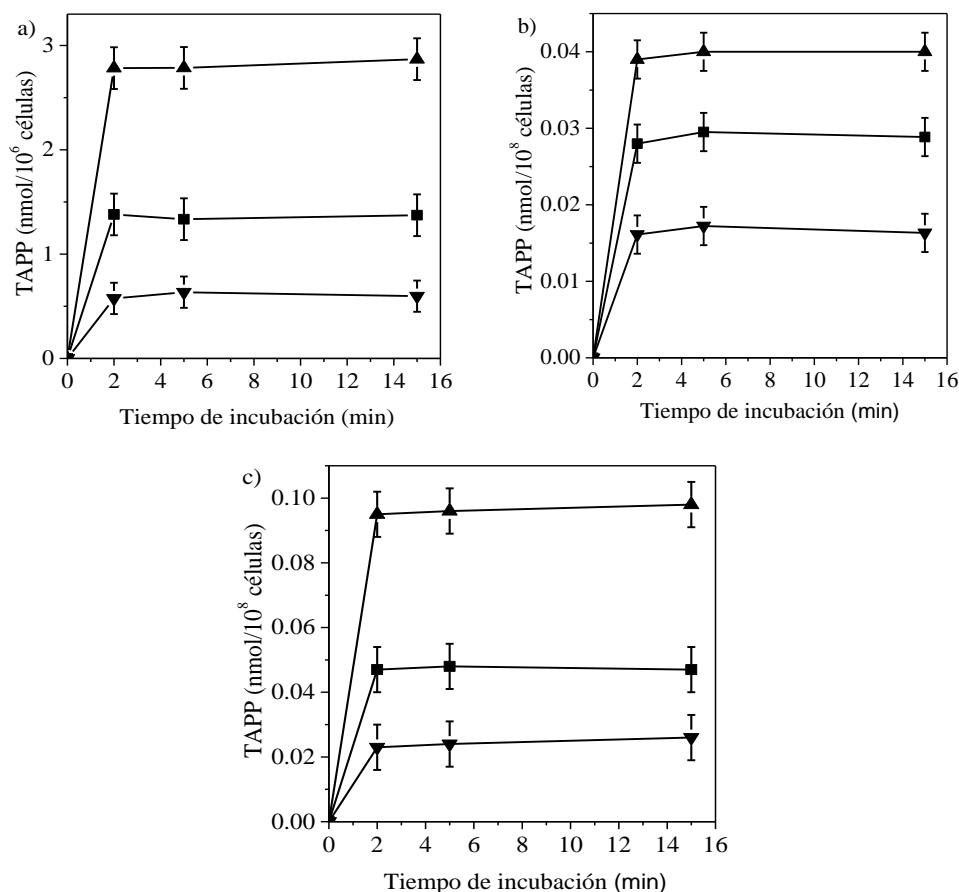


Figura 34. Cantidad de TAPP recuperada de a) *C. albicans* (~10⁶ UFC/ml) y b) *E. coli* (~10⁸ UFC/ml) tratadas con 2.5 μM (▼), 5.0 μM (■) y 7.5 μM (▲) de PS y c) *S. aureus* (~10⁸ UFC/ml) tratada con 1.0 μM (▼), 2.5 μM (■) y 5.0 μM (▲) de PS, para diferentes tiempos de incubación a 37 °C en oscuridad.

La envoltura celular de las células microbianas representa la principal barrera para la unión de las porfirinas. Por lo tanto, el número y la distribución de cargas pueden desempeñar un papel predominante en la interacción entre el PSy células ¹⁵³. Los estudios *in vitro*, mostraron que estas porfirinas se unen rápidamente a las células en un corto periodo de incubación. La unión de las porfirinas a las células fue comparable. en *S. aureus*, mientras que una cantidad ligeramente mayor de F₅APP que F₁₀APP se encontró en *E. coli*. Además, la cantidad de porfirinas unidas a las células de *S. aureus* fueron mayores que las obtenidas en *E. coli*. En células *C. albicans*, la unión de F₅APP y TAPP fue similar, mientras que una menor proporción se encontró utilizando F₁₀APP. La cantidad de F₅APP unida a *C. albicans* fue comparable a la obtenida previamente para 5,10,15,20-tetrakis (4-*N*, *N*, *N*-trimetilamoniofenil) porfirina (TMAP⁴⁺; 1,4 nmol/10⁶ células) ¹⁸³. Además, se determinó un valor de unión similar. utilizando

5,10,15,20-tetrakis (4-*N*-metilpiridil) porfirina (TMPyP⁴⁺) (1.7 nmol/10⁶ células) como PS.¹⁸⁴ Por lo tanto, la cantidad de F₅APP unida a *C. albicans* es comparable con las obtenidas de porfirinas sustituidas por grupos catiónicos intrínsecos.

Estos resultados mostraron una alta afinidad entre F₅APP y las células microbianas.

IV.3.5.2. PDI de microorganismos

La fotoinactivación de *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans* se investigó incubando los cultivos con diferentes concentraciones de porfirina. Las Figuras 35, 36 y 37 corresponden a la sobrevivencia celular de microorganismos fotosensibilizados por F₅APP, F₁₀APP y TAPP, respectivamente. No se encontró toxicidad para las células tratadas con las diferentes concentraciones de porfirinas durante 30 min en la oscuridad.

La consecuencia de los sustituyentes amino básicos en la periferia del macrociclo de estas porfirinas fue dependiente de los microorganismos. En *S. aureus*, la fotoinactivación inducida por F₅APP o F₁₀APP fue muy similar a la encontrada para TAPP. Las bacterias Gram positivas son más susceptibles a la PDI y pueden fotoinactivarse por PS neutros, aniónicos o catiónicos. Sin embargo, los daños fotoinducidos mediados por F₁₀APP disminuyen considerablemente en las células de *E. coli*. Se conoce la importancia de los grupos catiónicos en los PS para producir fotoinactivación de bacterias Gram negativas.¹⁸⁵ La diferente permeabilidad de las barreras entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas estuvieron involucradas principalmente en la eficiencia observada de estas porfirinas.

F₅APP fue más eficaz que F₁₀APP para fotoinactivar a células de *C. albicans*. En general, se requirió la presencia de cargas catiónicas para un eficiente muerte por PDI de esta levadura.¹⁵³ Las células fúngicas tienen una capa de β -glucano y quitina en la pared celular, que produce una barrera de permeabilidad intermedia entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas.¹⁸⁶ Así, *S. aureus* fue más susceptible a la actividad fotodinámica mediada por F₅APP, mientras que una radiación más larga o una una mayor concentración de porfirina fue necesaria para inactivar *E. coli*.

Por otro lado, una erradicación completa de *C. albicans* sensibilizada por 5 μ M de F₅APP fue posible después de 30 minutos de irradiación. Además del tipo de células microbianas, estas porfirinas se pueden dividir en diferentes partes de la célula y las paredes celulares. Por lo tanto,

el sitio de acción puede influir fuertemente en la eficiencia de estos PS, debido a que las ROS generadas reaccionan rápidamente con las biomoléculas de sus microentornos.¹⁸⁷ Además, durante el tratamiento puede tener lugar una redistribución de la porfirina, probablemente debido a una reubicación de las moléculas que se unieron débilmente a las células o que permanecieron en el medio.¹⁸⁸

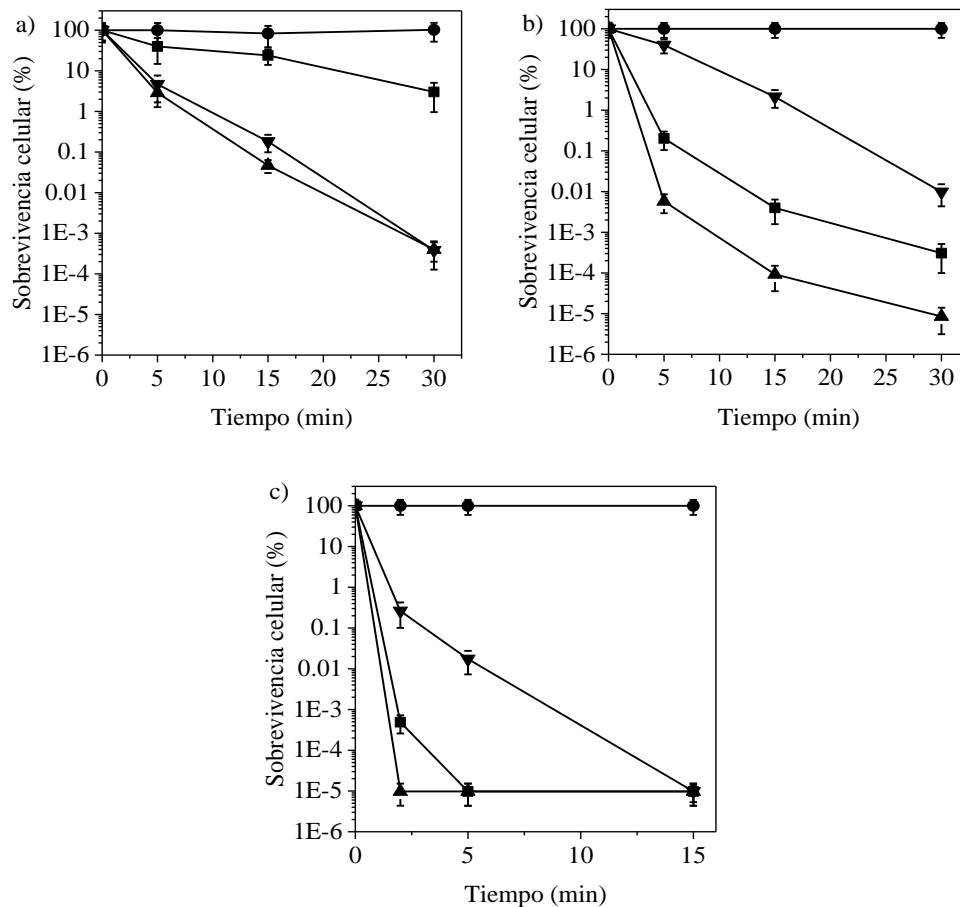


Figura 35. Curvas de supervivencia de células sensibilizadas por F₅APP; a) *C. albicans* (~10⁶ UFC/ml) y b) *E. coli* (~10⁸ UFC/ml) incubadas con 2.5 μM (▼), 5.0 μM (■) and 7.5 μM (▲), c) *S. aureus* (~10⁸ UFC/ml) incubadas con 1.0 μM (▼), 2.5 μM (■) y 5.0 μM (▲) a 37 °C en oscuridad e irradiadas con luz visible por diferentes tiempos. Cultivo control de células irradiadas sin fotosensibilizador (●).

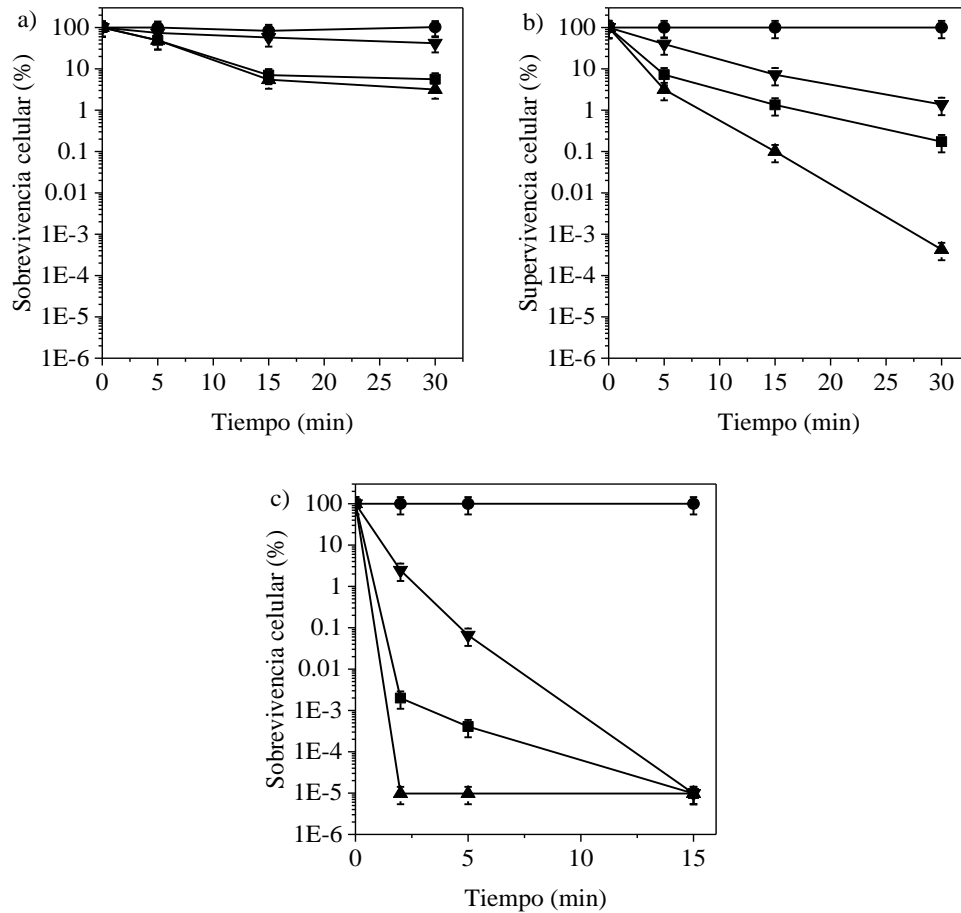


Figura 36. Curvas de sobrevivencia de células sensibilizadas por F₁₀APP; a) *C. albicans* (~10⁶ UFC/ml) y b) *E. coli* (~10⁸ UFC/ml) incubadas con 2.5 μM (▼), 5.0 μM (■) and 7.5 μM (▲), c) *S. aureus* (~10⁸ UFC/ml) incubadas con 1.0 μM (▼), 2.5 μM (■) y 5.0 μM (▲) a 37 °C en oscuridad e irradiadas con luz visible por diferentes tiempos. Cultivo control de células irradiadas sin fotosensibilizador (●).

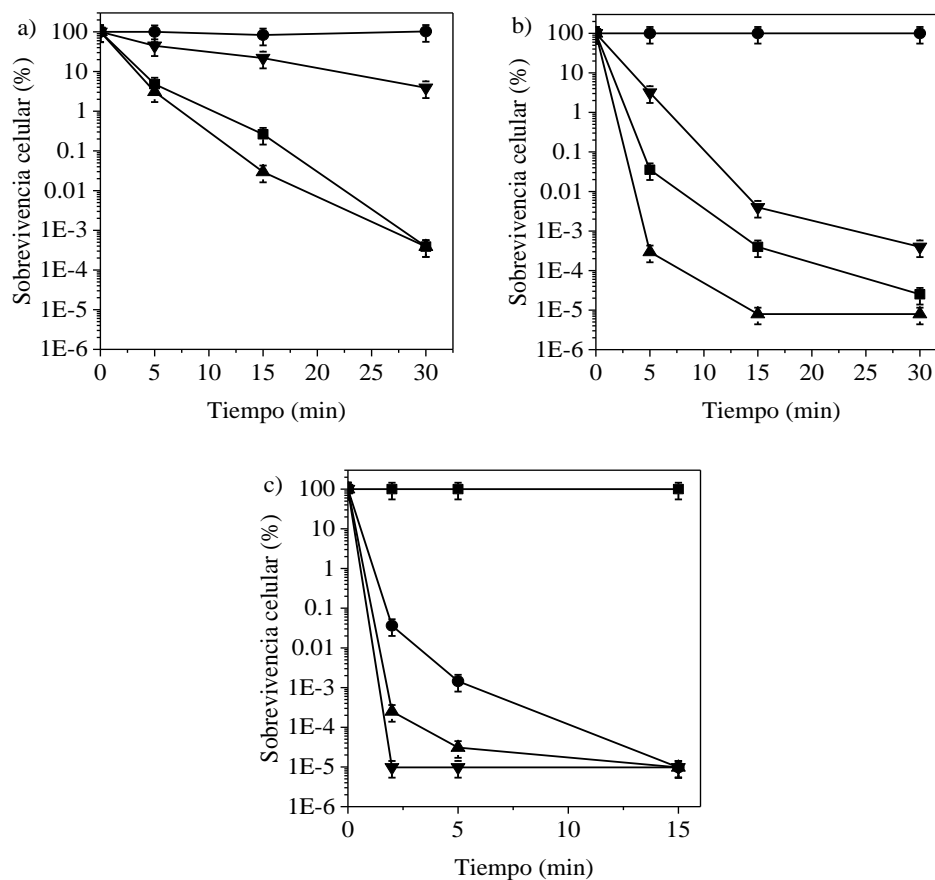


Figura 37. Curvas de supervivencia de células sensibilizadas por TAPP; a) *C. albicans* (~10⁶ UFC/ml) y b) *E. coli* (~10⁸ UFC/ml) incubadas con 2.5 μM (▼), 5.0 μM (■) and 7.5 μM (▲), c) *S. aureus* (~10⁸ UFC/ml) incubadas con 1.0 μM (▼), 2.5 μM (■) y 5.0 μM (▲) a 37 °C en oscuridad e irradiadas con luz visible por diferentes tiempos. Cultivo control de células irradiadas sin fotosensibilizador (●).

IV.3.5.3. Estudio del mecanismo de acción fotodinámica en la PDI

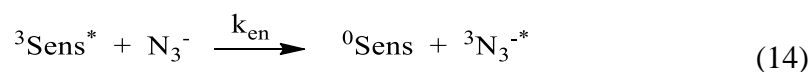
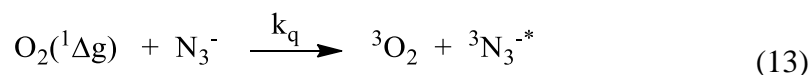
Con el fin de obtener información acerca del principal mecanismo de fotorreacción involucrado en la inactivación de los microorganismos *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus*, por parte de las porfirinas F₅TAP, F₁₀TAP y TAPP, se realizaron una serie de experimentos variando ciertas condiciones. Se utilizaron azida de sodio y manitol junto con los PS, con el objetivo de analizar la desactivación de ROS. Por otro lado, se estudió la PDI de las suspensiones celulares en D₂O, solvente en el cual el tiempo de vida de O₂(¹Δ_g) es más largo.

En los ensayos se empleó una concentración de 1 μM de las porfirinas en *S. aureus*, mientras que en *E. coli* y *C. albicans* la concentración fue de 5 μM. El tiempo de irradiación para todos

los cultivos fue de 5 min. Estas condiciones se seleccionaron debido a que en ese tiempo de iluminación se produce una reducción considerable en la viabilidad celular, de manera que al cambiar las condiciones del experimento puedan observarse los efectos.

IV.3.5.3.1. Efecto del ion azida en la PDI

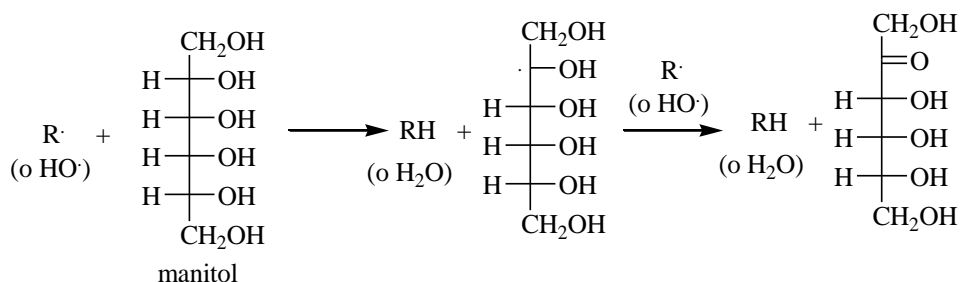
Suspensiones celulares de *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus* se trataron con las porfirinas F₅TAP, F₁₀TAP y TAPP en presencia del ion azida (N₃⁻, 50 mM). Este ion puede desactivar principalmente O₂(¹Δ_g) a través de una transferencia de energía, aunque también es posible que desactive el estado excitado triplete del PS ⁶⁷ (ecuación 13 y ecuación 14). En Figuras 38, 39 y 40 puede observarse que N₃⁻ no resultó tóxico para los cultivos incubados 30 min en la oscuridad. La presencia de N₃⁻ produce una disminución en la PDI de los microorganismos con respecto a los cultivos tratados con los PS en ausencia de este ion. Este efecto protector indicaría que las porfirinas utilizadas generan O₂(¹Δ_g) en el medio celular, produciendo la posterior disminución de la viabilidad. Sin embargo, dicha disminución no es completa. Esto puede deberse a la formación de otras ROS a través de un mecanismo tipo I, las cuales no son desactivadas por N₃⁻ o bien, puede que la concentración de dicho ion en el microentorno no sea la suficiente para desactivar todas las moléculas de O₂(¹Δ_g) generadas.



IV.3.5.3.2. Efecto del D-manitol en la PDI

Suspensiones celulares de *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus* se trataron con F₅APP, F₁₀APP y TAPP en presencia de D-manitol (50 mM). Se sabe que este compuesto es un atrapador de radicales, tales como el O₂⁻ y OH·(Esquema 20); por lo que suele utilizarse como antioxidante. Se estudió la PDI de los microorganismos en presencia de las porfirinas junto a este sustrato, con el objetivo de verificar la presencia de especies radicalarias producidas por un mecanismo de fotorreacción tipo I ¹⁸⁹. En las Figuras 38, 39 y 40 puede observarse que D-manitol no resultó ser tóxico en la oscuridad luego de 30 min de incubación. En presencia del PS e irradiación, el D-manitol disminuyó el efecto fotodinámico, pero en menor proporción que el N₃⁻. Esto

indicaría que la muerte celular no ocurre solo por el ataque de $O_2(^1\Delta_g)$ (mecanismo tipo II), sino que hay especies radicalarias que también son responsables de dicha muerte. Es decir que, si bien la viabilidad celular disminuye a causa de un mecanismo tipo II, existe una contribución del mecanismo de acción tipo I.



Esquema 20. Reacción entre D-manitol y ROS del mecanismo tipo I

IV.3.5.3.3. PDI de suspensiones celulares en D₂O

En D₂O el tiempo de vida del $O_2(^1\Delta_g)$ es dieciséis veces mayor que en agua (en D₂O $\tau_0=68 \mu\text{s}$ y en agua $\tau_0=4,2 \mu\text{s}$)⁷⁰. Con el fin de complementar los resultados anteriores, se llevó a cabo la PDI de los microorganismos en una solución de PBS preparada con D₂O. Las suspensiones tratadas con F₅APP, F₁₀APP y TAPP en D₂O y mantenidas en la oscuridad durante 30 min, no vieron afectada su viabilidad celular. Mientras que, en Figuras 38, 39 y 40, puede observarse un importante aumento en el efecto fotodinámico cuando los microorganismos son tratados con los PS en D₂O. Esta mayor inactivación estaría confirmando el aporte del mecanismo de acción tipo II en la muerte celular.

En general, el mecanismo de acción fotodinámica puede ser dependiente del agente PS utilizado, el tratamiento fotodinámico y el tipo de célula microbiana¹⁹⁰⁻¹⁹¹. La presencia de N₃⁻ y D-manitol producen una disminución del fotodaño, mientras que en D₂O aumenta la inactivación celular. Resultados similares se encontraron previamente para la inactivación de microorganismos sensibilizada por porfirinas tri y tetra catiónicas¹⁹². Por lo tanto, los resultados indican que la fotoinactivación inducida por porfirinas es principalmente a través de $O_2(^1\Delta_g)$. Sin embargo, aunque en menor medida, una participación de reacciones del tipo I también puede estar involucradas en la PDI.

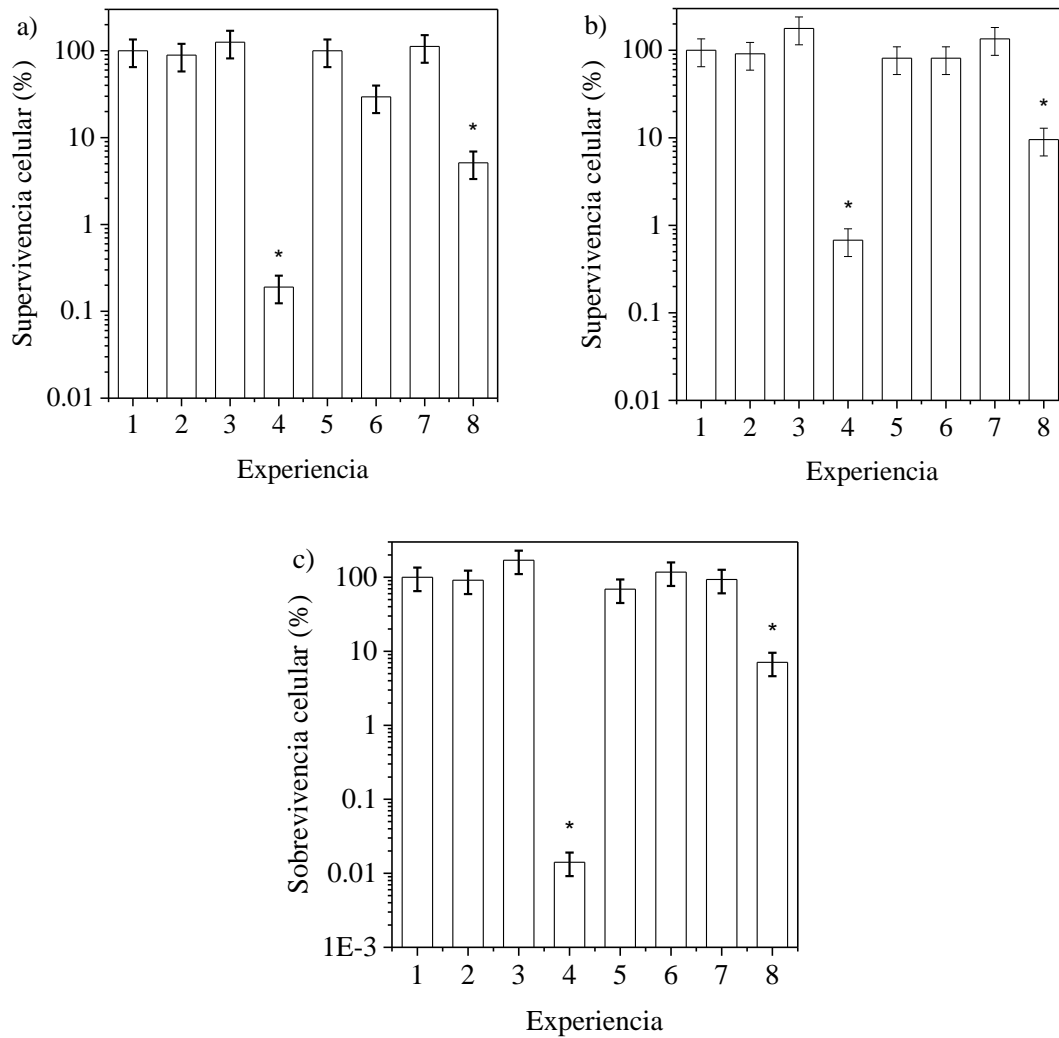


Figura 38. Supervivencia de a) *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/ml), b) *E. coli* ($\sim 10^8$ UFC/ml) tratadas con 5 μ M de F₅APP e irradiadas 15 y 5 min, correspondientemente y c) *S. aureus* ($\sim 10^8$ UFC/ml) tratadas con 1 μ M de F₅APP y 5 min de irradiación; (1) células en oscuridad; (2) células irradiadas; (3) células tratadas con F₅APP en oscuridad; (4) células tratadas con F₅APP irradiadas; (5) células irradiadas conteniendo 50 mM de azida de sodio; (6) células tratadas con F₅APP conteniendo 50 mM de azida de sodio, irradiadas; (7) células irradiadas conteniendo 50 mM D-manitol; (8) células tratadas con F₅APP conteniendo 50 mM D-mannitol, irradiadas (* $p < 0.05$, en comparación con el control).

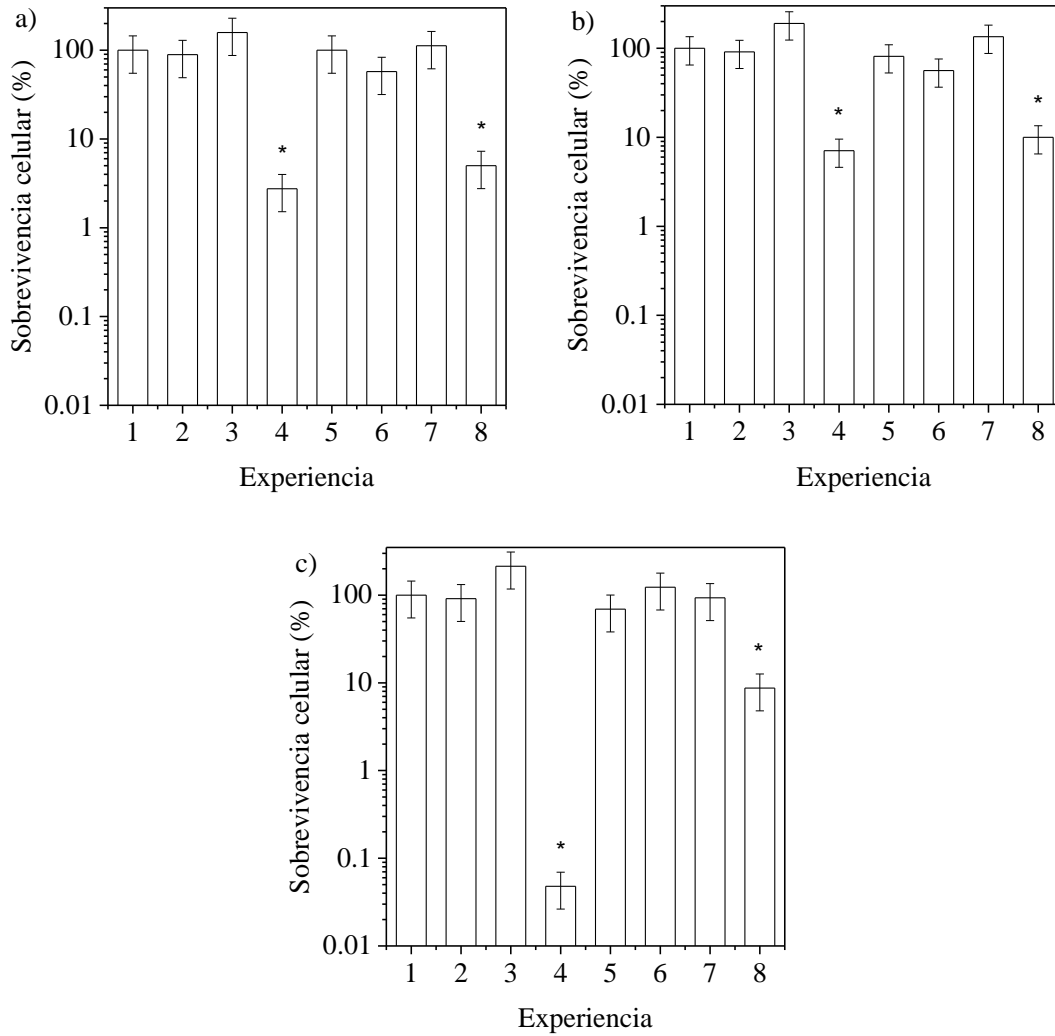


Figura 39. Sobrevivencia de a) *C. albicans* (~10⁶ UFC/ml), b) *E. coli* (~10⁸ UFC/ml) tratadas con 5 μM de F₁₀APP e irradiadas 15 y 5 min, correspondientemente y c) *S. aureus* (~10⁸ UFC/ml) tratadas con 1 μM de F₁₀APP y 5 min de irradiación; (1) células en oscuridad; (2) células irradiadas; (3) células tratadas con F₁₀APP en oscuridad; (4) células tratadas con F₁₀APP irradiadas; (5) células irradiadas conteniendo 50 mM de azida de sodio; (6) células tratadas con F₁₀APP conteniendo 50 mM de azida de sodio, irradiadas; (7) células irradiadas conteniendo 50 mM D-manitol; (8) células tratadas con F₁₀APP conteniendo 50 mM D-mannitol, irradiadas (**p* < 0.05, en comparación con el control).

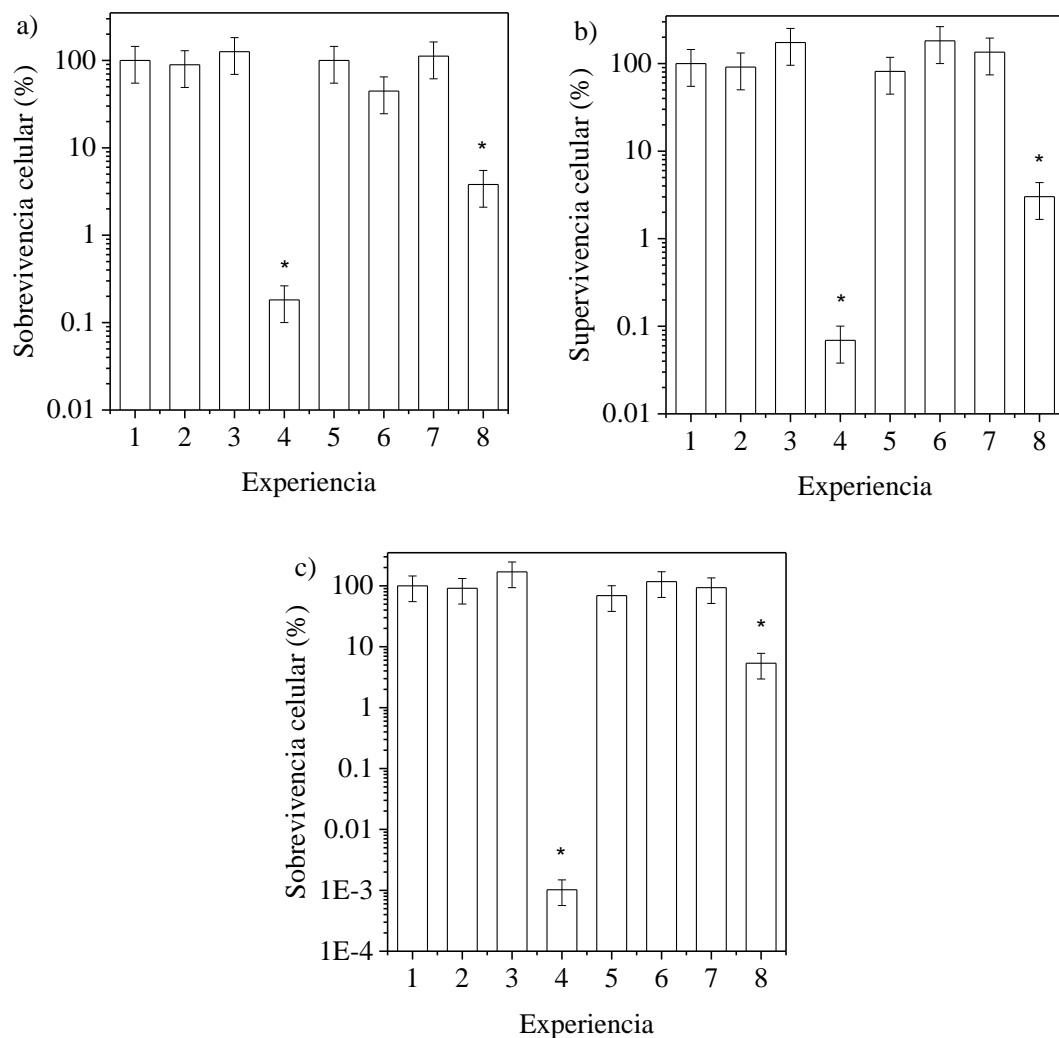
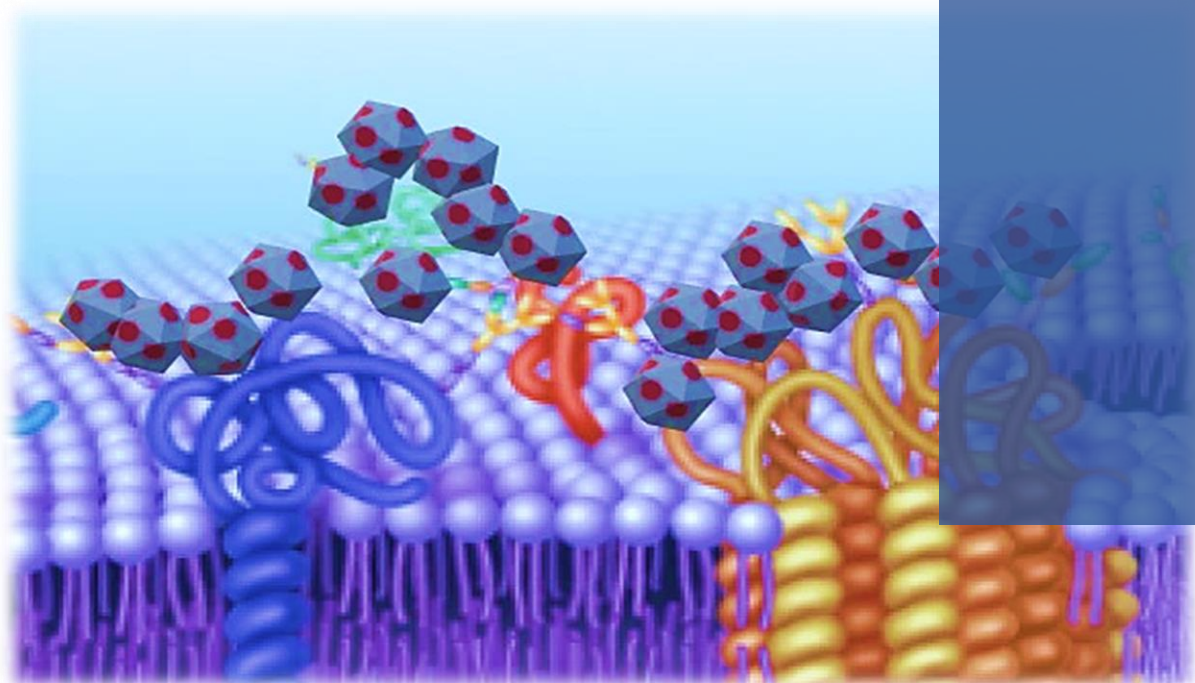


Figura 40. Sobrevivencia de a) *C. albicans* (~10⁶ UFC/ml), b) *E. coli* (~10⁸ UFC/ml) tratadas con 5 μM de TAPP e irradiadas 15 y 5 min, correspondientemente y c) *S. aureus* (~10⁸ UFC/ml) tratadas con 1 μM de TAPP y 5 min de irradiación; (1) células en oscuridad; (2) células irradiadas; (3) células tratadas con TAPP en oscuridad; (4) células tratadas con TAPP irradiadas; (5) células irradiadas conteniendo 50 mM de azida de sodio; (6) células tratadas con TAPP conteniendo 50 mM de azida de sodio, irradiadas; (7) células irradiadas conteniendo 50 mM D-manitol; (8) células tratadas con TAPP conteniendo 50 mM D-mannitol, irradiadas (**p* < 0.05, en comparación con el control).

***IV.4. Conjugados nanopartículas magnéticas-
porfirinas F₅TAP y F₁₀TAP***



Las porfirinas F₅TAP y F₁₀TAP pueden funcionalizarse a partir del sustituyente perfluorofenilo. Este grupo puede reaccionar con aminas alifáticas por una reacción de sustitución nucleófila aromática. Usando esta propiedad, es posible inmovilizar PS en nanopartículas y superficies, mediante enlaces covalentes. La formación de conjugados con nanopartículas magnéticas puede proporcionar ventajas, mencionadas anteriormente, como la recuperación del PS del medio tratado por medio de un campo magnético externo, la reutilización sin producir contaminación por desechos y la posibilidad de localizar el tratamiento, dirigiendo el conjugado hacia el sitio de interés a través de un imán.

*Por estas razones, se procedió con la inmovilización de F₅TAP y F₁₀TAP en nanopartículas magnéticas de óxido de hierro. Además, se estudió la actividad fotodinámica de ambas porfirinas inmovilizadas y su capacidad para fotoinactivar *S. aureus*.*

IV.4.1. Síntesis de conjugados MNPSINH-F₄TAP y MNPSINH-F₉TAP

En primer lugar, se sintetizó el núcleo magnético, que luego se recubrió con sílice y posteriormente se funcionalizó con grupos propilamino, como se describió anteriormente (sección IV.2.1.1.). La formación de los conjugados correspondientes se llevó a cabo en DMF, a 70 ° C, en atmósfera de argón, durante 48 h con agitación continua. En estas condiciones se produce la reacción de sustitución nucleofílica aromática (S_NAr) del átomo de fluor, en la posición *para*, por uno de los grupos amino del MNPSINH₂, que actúan como nucleófilos.

Los conjugados sintetizados (Esquema 12) se resuspendieron en agua (~ 10 nmol/mg de MNPSINH-F₄APP y MNPSINH-F₉APP, 1 mg/ml en ambas suspensiones). En el Esquema 12 se muestra la formación de un solo enlace covalente entre las porfirinas y las NP, sin embargo, puede haber más de un enlace para cada NP. Por otro lado, MNPSINH-F₉APP puede contener uno o varios -si hay más de una molécula de porfirina por NP- átomos de flúor reactivos (F*) en el anillo perfluorado. Esto implica la formación de más enlaces covalentes en dicho conjugado.

IV.4.2. Propiedades espectroscópicas de absorción UV-visible de MNPSINH-F₄APP y MNPSINH-F₉APP

La Figura 41 muestra los espectros de absorción en agua de los conjugados MNPSINH-F₄APP (línea discontinua), MNPSINH-F₁₀APP (línea continua). La línea gris corresponde al *scattering* (o dispersión) generada por el núcleo magnético MNPSINH₂. En estos espectros, se pueden observar las bandas características de los PS unidos a las NP. Por otro lado, se observan cambios batocrómicos de las porfirinas F₅APP y F₁₀APP inmovilizadas, de 6 y 4 nm respectivamente, junto con un ensanchamiento de las bandas *Soret*. Estas diferencias en las propiedades espectroscópicas pueden deberse al efecto de los diferentes enlaces establecidos por las porfirinas con MNPSINH₂. Efecto también observado en porfirinas inmovilizadas sobre una superficie y puede deberse a una agregación parcial del PS ¹⁶⁶.

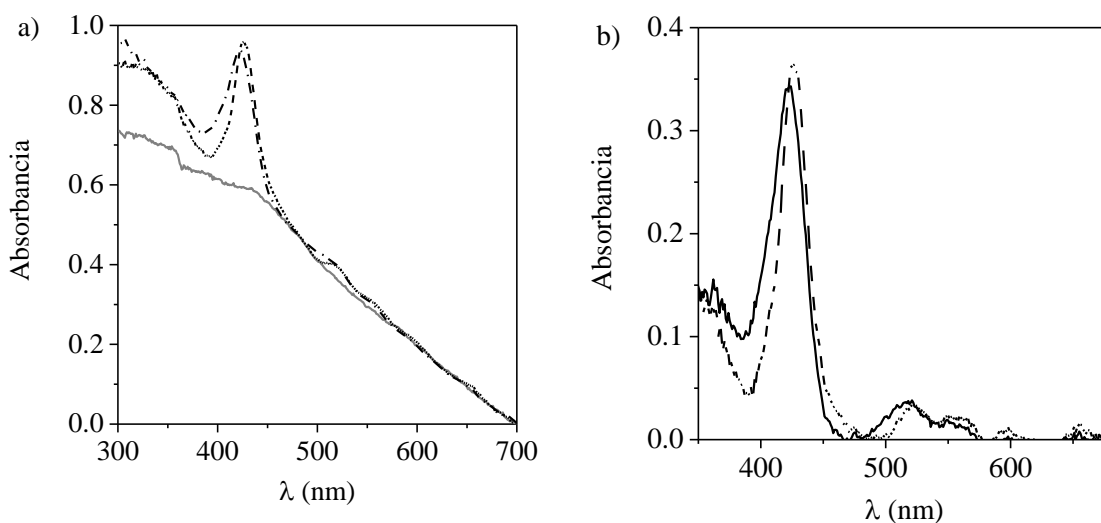


Figura 41. a) Espectro de absorción de MNPSINH-F₉APP (línea continua) ($\lambda_{\text{máx}}=422$ nm), MNPSINH-F₄APP (línea discontinua) ($\lambda_{\text{máx}}=426$ nm), scattering de MNPSINH₂ (línea gris) en DMF; b) Diferencia entre los espectros de absorción de los conjugados y el scattering de MNPSINH₂.

IV.4.3. Actividad fotodinámica de MNPSINH-F₅TAP y MNPSINH-F₁₀TAP

La detección de O₂(¹Δ_g) en agua se llevó a cabo utilizando la sal del derivado de antraceno, ABMM, como sonda molecular. Si bien, la vida útil de O₂(¹Δ_g) en agua es de unos 4 μs, se demostró que ABMM es un aceptor efectivo de esta especie reactiva de oxígeno, debido a su alta solubilidad en dicho solvente. Como en estudios anteriores, se utilizó la porfirina de referencia TPPS₄⁴⁻, PS aniónico elegido para evitar la interacción electrostática con ABMM y, de esta forma, la reacción de fotooxidación sea comparable con la llevada a cabo por los conjugados.

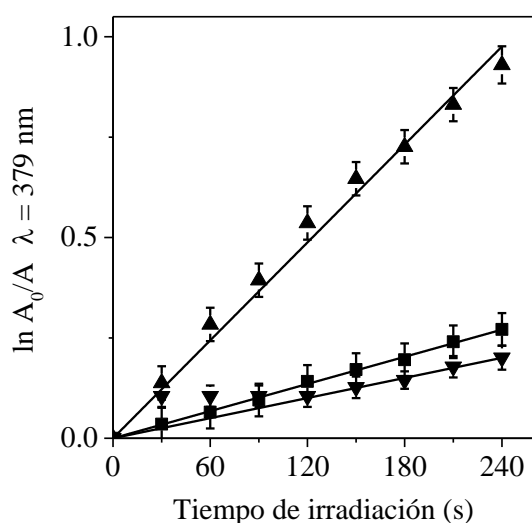


Figura 42. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de ABMM fotosensibilizada por MNPSINH-F₄APP (■), MNPSINH-F₉APP (▼) y TPPS₄⁴⁻ (▲) ($\lambda_{irr} = 455-800$ nm, $\Delta t_{irr} = 30$ s), en agua.

Las gráficas semilogarítmicas que describen el progreso de la fotooxidación de ABMM se muestran en la Figura 42. Los valores obtenidos de k_{obs}^{ABMM} se muestran en la Tabla 7. Como se puede observar, se encontró un alto valor de velocidad de reacción para la descomposición de ABMM fotosensibilizada por ambos conjugados. Si bien los valores de Φ_{Δ} de F₅APP y F₁₀APP inmovilizadas en las NP son casi la mitad de los valores de Φ_{Δ} de las correspondientes porfirinas libres, la actividad fotodinámica de los conjugados es lo suficientemente alta como para inducir daños en los sistemas biológicos.

Tabla 7. Propiedades fotodinámicas de MNPSiNH-F₄APP y MNPSiNH-F₉APP en agua

PS	k_{obs}^{DMA} (s ⁻¹)(H ₂ O)	Φ_{Δ} (H ₂ O)
MNPSiNH-F ₄ TAP	(1,3±0.2)×10 ⁻³	0,22±0,02
MNPSiNH-F ₉ TAP	(0,8±0.2)×10 ⁻³	0,14±0,02
TPPS ₄ ⁴⁻	(4,1±0.2)×10 ⁻³	0,71±0,04

IV.4.4. PDI de microorganismos

La fotoinactivación de *S. aureus* mediada por los conjugados MNPSiNH-F₄APP y MNPSiNH-F₉APP se investigó en suspensiones celulares en PBS (~ 10⁸ UFC/ml) después de diferentes tiempos de irradiación (5 y 15 min) con luz visible. La curva de sobrevivencia se muestra en la Figura 43. No se encontró toxicidad para las células tratadas con MNPSiNH₂ y los correspondientes conjugados, luego de 30 min de incubación en la oscuridad. Además, la viabilidad celular no se vio afectada por la irradiación sin conjugado.

La actividad fotodinámica de F₅APP inmovilizada (3 μM) produjo una disminución de 99,9% de la viabilidad celular de *S. aureus* luego de 15 min de irradiación. Mientras que, 5 μM de la porfirina inmovilizada, produjo la muerte completa de las células bacterianas en el mismo tiempo de exposición a la luz visible. Por el contrario, la acción fotoinactivante de F₁₀APP inmovilizada sobre las NP fue muy escasa, sin prácticamente variación con el aumento de la concentración del conjugado correspondiente.

Tanto F₅APP como F₁₀APP contienen en su macrociclo grupos precursores de cargas positivas y el grupo sustituyente apolar perfluorofenilo, mediante el cual, además, se pudo inmovilizar a los PS sobre las NP. Sin embargo, la estructura con simetría A₃B, correspondiente a la porfirina F₅APP, es la que forma un conjugado adecuado para la PDI de *S. aureus*. Esto puede deberse principalmente a la mayor interacción que ejerce el conugado MNPSiNH-F₄APP con el microentorno celular, durante el tiempo de incubación, lo cual permite una fotoinactivación adecuada.

Estos resultados confirman la importancia de la presencia de grupos precursores de cargas positivas en el PS inmovilizado sobre las NP.

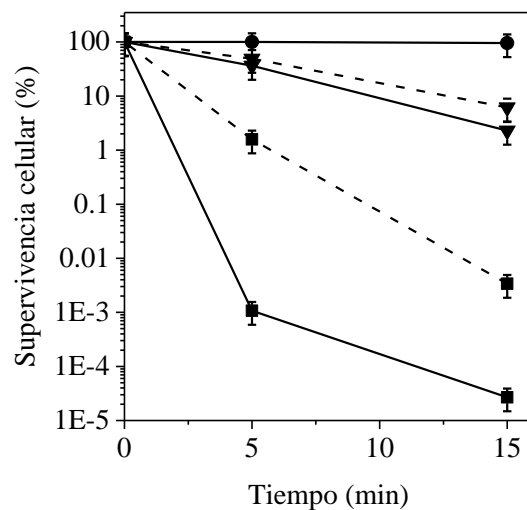
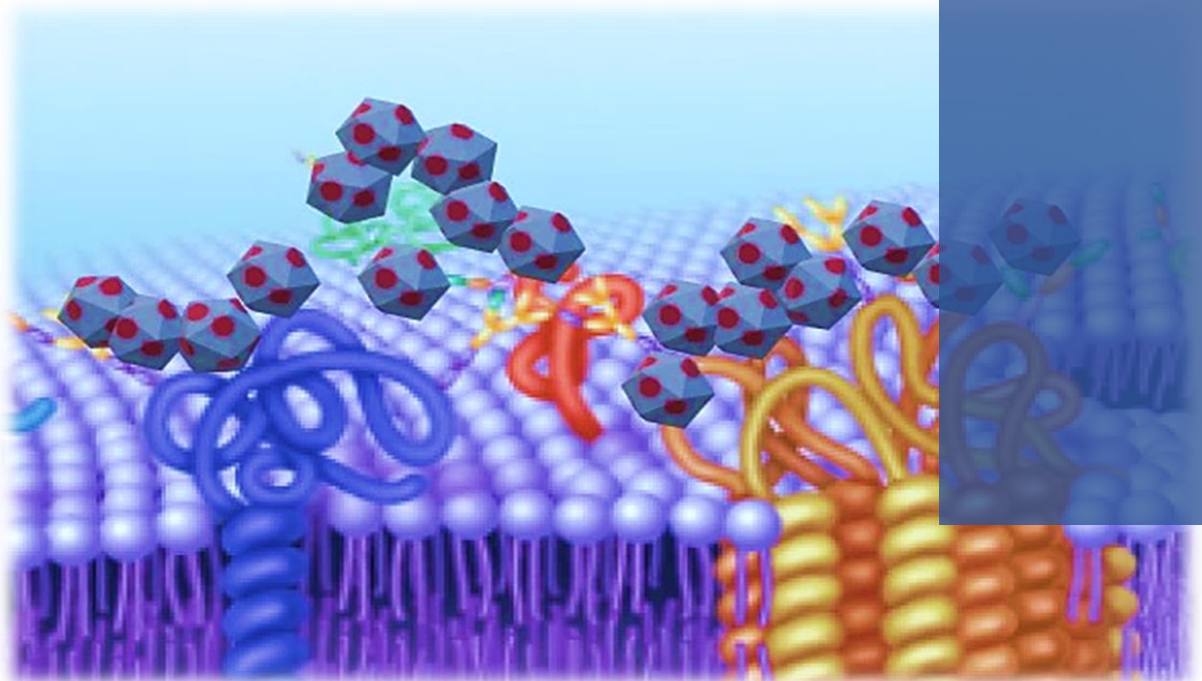


Figura 43. Curvas de supervivencia de *S. aureus* ($\sim 10^8$ UFC/ml) tratadas con: 0.7 mg ($3 \mu\text{M}$) de MNPSINH-F₄APP (■, línea discontinua) y MNPSINH-F₉APP (▼, línea discontinua); y 1,2 mg ($5,0 \mu\text{M}$) de MNPSINH-F₄APP (■, línea continua) y MNPSINH-F₉APP (▼, línea continua); incubadas 30 min a 37°C en oscuridad y, posteriormente, irradiadas con luz visible por 5 y 15 min. Cultivo control (●) -células sin fotosensibilizador e irradiadas.

***IV. 5. Modificación in situ de una porfirina
unida covalentemente a nanopartículas
magnéticas***



Si bien inicialmente se planeaba utilizar la porfirina con simetría A_3B (F_5TAP), previamente sintetizada, para unirla covalentemente a las NP, los procesos de purificación fueron complicados debido a la necesidad de realizar múltiples columnas cromatográficas obteniéndose rendimientos bajos. Por lo tanto, en su lugar se utilizó la porfirina $F_{20}TPP$, comercialmente disponible. Esta porfirina puede ser químicamente modificada en la periferia del macrociclo, una vez unida a las NP, con aminas alifáticas similares a las presentes en la porfirina A_3B .

IV.5.1. Síntesis de los conjugados C1, C2, C3 y C4

En primer lugar se sintetizaron las MNPSINH₂ (sección IV.2.1.2.). Luego se procedió a la reacción de estas NP con la porfirina $F_{20}TPP$, en DMF, para formar el conjugado MNPSINH- $F_{19}TPP$, C1 (Esquema 14) (se la nombra con 19 átomos de fluor, suponiendo que sólo un fluor de los 4 reactivos de toda la molécula, se une a un grupo sustituyente propilamino en las NP) (Esquema 14). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y agitación continua durante 48 h. En estas condiciones tiene lugar la reacción de S_NAr del átomo de fluor, en la posición para, por uno de los grupos amino de las MNPSINH₂¹⁴⁴. El C1 obtenido se lavó mediante decantación magnética y se resuspendió en un cierto volumen de agua, quedando una concentración de 10 nmol/mg (porfirinas/nanopartículas), 4 mg/ml (nanopartículas/suspensión).

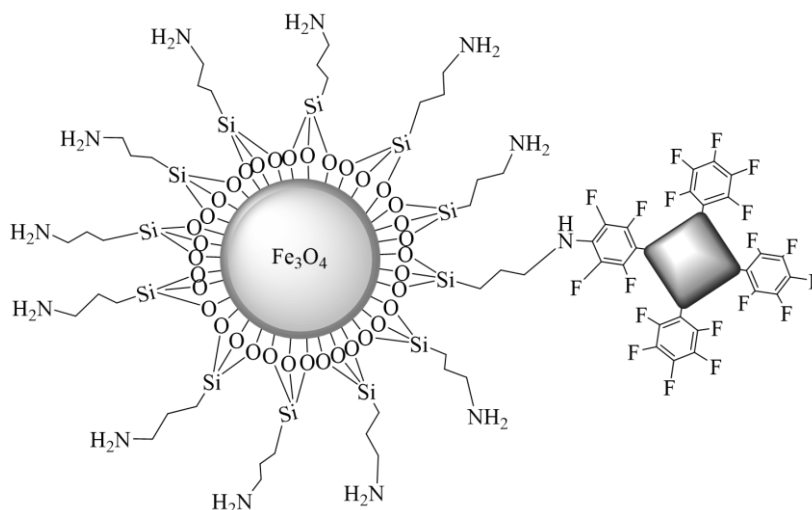


Figura 44. Representación del conjugado 1.

Una alícuota de la suspensión de C1 se sometió a metilación. En primer lugar se descartó el agua contenida y se resuspendieron las NP en DMF. Luego se adicionó CH₃I y se dejó reaccionar 16 h, a 40 °C con agitación continua. Se obtiene así el conjugado 2 (C2) (Figura 45), MNPSIN⁺-F₁₉TPP, en el cual las nanopartículas unidas a la porfirina están metiladas.

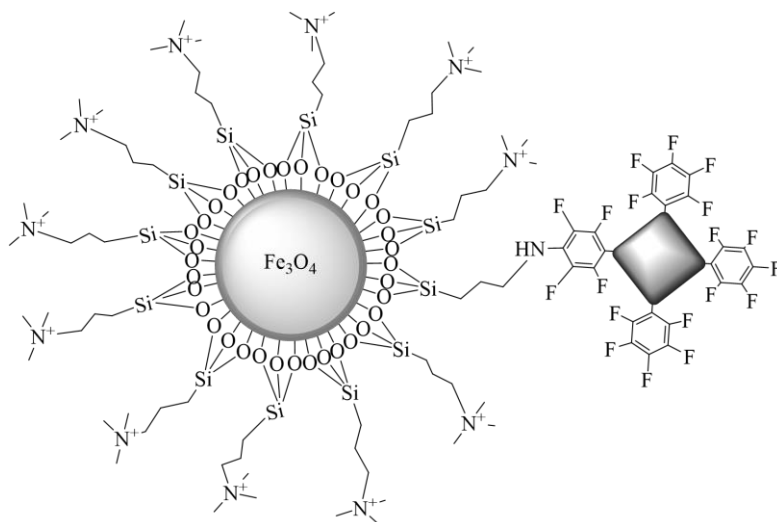


Figura 45. Representación del conjugado 2.

Por otro lado, el C1 se utilizan para añadir a la porfirina inmovilizada el grupo 2-*N,N*-dimetilaminoetoxi, mediante una reacción de S_NAr al anillo bencénico perfluorado ¹⁴⁹ (átomos de F que quedaron sin reaccionar previamente con las NP). Para ello, en primer lugar, se descartó el volumen de la suspensión mediante decantación magnética. Luego, se resuspendieron las NP en THF y se adicionaron a la suspensión *N,N*-dimetiletanolamina e hidróxido de potasio anhidro. Para que la reacción sea exitosa, la relación estequiométrica respecto a la concentración de TPPF₂₀ inmovilizada en C1, es la siguiente: TPPF₂₀ (1 mol): OH-C₂H₄-N(CH₃)₂ (20 mol): KOH (16 mol) ¹⁴⁹. Debido a que TPPF₂₀ unida a las NP tiene al menos tres grupos sustituibles, se duplicó la relación estequiométrica anterior. Por lo tanto, 2 μmoles de TPPF₂₀ (168 mg de conjugado 1), se hicieron reaccionar con 80 μmoles de *N,N*-dimetiletanolamina y 64 μmoles de KOH. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 12 h, con agitación continua y en condiciones de catálisis por transferencia de fase, utilizando bromuro de tetrabutilamonio (100 μl) como catalizador ¹⁹³. El conjugado 3 (C3) obtenido (Figura 46), MNPSINH- F₁₆TPP-N (ahora 16 átomos de F siguiendo la lógica de los 3 que quedaron sin reaccionar al formarse C1), se purificó mediante decantación magnética con lavados con agua y finalmente se resuspendió en el mismo solvente.

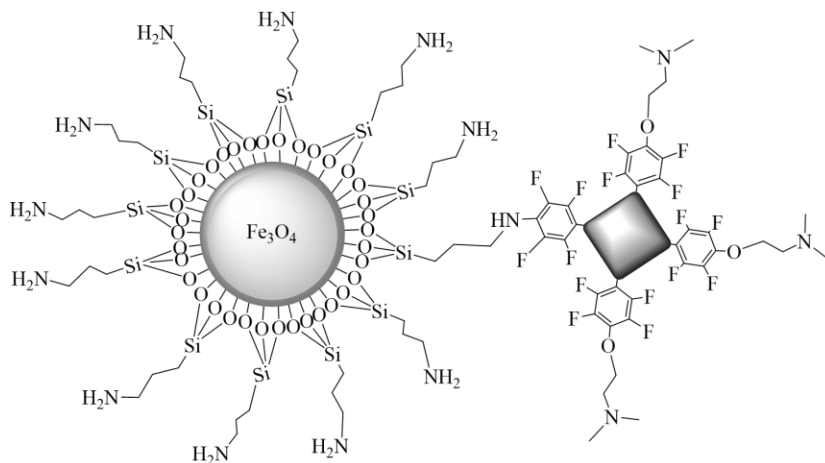


Figura 46. Representación del conjugado 3.

Una alícuota de la suspensión de C3 se sometió a metilación de la misma manera descrita en la sección anteriormente. Se obtuvo así el conjugado 4 (C4) (Figura 47), MNPSIN⁺- F₁₆TPP-N⁺, en el cual las NP unidas a la porfirina están metiladas.

En el Esquema 14 pueden observarse los pasos de síntesis y las estructuras químicas (representación gráfica) de los conjugados C1, C2, C3 y C4.

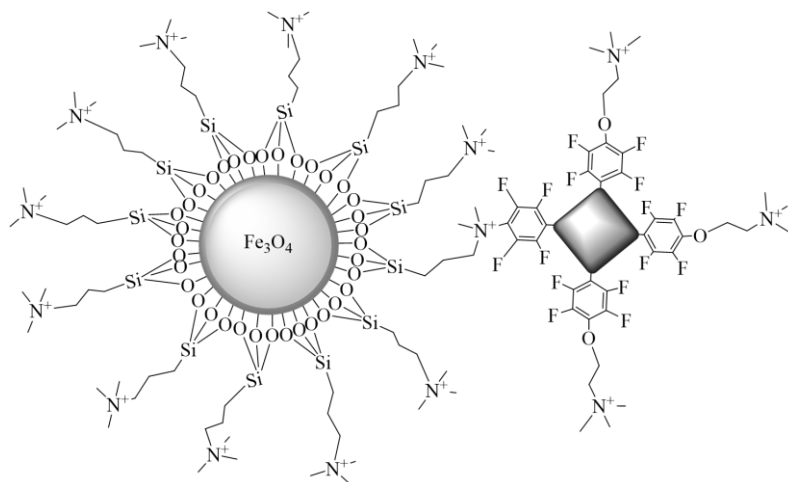


Figura 47. Representación del conjugado 4.

IV.5.2. Microscopía de transmisión electrónica (TEM) y potencial Z

Los conjugados C1, C2, C3 y C4 se caracterizaron por TEM. Se puede observar en la Figura 48 que no varía considerablemente el tamaño de los mismos luego de cada paso de síntesis. Pueden observarse nanopartículas polidispersas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Además, se determinó el potencial Z para evaluar la carga superficial y estabilidad de las suspensiones. Dichas medidas arrojaron los valores 28, 25, 16, 19, 27 y 33 mV para MNPSINH₂, MNPSIN⁺, C1, C2, C3 y C4 correspondientemente. La medida de polaridad arrojó valores positivos en todos los conjugados.

El cambio de potencial Z de 28 mV a 16 mV (MNPSINH₂ a MNPNH-F₁₉TPP) es significativo y podría relacionarse con los grupos -NH₂ protonados; es decir, el potencial Z disminuye al haber menor cantidad de grupos -NH₂ protonados en C1. También, el cambio de 25 mV (MNPSIN⁺) a 19 mV (MNPSIN⁺- F₁₉TPP) es significativo y en la misma dirección anterior. Por otro lado, el potencial Z de C1 y C2 no es significativamente distinto.

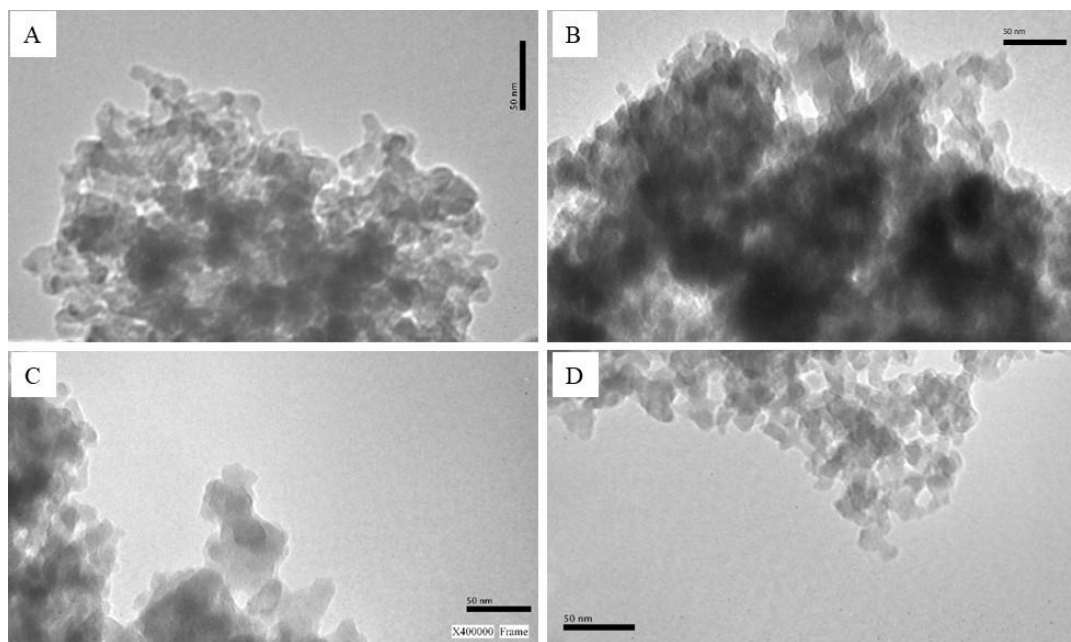


Figura 48. Fotografía de A) C1, B) C2, C) C3 y D) C4 por microscopía de transmisión electrónica.

Nuevamente el cambio de 16 mV a 27 mV (MNPNH-F₁₉TPP a MNPNH-F₁₆TPP-N) es significativo y lo mismo de 19 mV a 33 mV (MNPN⁺-F₁₉TPP a MNPN⁺-F₁₆TPP-N⁺).

Estos resultados muestran que el potencial Z aumenta cuando aumentan las cargas positivas en los mismos. En cuanto a la estabilidad coloidal de dichos conjugados, según las interacciones electrostáticas, el orden es el siguiente: conjugado 4 > conjugado 3 > conjugado 2 ~ conjugado 1. De acuerdo a los valores de potencial Z, los conjugados 3 y 4 pueden tener cierta estabilidad a diferencia de 1 y 2.

IV.5.3. Espectroscopía de absorción UV-visible y fluorescencia

La Figura 49 muestra los espectros de absorción en agua y DMF, correspondientemente, de los conjugados C1 (línea negra), C2 (línea roja), C3 (línea azul), C4 (línea celeste) y de la porfirina libre F₂₀TPP (línea rosa). La línea color gris corresponde a la dispersión (o *scattering*) generada por las MNPSINH₂. En dichos espectros se pueden observar las bandas características del PS unido a las NP. Las bandas de cada conjugado: la *Soret* alrededor de $\lambda_{\text{máx}} = 428$ nm en agua y $\lambda_{\text{máx}} = 430$ nm en DMF, y las cuatro bandas *Q*³⁸⁻³⁹.

Por otro lado, puede observarse un corrimiento batocrómico de 15 nm en agua y 13 nm en DMF, junto con un ensanchamiento de la banda *Soret* del PS en cada conjugado, respecto a cuando el mismo no está unido covalentemente a las NP magnéticas. Estas diferencias en propiedades espectroscópicas puede deberse al efecto de las diferentes uniones que establece la porfirina con las MNPSINH₂. Este efecto también se observa en porfirinas inmovilizadas sobre una superficie y puede deberse a una agregación parcial del PS, como se explicó en los conjugados sintetizados con anterioridad¹⁶⁶.

En la Tabla 8 pueden observarse las diferencias en los parámetros espectroscópicos correspondientes a los conjugados C1, C2, C3 y C4 y a la porfirina F₂₀TPP libre, en los solventes H₂O y DMF. Debido a la presencia de interacción entre las moléculas de porfirina, enlazadas a las NP, se puede estimar que el valor de absortividad molar (ϵ) de F₂₀TPP inmovilizada, es menor al de F₂₀TPP libre ($\epsilon = 2,3 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

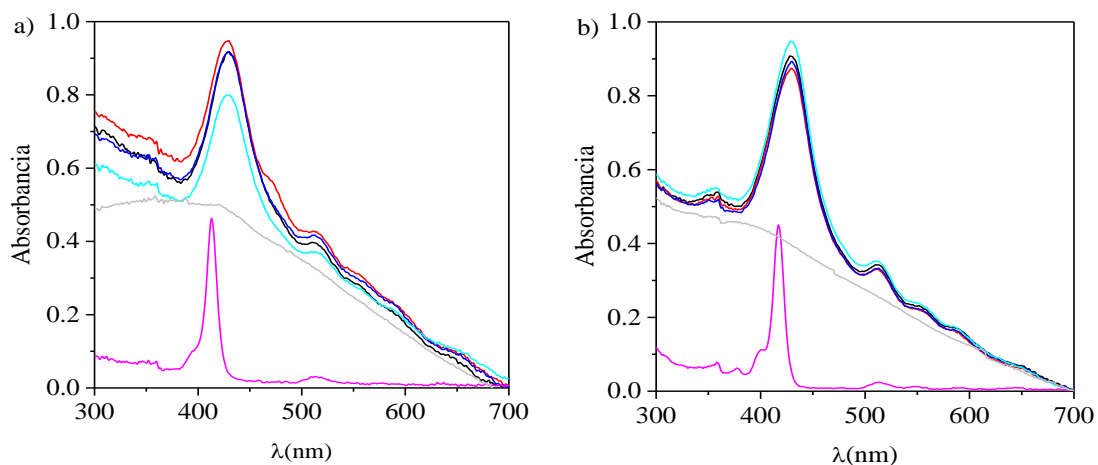


Figura 49. Espectro de absorción UV-visible en a) H₂O y b) DMF de los conjugados C1 (línea negra), C2 (línea roja), C3 (línea azul), C4 (línea celeste) y de la porfirina libre F₂₀TPP (línea rosa). Scattering de MNPSINH₂ (línea gris).

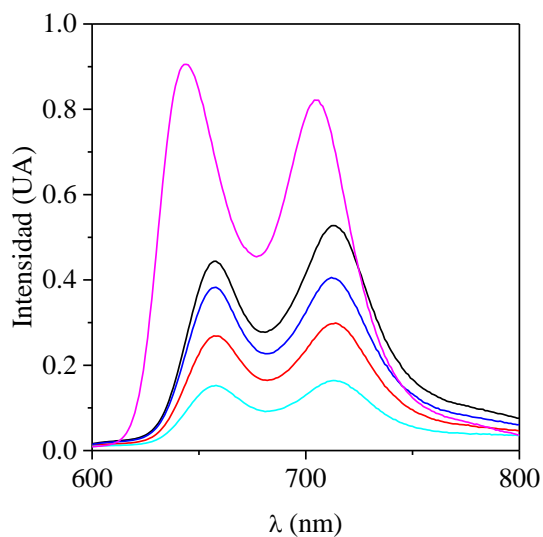


Figura 50. Espectro de emisión en H₂O de los conjugados C1 (línea negra), C2 (línea roja), C3 (línea azul), C4 (línea celeste) y de la porfirina libre F₂₀TPP (línea rosa).

Tabla 8. Parámetros espectroscópicos de los conjugados C1, C2, C3, C4 y la porfirina F₂₀TPP

PS	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{ab}}(\text{H}_2\text{O})$ (nm)	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{ab}}(\text{DMF})$ (nm)	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{em}}(\text{H}_2\text{O})$ (nm)	$\Phi_{\text{F}}(\text{H}_2\text{O})$
C1	428	430	657	0,036±0,005
C2	428	430	657	0,021±0,002
C3	428	430	657	0,028±0,003
C4	428	430	657	0,011±0,001
TPPF ₂₀	413	417	644	0,080±0,007

Estudios anteriores con porfirinas bases libres, muestran que las bandas entre 600 y 800 nm del espectro de emisión, corresponden a transiciones $Q_x(0-0)$ y $Q_x(0-1)$ ¹⁸⁰. Este es un comportamiento típico de porfirinas con simetría D_{2h} e indica que la estructura vibrónica de la porfirina permanece prácticamente sin cambios después de la excitación. El mismo comportamiento se observa cuando F₂₀TPP está inmovilizada sobre las NP, con sus diferentes modificaciones *in situ* (Figura 50). Los rendimientos cuánticos de fluorescencia fueron calculados usando TPPS⁴⁻₄ como referencia ($\Phi_{\text{F}}=0,080$ ¹⁹⁴). Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 8. La emisión de fluorescencia de estos conjugados puede ser adecuada para la detección de los conjugados en un microentorno celular a las concentraciones utilizadas para la PDI de los microorganismos *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus*¹⁸¹.

IV.5.4. Actividad fotodinámica

Soluciones del sustrato correspondiente y cada conjugado, o la porfirina de referencia TPPS⁴⁻₄¹⁵¹, se irradiaron en condiciones aeróbicas con luz visible. Se utilizó la misma concentración de los conjugados C1, C2, C3 y C4 (0,4 mg/ml, 10 nmol/mg. Equivalente a 2 μM de porfirina) en todas las experiencias, al igual que la concentración de la referencia.

IV.5.4.1. Fotooxidación de ABMM y DMA. Producción de O₂(¹ Δ_g)

La producción de O₂(¹ Δ_g) por los conjugados C1, C2, C3 y C4 se estudió por un método indirecto en presencia de ABMM en los solventes agua y PBS. Se procedió experimentalmente de la misma manera que experiencias anteriores.

La descomposición de ABMM fotosensibilizada por cada uno de los conjugados se estudió irradiando la solución a intervalos de tiempo de 30 s en agua y 60 s en PBS ($\lambda_{\text{irr}}=455-800$ nm, región en la que sólo absorbe el conjugado). Dicha fotooxidación sigue una cinética de pseudo

primer orden a la longitud de onda 379 nm, con respecto a la concentración de ABMM. La Figura 39 a) y b) muestran las gráficas semilogarítmicas típicas que describen el progreso de la reacción estudiada, en agua y PBS, respectivamente. A partir de las pendientes de estos gráficos, se obtuvieron las constantes de velocidad observadas (k_{obs}^{ABMM} , Tabla 9) de cada uno de los conjugados y de la referencia TPPS⁴⁻.

Como puede observarse en la Figuras 51 a) y b), los conjugados descomponen al sustrato con una velocidad notablemente mayor que la porfirina de referencia. ABMM está sustituido por cuatro grupos ácido carboxílicos, los cuales pueden adquirir cargas negativas en el medio acuoso¹⁵¹. Estas cargas pueden interaccionar con los grupos amino de la periferia de las NP, facilitando una localización de la molécula prueba próxima a los centros de producción de O₂(¹Δ_g). Este efecto puede producir una descomposición más rápida del sustrato.

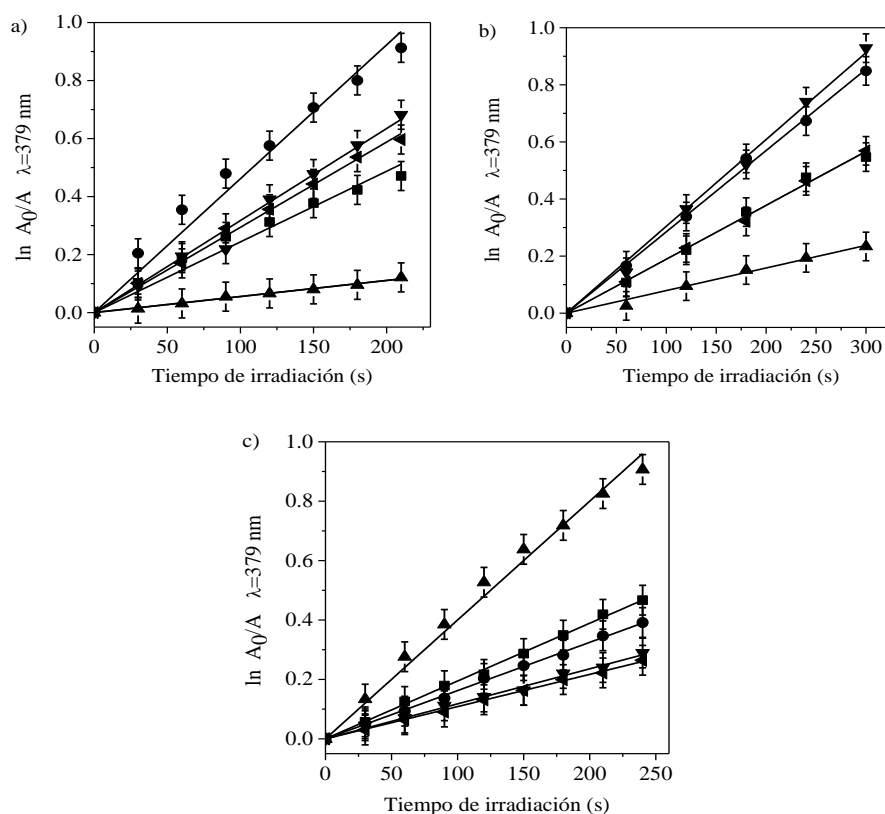


Figura 51. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de a) ABMM en agua (35 μM), $\Delta t_{\text{irr}} = 30$ s, b) ABMM en PBS (35 μM), $\Delta t_{\text{irr}} = 60$ s y c) DMA en DMF (35 μM), fotosensibilizada por C1 (■), C2 (●), C3 (◄), C4 (▼) y TPPS⁴⁻ (▲); $\lambda_{\text{irr}} = 455\text{-}800$ nm.

Con el fin de comparar esta tendencia, se estudió también la descomposición de DMA en el solvente orgánico DMF. Al igual que ABMM, el DMA desactiva $O_2(^1\Delta_g)$ principalmente por reacción química 4+2 para producir el endoperóxido ¹⁹⁵. Sin embargo, DMA no posee grupos capaces de generar cargas negativas, evitando así posibles interacciones electrostáticas con las NP. La fotooxidación de DMA se realizó de la misma manera que con el sustrato ABMM, con un intervalo de irradiación de 30 s (Figura 51 c). Estos resultados se utilizaron para calcular los valores de Φ_Δ producidos por los conjugados en DMF (Tabla 9) Los valores son considerablemente altos en comparación con otros PS químicamente unidos a un soporte, lo cual indica que F₂₀TPP se encuentra en un entorno con elevada actividad fotodinámica en la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ ¹⁹⁶.

Tabla 9. Parámetros cinéticos para la descomposición de sustratos ABMM y DMA (k_{obs}^{ABMM} , k_{obs}^{DMA}).

PS	k_{obs}^{ABMM} (s ⁻¹) en H ₂ O	k_{obs}^{ABMM} (s ⁻¹) en PBS	k_{obs}^{DMA} (s ⁻¹) en DMF	Φ_Δ (DMF)
C1	(2,4±0.3)x10 ⁻³	(1,9±0.2)x10 ⁻³	(1,9±0.2)x10 ⁻³	0,34±0,02
C2	(4,6±0.3)x10 ⁻³	(2,9±0.3)x10 ⁻³	(1,6±0.2)x10 ⁻³	0,29±0,02
C3	(2,9±0.3)x10 ⁻³	(1,9±0.2)x10 ⁻³	(1,0±0.2)x10 ⁻³	0,17±0,01
C4	(3,2±0.3)x10 ⁻³	(3,1±0.3)x10 ⁻³	(1,2±0.2)x10 ⁻³	0,21±0,01
TPPS ₄ ⁴	(5,5±0.5)x10 ⁻⁴	(7,8±0.5)x10 ⁻⁴	(4,0±0.5)x10 ⁻³	0,71±0,04

IV.5.4.2. Fotooxidación de L-triptófano

El efecto fotodinámico se analizó monitoreando la descomposición de Trp a través de la disminución en su emisión de fluorescencia a 350 nm en PBS, utilizando la misma concentración de los conjugados y la porfirina de referencia que con ABMM. La irradiación se realizó en $\lambda= 455-800$ nm, en intervalos de 3 min.

La fotodescomposición siguió una cinética de pseudo primer orden con respecto a la concentración de Trp. En la Figura 52 se observan las gráficas semilogarítmicas que describen el progreso de la reacción. A partir del ajuste lineal de estos gráficos, se calcularon los valores

de k_{obs}^{Trp} para la fotodescomposición de Trp sensibilizada por los conjugados C1, C2, C3, C4 y TPPS⁴⁻₄ (Tabla 10).

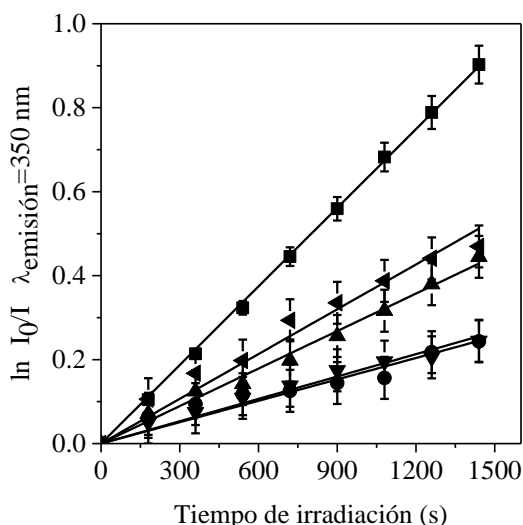


Figura 52. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de Trp en PBS (35 μ M), $\Delta t_{irr} = 180$ s, fotosensibilizada por C1 (■), C2 (●), C3 (◄), C4 (▼) y TPPS⁴⁻₄ (▲); $\lambda_{irr} = 455-800$ nm.

Debido a que la fotooxidación de ABMM y Trp sensibilizada por C1, C2, C3 y C4 se estudió en el mismo solvente (PBS) y se utilizó la misma fuente de irradiación ($\lambda = 455-800$ nm), se pueden comparar directamente las magnitudes de k_{obs}^{ABMM} y k_{obs}^{Trp} . Se observa que k_{obs}^{ABMM} es aproximadamente el doble del valor de k_{obs}^{Trp} . Como se describió anteriormente, ABMM reacciona químicamente de manera específica con $O_2(^1\Delta_g)$. Por lo tanto, la descomposición de Trp se debe al ataque del $O_2(^1\Delta_g)$, por un mecanismo de reacción del Tipo II. Utilizando ambos valores de k_{obs} se pudo determinar el valor de la constante de velocidad de reacción para Trp. De la misma forma que en la sección IV. 2.

Los valores de k_r^{Trp} obtenidos son un poco menores al encontrado para la fotooxidación de Trp inducida por $O_2(^1\Delta_g)$ en agua a pH=7 ($6,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)⁷⁰. Posiblemente esto se deba a la rápida descomposición de ABMM por la interacción con los conjugados, principalmente con C2 y C4, los cuales poseen cargas positivas implícitas. Sin embargo, puede afirmarse que la descomposición del aminoácido, inducida por C1, C2, C3 y C4, es principalmente producida por un fotoproceso Tipo II.

Como puede observarse en la Tabla 9 y en la Tabla 10, la actividad fotodinámica de la porfirina F₂₀TPP inmovilizada y modificada sobre las NP, se mantiene relativamente elevada.

Tabla 10. Parámetros cinéticos para la descomposición del sustrato Trp (k_{obs}^{Trp})

PS	k_{obs}^{Trp} (s⁻¹) en PBS	k_r^{Trp} (s⁻¹) en PBS
C1	(6,2±0.3)x10 ⁻⁴	(3,2±0,2)x10 ⁷
C2	(1,7±0.1)x10 ⁻⁴	(0,6±0,1)x10 ⁷
C3	(3,5±0.2)x10 ⁻⁴	(1,8±0,2)x10 ⁷
C4	(1,8±0.1)x10 ⁻⁴	(0,6±0,1)x10 ⁷
TPPS⁺₄	(3,0±0.2)x10 ⁻⁴	(3,8±0,2)x10 ⁷

IV.5.5. Estudios *in vitro*

IV.5.5.1. PDI de microorganismos en suspensiones celulares en PBS

Para el estudio de PDI se seleccionaron *C. albicans*, *E. coli* *S. aureus*. Las suspensiones celulares se trataron con los conjugados C1, C2, C3 y C4 (0,4 mg/ml, 10 nmol/mg, equivalente a ~ 2µM), los cuales presentaron actividad fotodinámica frente al sustrato DMA. Las NP magnéticas que no contienen PS unido (MNPSIN y MNPSIN⁺, 0,4 mg/ml) también se utilizaron para analizar su efecto en la PDI de microorganismos.

En estas condiciones, el conjugado C4 induce una inactivación fotodinámica mayor a 99,999% en *S. aureus* después de 15 min de irradiación, 99,999% en *E. coli* y de 99,96% en *C. albicans* después de 30 min de irradiación. Resultados casi idénticos se obtuvieron con las células tratadas con C2. Ambos conjugados resultaron considerablemente más efectivos que los conjugados sin cargas intrínsecas, C1 y C3 (Figura 53). Por otro lado, las suspensiones se trataron con los conjugados correspondientes y con MNPSIN y MNPSIN⁺ por 30 min a 37°C en oscuridad. Luego se las expuso a la luz visible, durante un tiempo de 30 min. Los experimentos de control ponen de manifiesto que la viabilidad celular no se vio afectada por la iluminación de las suspensiones celulares en ausencia del conjugado, ni por incubación del mismo en la oscuridad durante 30 min. Por lo tanto, la disminución de la viabilidad observada después de la irradiación de los cultivos tratados, se debe a la PDI de los agentes fotosensibilizadores.

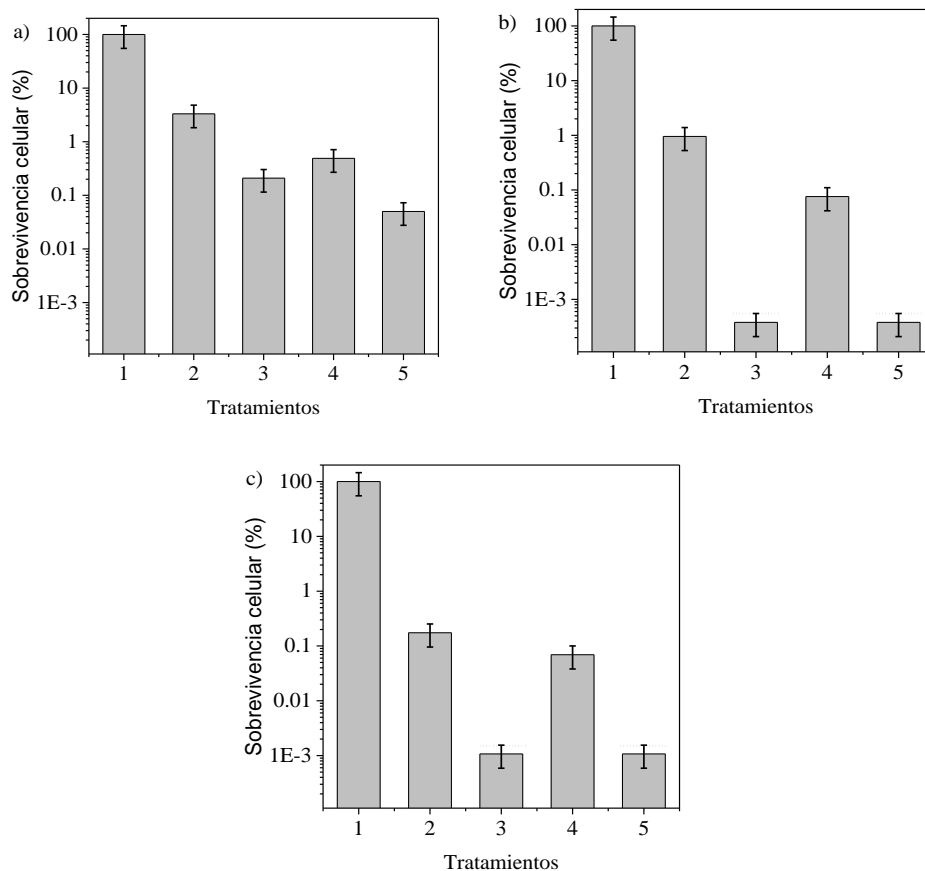


Figura 53. Sobrevivencia de a) *C. albicans*, b) *E. coli* y c) *S. aureus* tratadas con 0,4 mg, 2 μ M de porfirina en los conjugados (10 nmol/mg) y expuestas a irradiación con luz visible (90 mW/cm²) por 15 min para *S. aureus* y 30 min para *E. coli* y (C) *C. albicans*. Tratamiento 1) control de células irradiadas, 2) células incubadas con C1 e irradiadas, 3) células incubadas con C2 e irradiadas, 4) células incubadas con C3 e irradiadas y 5) células incubadas con C4 e irradiadas; (---) límite de detección.

IV.5.5.2. Reutilización del conjugado C4

Las suspensiones celulares de microorganismos en PBS se incubaron con C4 como se describió anteriormente. Luego de la exposición a la luz visible de los microorganismos en los tiempos correspondientes, se procedió a la recuperación de C4 por decantación magnética. Este procedimiento se repitió dos veces más, obteniendo como resultado el número de colonias contadas en cada etapa de recuperación. Los experimentos control de células tratadas con el conjugado sin irradiar ponen de manifiesto que la viabilidad celular no fue afectada. Las experiencias irradiadas muestran una disminución efectiva en la viabilidad celular de los tres

microorganismos tratados con C4 e irradiados por 30 min en *C. albicans* y *E. coli*, y 15 min en *S. aureus* (Figura 54).

Las experiencias muestran que la porfirina modificada *in situ* se mantiene unida a las NP magnéticas, luego de los lavados que se realizan para probar la reutilización del conjugado. Por lo tanto, C4 resultó ser efectivo para erradicar microorganismos luego de tres ciclos de reutilización.

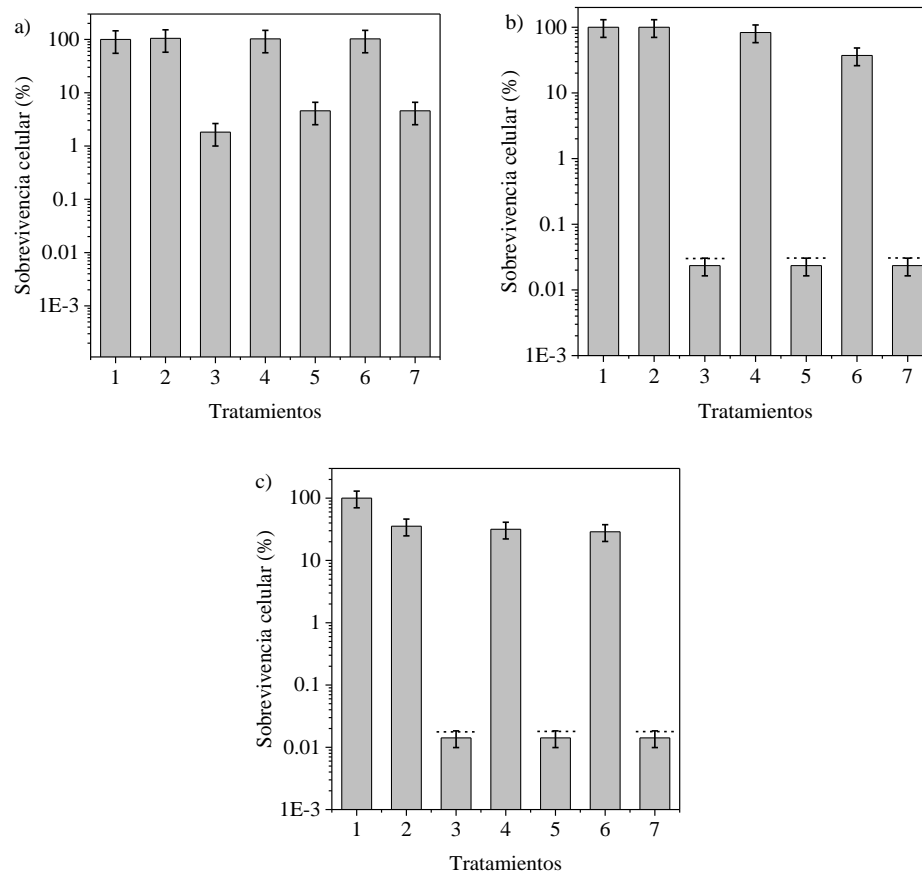


Figura 54. Estudios de reutilización de C4 en a) *C. albicans*, b) *E. coli* y c) *S. aureus* (200 μ l, $\sim 10^4$ UFC/ml) tratadas con 0,2 mg, 2 μ M de porfirina en el conjugado (10 nmol/mg) durante 30 min, a 37 °C en la oscuridad, con posterior exposición a la luz visible (30 min en a y b, 15 min en c). Experiencias: (1) control células irradiadas; (2) células con C4 en la oscuridad; (3) células con C4 expuestas a la luz visible; (4) nuevas células tratadas con C4 recuperado de (3) en oscuridad; (5) nuevas células tratadas con C4 recuperado de (3) e irradiadas (reutilización 1); (6) nuevas células tratadas con C4 recuperado de (5) en oscuridad; (7) nuevas células tratadas con C4 recuperado de (5) e irradiadas (reutilización 2); (---) límite de detección.

IV. 5. 5. 3. Microscopía de fluorescencia

Esta técnica se utilizó para observar el poder fotoinactivante en las bacterias *E. coli* y *S. aureus* por parte de los conjugados que fueron más efectivos en la PDI de estos microorganismos, C2 y C4 (3 μM de porfirina inmovilizada/mg de NP).

Las Figuras 55, 56, 58 y 60 muestran las fotografías de microscopía de fluorescencia de las células de ambas bacterias tratadas con los correspondientes conjugados y expuestas a irradiación. En todos los casos se utilizó yoduro de propidio (PI) como marcador fluorescente de muerte celular. Se muestran también los controles oscuridad, es decir, las células incubadas con los conjugados sin someterlas a irradiación con luz visible. En dichas Figuras se observa un alto porcentaje de muerte celular de ambas bacterias. Luego de 30 min de irradiación tanto C2 como C4 fueron muy efectivos en *E. coli*, provocando la muerte de todas las células. Mientras que en *S. aureus*, se necesitó para el mismo resultado, el mismo tiempo de irradiación utilizando C2, y 20 min con C4. Las Figuras 57 y 59 muestran los controles en oscuridad, es decir células tratadas con C2 y C4 sin irradiación, y células sin PS irradiadas, respectivamente. Dichas fotografías muestran que no hay muerte celular en ninguna de las condiciones nombradas.

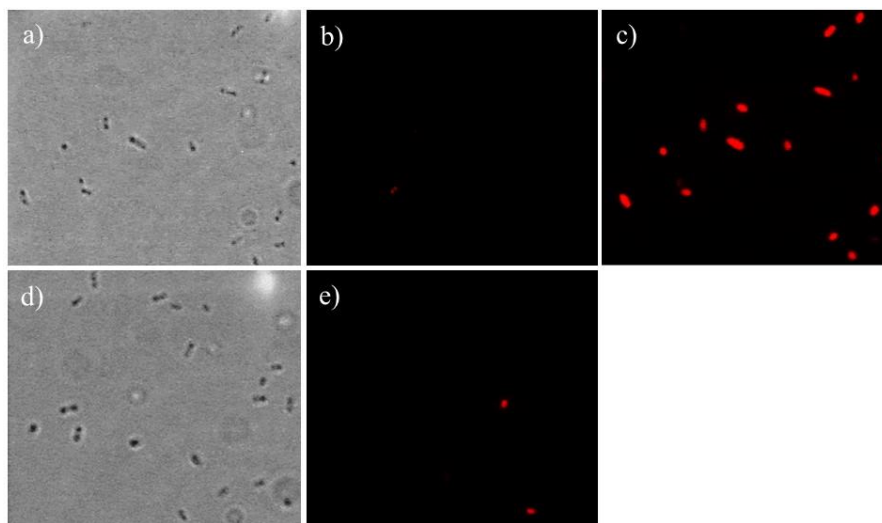


Figura 55. Imágenes microscópicas de *E. coli* incubadas por 20 min con C2 (3 μM) y PI (1 μM): a) campo claro, b) fluorescencia, antes de irradiar, c) luego de 30 min de irradiación (100x), d) imagen campo control oscuridad, e) fluorescencia del control oscuridad (50 min).

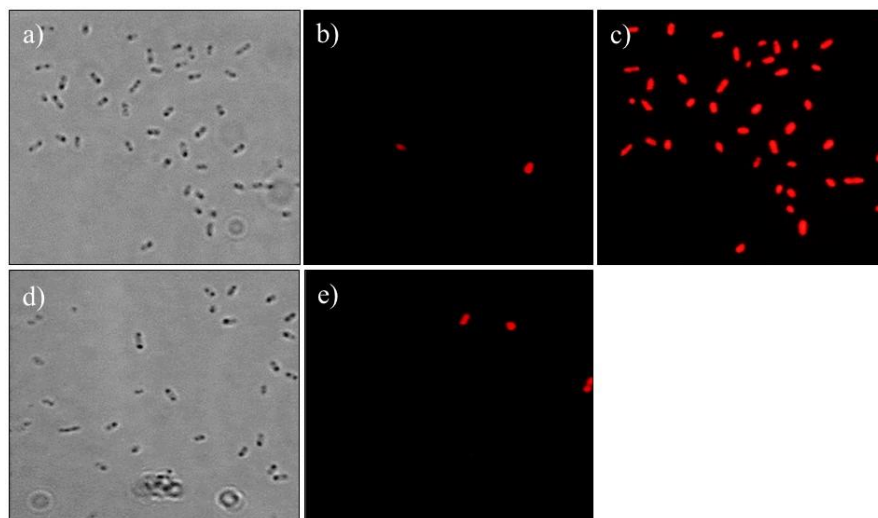


Figura 56. Imágenes microscópicas de *E. coli* incubadas por 20 min con C4 (3 μ M) y PI (1 μ M) a) campo claro, b) fluorescencia, antes de irradiar, c) luego de 30 min de irradiación (100x), d) imagen campo claro control oscuridad, e) fluorescencia del control oscuridad (50 min).

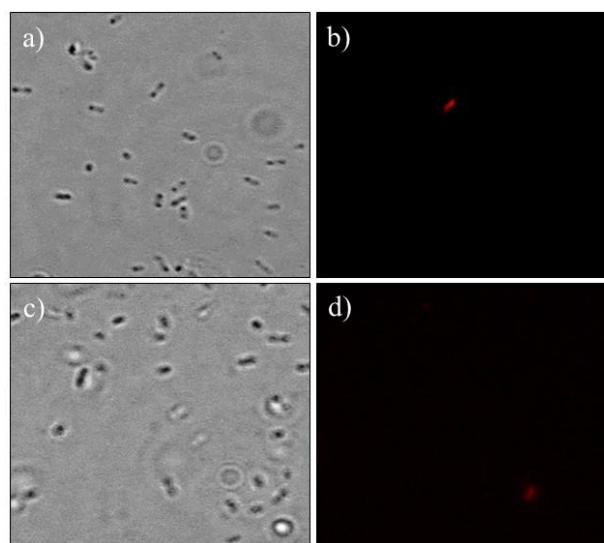


Figura 57. Imágenes microscópicas de *E. coli*: a) campo claro, b) fluorescencia, control irradiación (30 min), PI (1 μ M), c) campo claro, incubadas por 20 min con MNPSIN⁺ y PI (1 μ M), d) fluorescencia, incubadas por 20 min con MNPSIN⁺ e irradiadas 30 min.

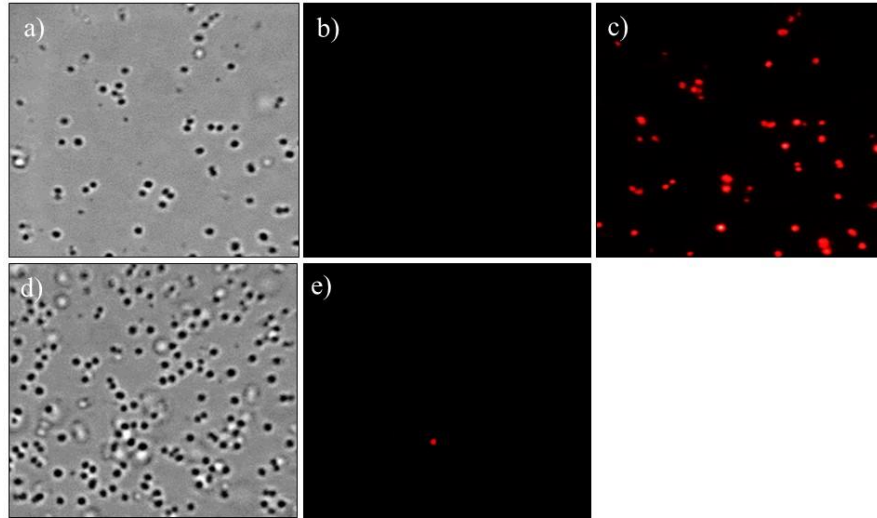


Figura 58. Imágenes microscópicas de *S. aureus* incubadas por 20 min con C2 (3 μ M) y PI (1 μ M): a) campo claro, b) fluorescencia, antes de irradiar, c) luego de 30 min de irradiación (100x), d) imagen campo claro control oscuridad, e) fluorescencia del control oscuridad (50 min).

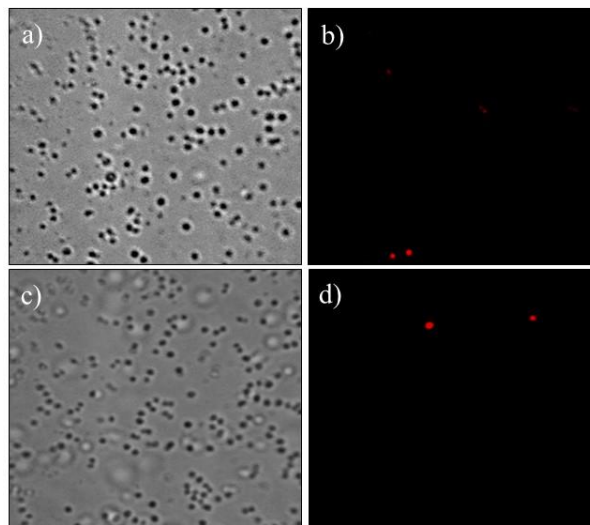


Figura 59. Imágenes microscópicas de *S. aureus* incubadas por 20 min con C4 (3 μ M) y PI (1 μ M): a) campo claro, b) fluorescencia, antes de irradiar, c) luego de 20 min de irradiación (100x), d) imagen campo claro control oscuridad, e) fluorescencia del control oscuridad (50 min).

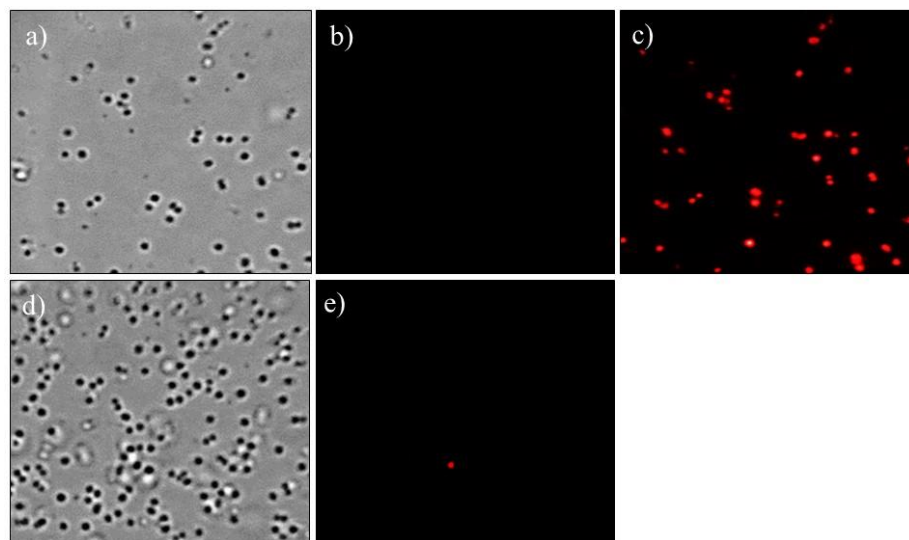


Figura 60. Imágenes microscópicas de *S. aureus* incubadas por 20 min con C4 (3 μM) y PI (1 μM): a) campo claro, b) fluorescencia, antes de irradiar, c) luego de 20 min de irradiación (100x), d) imagen campo claro control oscuridad, e) fluorescencia del control oscuridad (50 min).

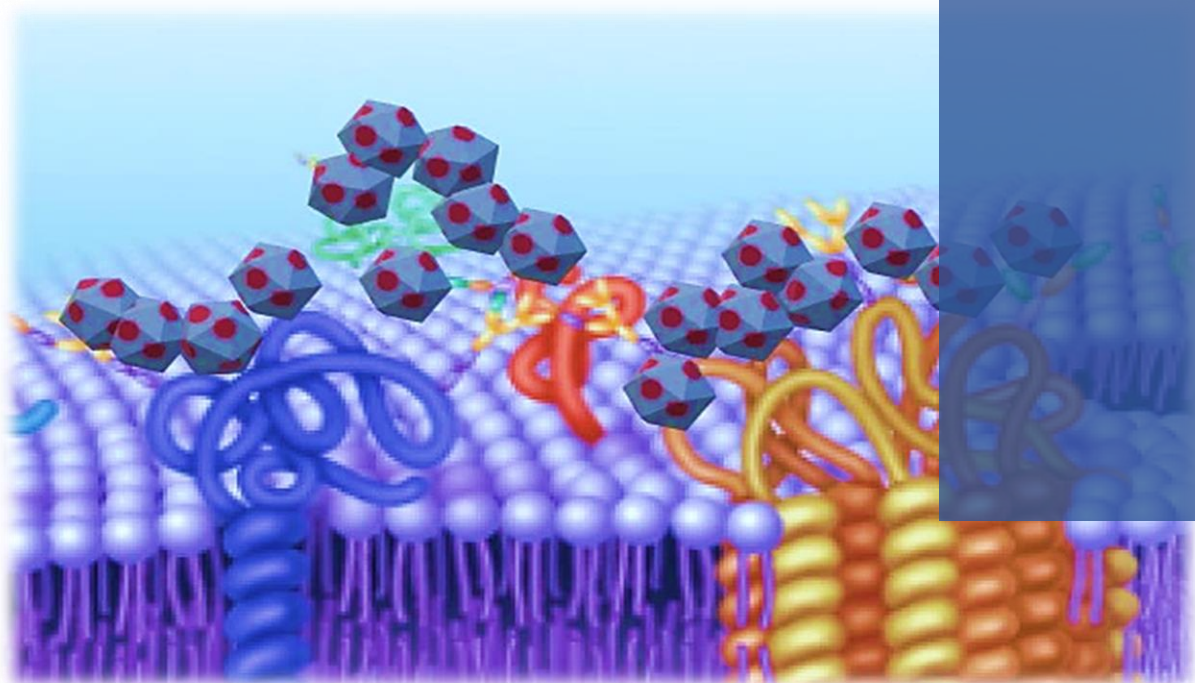
Los resultados muestran que se sintetizó el conjugado MNPSINH-F₁₉TPP, uniendo covalentemente a MNPSINH₂, con los grupos *perfluorofenilo* de la porfirina F₂₀TPP, mediante sustitución nucleofílica aromática (S_NAr) del grupo flúor en la posición *para*. Luego, fue posible adicionar otro grupo funcional a la porfirina F₂₀TPP una vez que se encontraba inmovilizada sobre las NP. Cada grupo *perfluorofenilo* libre en el conjugado MNPSIN-F₁₉TPP (C1), reaccionó con *N,N*-dimetiletanolamina, mediante S_NAr, funcionalizando así a la porfirina con grupos *etildimetilamino*, formando MNPSIN-F₁₆TPP -N (C3). La posterior metilación de ambos conjugados, permitió obtener MNPSIN⁺-F₁₆TPP-N (C2), con cargas implícitas en los grupos aminos de la periferia de las NP y MNPSIN⁺-F₁₆TPP-N⁺ (C4), con cargas implícitas en las NP y en la porfirina inmovilizada. La síntesis de estos conjugados presentó como principal ventaja la versatilidad y eficiencia de la reacción de S_NAr. Además, permite continuar con la funcionalización de la porfirina mediante la adición de grupos *amino*. Por otro lado, es posible la obtención pura de cada uno de los conjugados mediante los lavados por decantación magnética, y de esta manera seguir los pasos de síntesis.

Los espectros UV-visibles de cada uno de los conjugados corroboraron la unión química establecida entre la porfirina y las NP. Se observaron claramente las bandas correspondientes a F₂₀TPP inmovilizada, presentando en todos los casos, un corrimiento batocrómico respecto al

UV-visible de la TPPF₂₀ libre. La porfirina unida a las NP conserva la capacidad de emitir fluorescencia.

Por otro lado, la fotodescomposición del sustrato DMA en presencia de los diferentes conjugados, indicó una producción eficiente de O₂(¹Δ_g). Además, estudios en suspensiones de *S. aureus* en presencia de los diferentes conjugados, mostraron PDI a los 15 min de ser irradiadas con luz visible. El mismo efecto, en menor proporción se observó en *C. albicans*, luego de 30 min de irradiación. En ambos casos el conjugado MNPSIN⁺-TPPF₂₀-N⁺ resultó ser el más eficiente. Incluso C4 produjo una disminución importante en la viabilidad celular de la bacteria Gram negativa *E. coli*, luego de 30 min de irradiación.

*IV.6. Conjugados nanopartículas magnéticas-
BODIPYs*



Los derivados de boro dipirrometenos (BODIPYs) presentan interesantes aplicaciones biotecnológicas. Estos compuestos tienen una estructura similar a la mitad de una porfirina y, al igual que estas, se pueden obtener a partir de dipirrometanos. En particular, los BODIPYs absorben intensamente en la región central del espectro visible con rendimientos cuánticos de fluorescencia elevados. Así, estos compuestos pueden ser utilizados como fluoróforos y además, mediante la unión directa de átomos pesados al anillo *s*-indaceno, pueden transformarse en PS para aplicaciones fotodinámicas.¹⁹⁷ Por otro lado, a lo largo de este trabajo se ha demostrado que es posible conjugar PS a NP magnéticas funcionalizadas. En el presente subcapítulo se muestran los resultados de la síntesis de conjugados MNPSINH-BODIPY, estudios espectroscópicos, actividad fotodinámica, y capacidad fluorófora y fotoinactivante en las bacterias *S. aureus* y *E. coli*.

IV. 6. 1. Estructura y propiedades de los BODIPYs seleccionados para formar conjugados nanomagnéticos fluoróforos y fotoactivos

Debido a que se disponía de dos estructuras BODIPYs con propiedades espectroscópicas y fotoquímicas diferentes, se procedió a unir covalentemente dichos complejos a las MNPSINH₂ sintetizadas con anterioridad. En la Figura 61 se muestran los BODIPYs utilizados para dicha conjugación y la molécula usada como referencia.

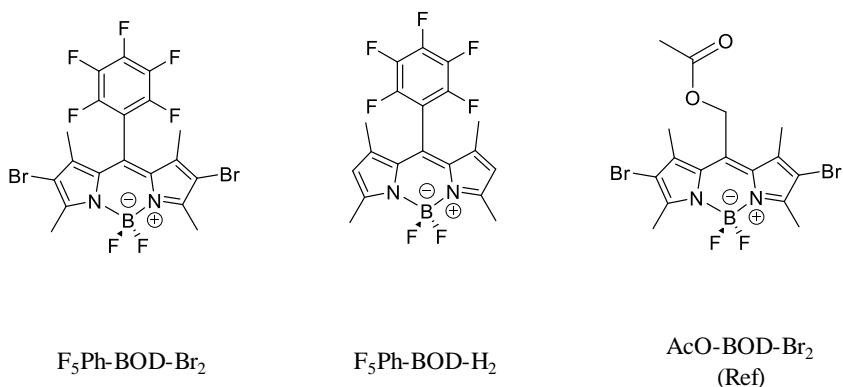


Figura 61. Estructura química de los BODIPYs

Los espectros de absorción de los compuestos F₅Ph-BOD-H₂ y F₅Ph-BOD-Br₂ se registraron en el solvente DMF (Figura 62 a). La banda de absorción principal de los BODIPYs fue atribuida a la banda vibratoria 0-0, correspondiente a una transición S₀-S₁, con alto valor de ε (10⁻⁵ M⁻¹.cm⁻¹), siendo el máximo de absorción de F₅Ph-BOD-H₂ en λ= 513 nm. La sustitución

del átomo de bromo en las posiciones 2 y 6, produjo un corrimiento batocrómico de 31 nm de dicha banda. Los espectros de absorción y emisión de fluorescencia (Figura 62 d) de ambas estructuras, son casi imágenes reflejadas entre sí, revelando que las especies que emiten son similares a las que absorben. La banda de emisión se atribuye a la banda vibratoria 0-0, correspondiente a la transición electrónica S_1-S_0 . Puede observarse que ambas estructuras producen una emisión de fluorescencia en el verde. En cuanto al rendimiento cuántico de fluorescencia, el valor disminuye considerablemente cuando el BODIPY es sustituido por átomos de bromo, y es atribuido al efecto del átomo pesado, el cual favorece el cruce entre sistemas (Tabla 11).

IV. 6. 2. Conjugación de las estructuras $F_5Ph-BOD-H_2$ y $F_5Ph-BOD-Br_2$ con $MNPSINH_2$

En la Figura 61 puede observarse a ambos BODIPYs sustituidos en la posición meso por un grupo perfluorofenilo. Aprovechando la capacidad de sustitución nucleofílica aromática que puede sufrir dicho grupo (como se mostró en IV. 4 y IV. 5), se procedió a la reacción de ambas estructuras con las $MNPSINH_2$, formando los conjugados $MNPSINH-F_4Ph-BOD-H_2$ y $MNPSINH-F_4Ph-BOD-Br_2$ (Figura 62). Dichos conjugados presentan espectros de absorción característicos de moléculas inmovilizadas en las NP (Figura 62 b y c). Puede observarse un corrimiento batocrómico en la banda de ambos BODIPYs, de 8 y 14 nm, correspondientemente. Por otro lado, la emisión de fluorescencia de $F_5Ph-BOD-H_2$ disminuye considerablemente en el conjugado respecto a cuando el BODIPY está en solución (Figura 62 d). Sin embargo, es un valor aceptable para utilizar como fluoróforo en medios biológicos.

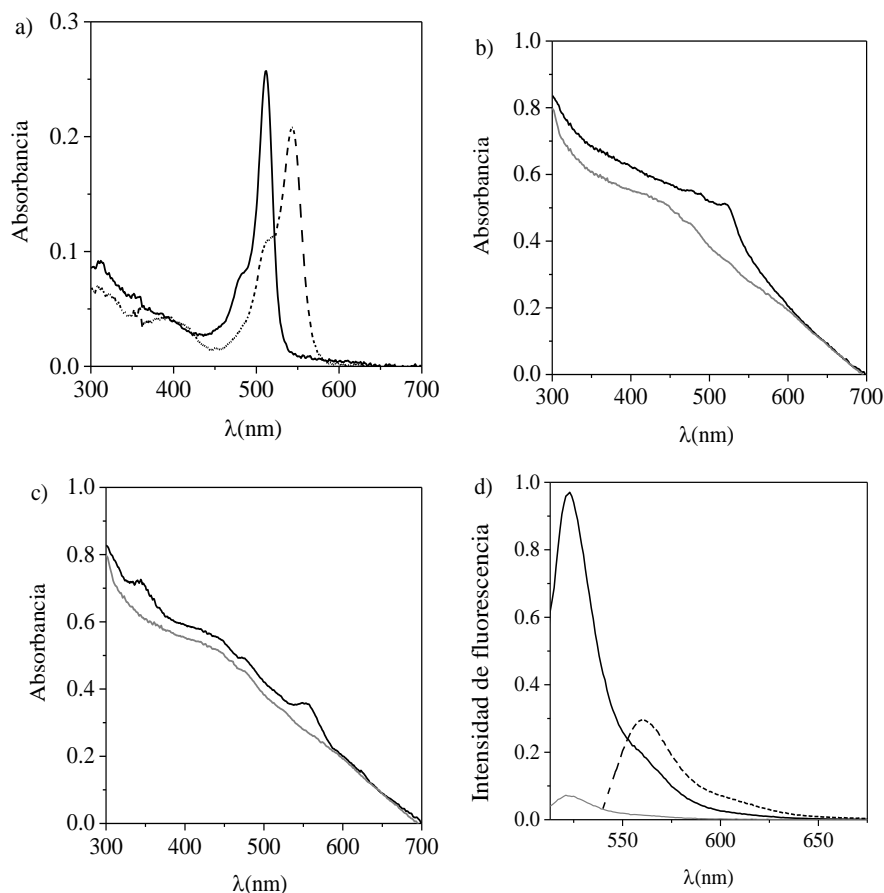


Figura 62. Espectros de absorción UV-vis de: (a) F₅Ph-BOD-H₂ (línea continua), F₅Ph-BOD-Br₂ (línea discontinua), (b) MNP-F₄Ph-BOD-H₂ (línea continua) y scattering de MNPSiNH₂ (línea gris) (c) MNP-F₄Ph-BOD-Br₂ (línea continua) y scattering de MNPSiNH₂ (línea gris). y (d) espectros de emisión de fluorescencia de F₅Ph-BOD-H₂ (línea continua), F₅Ph-BOD-Br₂ (línea discontinua) y MNP-F₄Ph-BOD-H₂ (línea gris). ($\lambda_{exc}=512$ nm).

Tabla 11. Parámetros espectroscópicos de BODIPYs y conjugados correspondientes en DMF

PS	$\lambda_{m\acute{a}x}^{abs}$	$\lambda_{m\acute{a}x}^{em}$	Φ_F
H ₂ -BOD-PhF ₅	512 nm	523 nm	0,98±0,05
Br ₂ -BOD-PhF ₅	543 nm	560 nm	0,17±0,02
MNP-F ₄ Ph-BOD-H ₂	520 nm	524 nm	0,18±0,02
MNP-F ₄ Ph-BOD-Br ₂	557 nm	-	-

En la siguiente Figura 63 se observa la fluorescencia verde del conjugado MNPSINH-F₄Ph-BOD-H₂, resuspendido en 2 ml de DMF. En el caso de MNPSINH-F₄Ph-BOD-Br₂, dicha fluorescencia no fue observada, como era de esperar.



Figura 63. Suspensión conjugado MNPSINH-F₄Ph-BOD-H₂. Irradiación UV de 254 nm (A). Sin irradiación (B).

IV. 6. 3. Fotooxidación de DMA: producción de O₂(¹Δ_g)

El valor del rendimiento cuántico de producción de O₂(¹Δ_g) se calculó mediante la fotooxidación de DMA que, como se dijo anteriormente, es un sustrato que desactiva a O₂(¹Δ_g) por reacción química exclusivamente. La descomposición DMA fotosensibilizada por los BODIPYs y respectivos conjugados se estudió en acetonitrilo (ACN). Las soluciones y suspensiones se irradiaron con luz verde (LED $\lambda_{\text{irr}}=510$ nm) en condiciones aeróbicas, como se muestra en la Figura 11 ii). La fotodegradación de DMA se siguió monitoreando su descomposición a partir de los espectros de absorción (Figura 64 a).

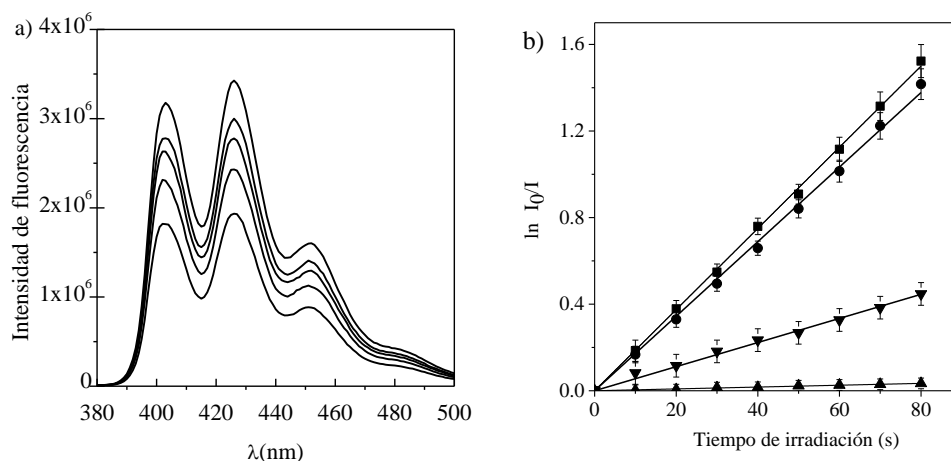


Figura 64. Fotooxidación de DMA (35 μM). a) Cambios en el espectro de absorción de DMA sensibilizado por MNP-F₄Ph-BOD-Br₂. b) Gráficos de primer orden para Br₂-BOD-OAc (Ref)(■), Br₂-BOD-PhF₅(●), MNP-F₄Ph-BOD-Br₂ (▼) y H₂-BOD-PhF₅(▲), en ACN. ($\lambda_{\text{irr}}=510$ nm), $\Delta t_{\text{irr}}=5$ min.

En la (Figura 64 b) se observa que la fotooxidación en todos los casos, sigue una cinética de pseudo primer orden con respecto a la concentración de DMA. A partir de los gráficos semilogarítmicos que describen el progreso de la fotodegradación de este sustrato, fueron calculados los valores de k_{obs} para cada BODIPY y su conjugado (Figura 64). Los valores de Φ_{Δ} en ACN, se calcularon comparando las pendientes de las rectas de descomposición de DMA mediada por los BODIPYs y conjugados, utilizando como referencia la molécula AcO-BOD-Br₂¹⁵⁰.

En la Tabla 12 puede observarse que el valor de Φ_{Δ} del BODIPY Br₂-BOD-PhF₅ disminuye a un poco más de la mitad su valor cuando se encuentra inmovilizado en las NP. Sin embargo, el valor es suficiente para generar daño celular, como se ha visto en otros PS inmovilizado sobre las mismas NP¹⁹⁸.

Tabla 12. Parámetros cinéticos para la descomposición de DMA en ACN

PS	K_{obs} (s ⁻¹)	Φ_{Δ}
Br ₂ -BOD-OAc (Ref)	(1,8±0,3)x10 ⁻²	0,79±0,04
Br ₂ -BOD-PhF ₅	(1,6±0,3)x10 ⁻²	0,70±0,04
H ₂ -BOD-PhF ₅	(5,1±0,2)x10 ⁻⁴	0,02±0,01
MNP-F ₄ Ph-BOD-Br ₂	(6,1±0,2)x10 ⁻³	0,27±0,03
MNP-F ₄ Ph-BOD-H ₂	-	-

IV. 6. 4. Inactivación fotodinámica de microorganismos

Los conjugados MNPSINH-F₄Ph-BOD-H₂ y MNPSINH-F₄Ph-BOD-Br₂ se evaluaron como agentes fotodinámicos in vitro utilizando las bacterias *S. aureus* y *E. coli*. La Figura 65 muestra las curvas de supervivencia de las células bacterianas tratadas con 0,5 mg (equivalente a 3 μM de BODIPY) de cada uno de los conjugados, luego de diferentes tiempos de irradiación (5 y 15 min en *S. aureus*, 15 y 30 min en *E. coli*). Los experimentos de control mostraron que la viabilidad de ambas bacterias no se vio afectada por la iluminación en ausencia de conjugados, ni tampoco por la incubación en la oscuridad con los mismos, lo que indica que la mortalidad celular resultante, después de la irradiación de los cultivos tratados con MNPSINH-F₄Ph-BOD-H₂ y MNPSINH-F₄Ph-BOD-Br₂, es debido al efecto de fotosensibilización del agente producido por la luz visible.

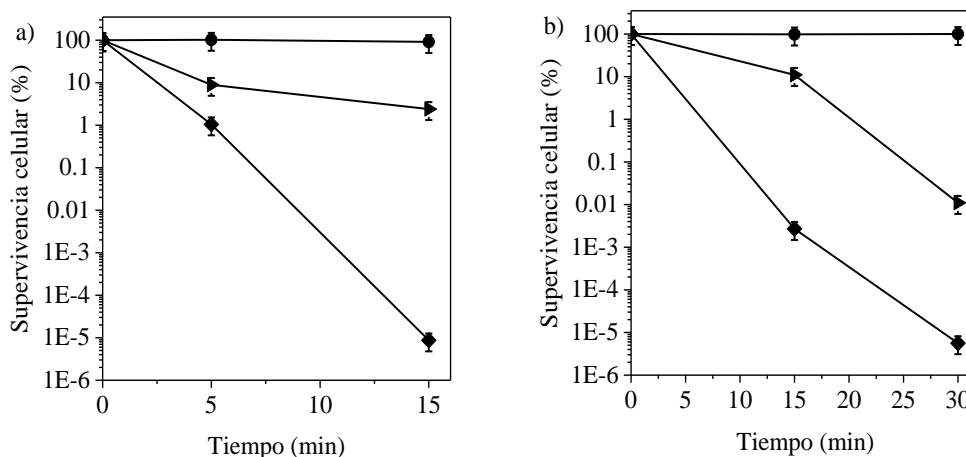


Figura 65. Curvas de supervivencia de a) *S. aureus* ($\sim 10^8$ UFC/ml) y b) *E. coli* ($\sim 10^8$ UFC/ml) tratadas con 0,5 mg (3 μ M de BODIPY inmovilizado) de MNPSINH-F₄Ph-BOD-H₂ (▶) y MNPSINH-F₄Ph-BOD-Br₂ (◆), incubadas 30 min a 37 °C en oscuridad y posteriormente irradiadas por diferentes tiempos con luz visible. Cultivo control: células sin PS e irradiadas (●).

Como puede observarse en la Figura 65, ambos conjugados mostraron efecto fotoinactivante en *S. aureus* y *E. coli*. Sin embargo, como era de esperar, el conjugado que contiene el BODPY bromado, resultó ser mucho más eficiente en la disminución de la viabilidad celular de ambos microorganismos. Luego de un corto tiempo de irradiación de 5 min en *S. aureus*, MNPSINH-F₄Ph-BOD-Br₂ produjo una disminución del 99 % de la supervivencia celular, mientras que a los 15 min, la inactivación fue completa (>99,9999%). En *E. coli*, una de las bacterias más resistente y difícil de erradicar, MNPSINH-F₄Ph-BOD-Br₂ redujo su viabilidad celular por completo (>99,9999%) luego de 30 min de irradiación, un tiempo más prolongado que para *S. aureus*. Sin embargo, la fotoinactivación producida por este conjugado fue considerable aún después de 15 min de irradiación (>99,99 %). Por otro lado, MNPSINH-F₄Ph-BOD-H₂ produjo una importante disminución en la supervivencia celular de *E. coli*, luego de 30 min de irradiación ($\sim 99,99\%$). Posiblemente la estructura del conjugado tenga una interacción mayor con la bacteria Gram negativa que con la positiva, debido a la densidad de carga negativa en la envoltura celular. Este efecto podría aumentar el efecto fotodinámico en el microentorno celular.

IV. 6. 5. Microscopía de fluorescencia

Esta técnica se utilizó para observar el poder fotoinactivante en las bacterias *E. coli* y *S. aureus* por parte de los conjugados MNPSINH-F₄Ph-BOD-H₂ y MNPSINH-F₄Ph-BOD-Br₂. Para ello, se utilizó un filtro azul ($\lambda_{exc} = 410-500$ nm, 0,4 mW/cm²) y la emisión se observó en el rojo ($\lambda_{em} = 620-670$ nm).

Por otro lado, se analizó la utilización del conjugado MNPSINH-F₄Ph-BOD-H₂ como marcador celular fluorescente ($\lambda_{em} > 530$ nm).

Las Figuras 66 a 69 muestran las fotografías de microscopía de fluorescencia de las células de ambas bacterias tratadas con los correspondientes conjugados y expuestas a irradiación. La muerte celular se determinó usando PI como indicador fluorescente rojo. Se muestran también los controles oscuridad, es decir, las células incubadas con los conjugados sin someterlas a irradiación con luz visible. En dichas Figuras se observa un alto porcentaje de muerte celular de ambas bacterias. Luego 10 min de irradiación con el conjugado MNPSINH-F₄Ph-BOD-Br₂ se produjo la muerte de todas las células *S. aureus*, mientras que se necesitó un tiempo mucho más prolongado de irradiación, 120 min, para producir la misma muerte en *E. coli*. Por su parte, MNPSINH-F₄Ph-BOD-H₂ sólo muestra poder citotóxico en *S. aureus*, luego de 25 min de irradiación y se comporta como un excelente marcador fluorescente de dicha bacteria (Figura 70). No se observó marcación fluorescente en células de *E. coli*, por parte del conjugado MNPSINH-F₄Ph-BOD-H₂

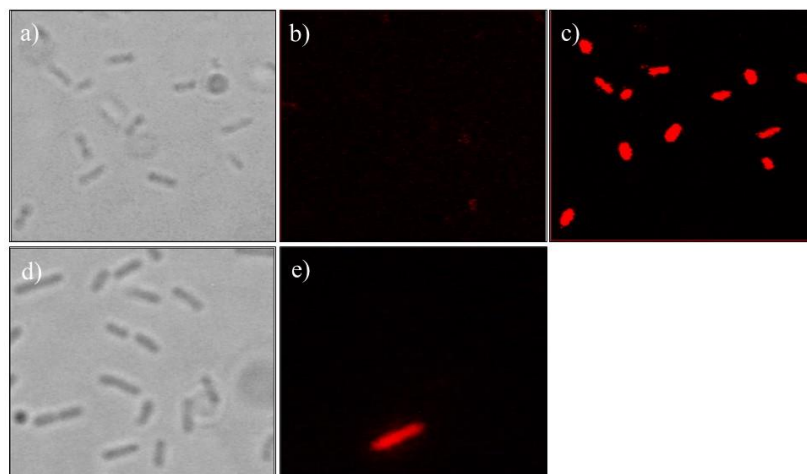


Figura 66. Imágenes microscópicas de *E. coli* incubadas por 30 min con MNP-F₄Ph-BOD-Br₂ (3 μ M) y PI (1 μ M): a) campo claro, b) fluorescencia, antes de irradiar, c) luego de 120 min de irradiación (100x), d) imagen campo claro control oscuridad, e) fluorescencia del control oscuridad (130 min).

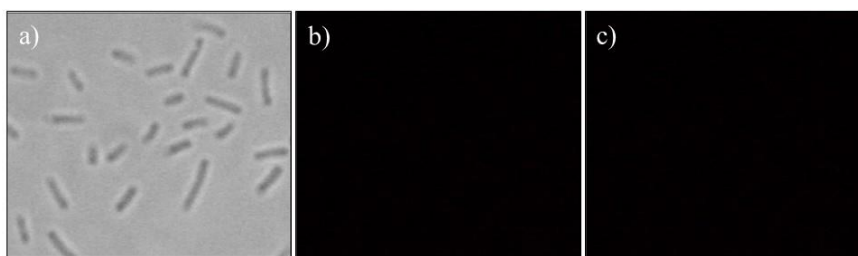


Figura 67. Imágenes microscópicas de *E. coli* incubadas por 30 min con MNP-F₄Ph-BOD-H₂ (3 μ M) y PI (1 μ M): a) campo claro, b) fluorescencia, antes de irradiar, c) luego de 120 min de irradiación (100x).

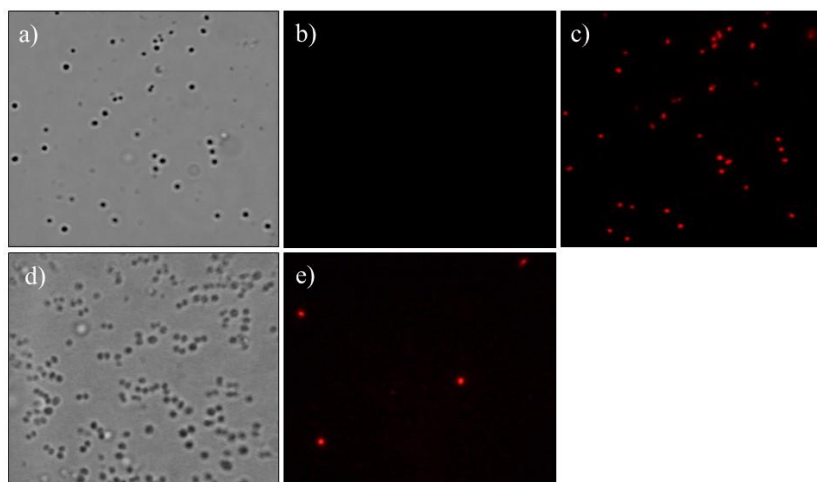


Figura 68. Imágenes microscópicas de *S. aureus* incubadas por 30 min con MNP-F₄Ph-BOD-H₂ (3 μM) y PI (1 μM): a) campo claro, b) fluorescencia, antes de irradiar, c) luego de 25 min de irradiación (100x), e) fluorescencia del control oscuridad (30 min), respecto a la imagen campo claro d).

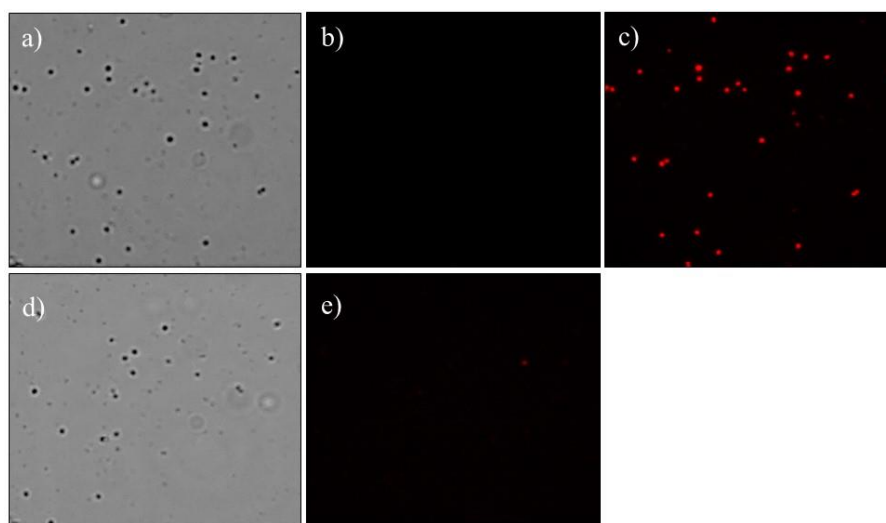


Figura 69. Imágenes microscópicas de *S. aureus* incubadas por 30 min con MNP-F₄Ph-BOD-Br₂ (3 μM) y PI (1 μM): a) campo claro, b) fluorescencia, antes de irradiar, c) luego de 10 min de irradiación (100x), e) fluorescencia del control oscuridad (15 min), respecto a la imagen campo claro d).

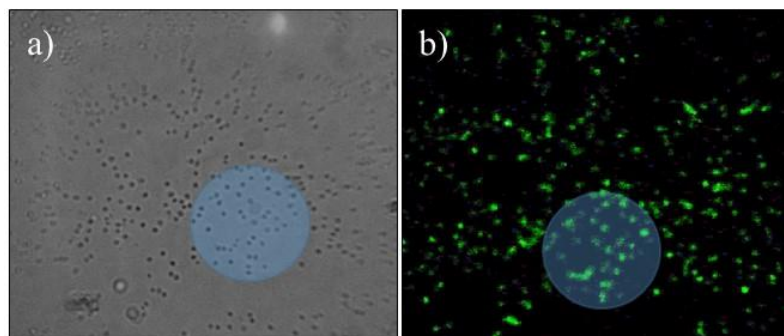
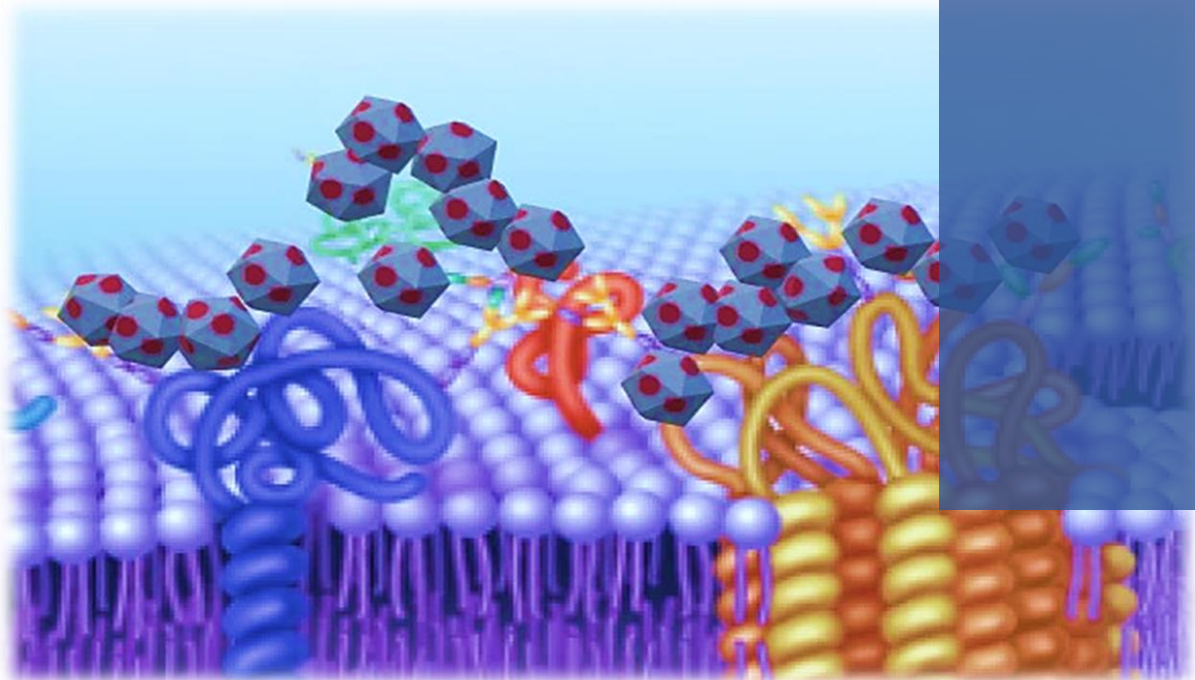


Figura 70. Imágenes microscópicas de *S. aureus* incubadas por 30 min con MNPSINH-F₄Ph-BOD-H₂: a) campo claro, b) fluorescencia, antes de irradiar

Si bien el valor del Φ_F para el conjugado MNPSINH-F₄Ph-BOD-H₂ es considerablemente más bajo que para el F₅Ph-BOD-H₂ en solución, este conjugado sigue siendo un muy buen fluoróforo. Tal es así que, la fluorescencia verde del conjugado MNPSINH-F₄Ph-BOD-H₂ puede observarse a simple vista en una celda irradiada con luz UV, mientras que no ocurre lo mismo con el BODIPY bromado. A diferencia del conjugado sin bromo, MNPSINH-F₄Ph-BOD-Br₂ mostró una actividad fotodinámica elevada en solución. Por otro lado, los resultados obtenidos *in vitro* en *S. aureus* y *E. coli* muestran que el conjugado MNPSINH-F₄Ph-BOD-Br₂ se comporta preferentemente como un PS efectivo para inactivar ambos microorganismos, mientras que MNPSINH-F₄Ph-BOD-H₂ presenta propiedades como marcador fluorescente de las células vivas. De esta manera fue posible obtener dos conjugados de BODIPY unidos a NP magnéticas, de los cuales MNPSINH-F₄Ph-BOD-H₂ puede ser utilizado como fluoróforo marcador de microorganismos sin producir daños significativos en las células a tiempos cortos de irradiación. En contraste, MNPSINH-F₄Ph-BOD-Br₂ puede ser aplicado para la erradicación de bacterias mediante el efecto citotóxico producido por la acción fotodinámica del BODIPY bromado inmovilizado en las NP.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES



CAPÍTULO V

IV. CONCLUSIONES

Puntualmente, la síntesis de las NP magnéticas es uno de los factores que influye en el desarrollo de un proceso adecuado de PDI de microorganismos. Esto es debido a que las NP deben cumplir un conjunto de condiciones respecto al tamaño y estabilidad para un uso adecuado en la PDI. Inicialmente, se sintetizaron NP magnéticas de Fe_3O_4 (MNP) con un diámetro de aproximadamente 15 nm. Luego, se funcionalizaron con grupos amino, mediante los cuales se unió la porfirina tetraácida para conformar el conjugado MNPNH-TCPP. Estudios espectroscópicos mostraron evidencia de la porfirina inmovilizada sobre las NP. Por otro lado, la descomposición de sustratos fotooxidables indicaron una producción eficiente de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Además, estudios en microorganismos mostraron una PDI relevante. Los resultados indican que una porfirina inmovilizada sobre NP magnéticas puede ofrecer importantes ventajas con respecto a PS inmovilizados sobre partículas clásicas, basadas en polímeros, por ejemplo, debido a la separación fácil y rápida, al aplicar un campo magnético externo. Sin embargo, la reutilización de MNPNH-TCPP en la PDI de los microorganismos puso en evidencia la inestabilidad de dicho conjugado nanoimán-porfirina. TCPP se desprende de las NP magnéticas, por lo que la PDI de microorganismos sólo es eficiente cuando se utiliza el conjugado por primera vez. Esto infiere que MNPNH-TCPP no puede ser reutilizado, lo cual implica que el PS se recupere, pero no se recicle.

Debido a que uno de los principales enfoques de este trabajo es el aporte de herramientas para el desarrollo sustentable de tecnologías adecuadas a la erradicación de microorganismos, se procedió con la síntesis de nuevos conjugados. A diferencia de los anteriores, en éstos, el núcleo magnético se encuentra estabilizado con una delgada capa de sílica, pretendiendo aportar estabilidad al mismo. El conjugado MNPSINH-TCPP fue caracterizado y estudiado de la misma manera que MNPNH-TCPP, mostrando características espectroscópicas y propiedades fotoquímicas similares a las de MNPNH-TCPP. En cuanto a la PDI de microorganismos, se observó que la TCPP inmovilizada en las NP estabilizadas es eficiente, de manera similar a la TCPP inmovilizada en las NP sin sílica. Sin embargo, a diferencia de MNPNH-TCPP, el estudio de reutilización de MNPSINH-TCPP mostró que el conjugado puede reciclarse, siendo utilizado

CONCLUSIONES

hasta, al menos, en tres ciclos de PDI. Esto fue posible debido a la estabilización del núcleo Fe_3O_4 aportado por la capa de sílica.

Luego de optimizar el soporte sobre el cual se inmovilizó la porfirina tetraácida, se procedió con las síntesis y estudios de porfirinas *meso*-sustituidas asimétricamente, con grupos amino y perfluorofenilo en la periferia del macrociclo. El interés se basó principalmente en el diseño de porfirinas con simetría A_3B , con el propósito de generar un eje de polaridad intramolecular y, por otro lado, aportar carácter anfifílico, a través del grupo altamente lipofílico perfluorofenilo. Los estudios espectroscópicos indicaron que en solución de DMF, las porfirinas $F_5\text{APP}$ y $F_{10}\text{APP}$ se encuentran disueltas en estado monomérico y que pueden ser detectadas por fluorescencia una vez incorporadas en el microentorno celular. Además, ambos PS presentan una importante actividad fotodinámica. En $F_5\text{APP}$ y $F_{10}\text{APP}$, los grupos amino en la periferia del macrociclo pueden adquirir cargas positivas a pH fisiológico. Además, los centros catiónicos están aislados del anillo de la porfirina por un puente alifático, el cual proporciona una mayor movilidad de la carga. Por lo tanto, $F_5\text{APP}$ y $F_{10}\text{APP}$ ofrecen una arquitectura molecular prometedora con aplicaciones potenciales en PDI de células microbianas. Los resultados indican que $F_5\text{APP}$ resulta ser más eficiente en la disminución de la viabilidad celular que $F_{10}\text{APP}$. Esto tiene influencia directa con la estructura de $F_5\text{APP}$, lo que le permite interaccionar fuertemente con las células microbianas. Por otro lado, se estudió el mecanismo de acción en PDI de dichas porfirinas, arrojando resultados que indican una contribución de ambos mecanismos en la PDI, con una mayor preponderancia del Tipo II, de producción de $\text{O}_2(^1\Delta\text{g})$.

El énfasis en el estudio y caracterización de A_3B y $ABAB$ se debió a la posibilidad de anclar dicha porfirina a las NP magnéticas, a través del sustituyente perfluorofenilo. Por lo tanto, se procedió a la síntesis de los conjugados $\text{MNPSINH-F}_4\text{APP}$ y $\text{MNPSINH-F}_9\text{APP}$. Los resultados de PDI con *S. aureus* muestran que el conjugado $\text{MNPSINH-F}_4\text{TTP}$ afecta a la viabilidad celular reduciéndola considerablemente la sobrevivencia celular, mientras que $\text{MNPSINH-F}_9\text{APP}$ fue menos efectivo en la inactivación de *S. aureus*.

A diferencia de los conjugados con la porfirina tetraácida, los cuales contienen enlaces amida, los conjugados $\text{MNPSINH-F}_4\text{APP}$ y $\text{MNPSINH-F}_9\text{APP}$ contienen mayor cantidad de porfirina inmovilizada por miligramo de NP. Esto puede deberse a la mayor eficiencia de la reacción de sustitución nucleofílica aromática que ocurre entre $F_5\text{APP}$ y $F_{10}\text{APP}$ con MNPSINH_2 . Este

CONCLUSIONES

resultado es destacable desde el punto de vista sustentable, ya que por esta reacción es posible inmovilizar mayor cantidad de porfirina por miligramo de NP. Además, la reacción de sustitución nucleofílica aromática resulta “más limpia” debido a que no utiliza otros reactivos que puedan dejar desechos.

Si bien la porfirina A₃B fue muy efectiva para la PDI de microorganismos, la síntesis y el proceso de purificación de la misma permite obtener rendimientos muy bajos para la conjugación con las NP magnéticas. Sin embargo, estos estudios motivaron el uso de una porfirina sustituida por grupos perfluorofenilo para su posterior modificación *in situ* sobre las NP.

A partir de la porfirina F₂₀TPP y MNPSINH₂ fue posible sintetizar cuatro conjugados. Partiendo del compuesto neutro MNPSINH-F₁₉TPP (C1) y con las correspondientes modificaciones *in situ*, se obtuvo otro conjugado neutro, MNPSINH-F₁₆TPP-N (C3), y los dos catiónicos MNPSIN⁺-F₁₆TPP (C2) y MNPSIN⁺-F₁₆TPP-N⁺ (C4). Estudios espectroscópicos y de actividad fotodinámica mostraron leves diferencias entre ellos. Sin embargo, la PDI de microorganismos fue marcadamente más eficiente cuando se utilizó el conjugado catiónico C4. Este resultado que se corresponde directamente con la estructura de C4, en el cual hay cargas implícitas en los grupos amino de la periferia de las NP y de los unidos al macrociclo tetrapirrólico. Por otro lado, la síntesis de estos conjugados presentó como principal ventaja la versatilidad y eficiencia de la reacción de sustitución nucleofílica aromática, utilizada en dos pasos de la modificación *in situ*, permitiendo funcionalizar la porfirina inmovilizada. Es importante destacar, además, la facilidad con la que se purifican los conjugados obtenidos en cada paso por decantación magnética. Esto permite mantener prácticamente constante la cantidad de NP en todos los pasos de reacción, y obtener así, la misma concentración de porfirina por miligramo de NP magnética en todos los conjugados.

Por otro lado, el uso de BODIPYs, con estructuras basadas en la mitad del macrociclo tetrapirrólico, centraron nuestra atención debido a un proceso simple de síntesis y purificación. Lo atractivo de estas estructuras es que pueden utilizarse como fluoróforos y PS. Por esta razón, se sintetizaron los conjugados MNPSINH-F₄Ph-BOD-H₂ y MNPSINH-F₄Ph-BOD-Br₂. Estudios espectroscópicos y de actividad fotodinámica muestran que el conjugado que contiene el BODIPY bromado tiene una producción eficiente de O₂(¹Δ_g), mientras que MNPSINH-F₄Ph-

CONCLUSIONES

BOD-H₂ presenta un valor de rendimiento cuántico de fluorescencia suficiente para ser utilizado como marcador celular. Dichas propiedades se corroboraron mediante estudios de PDI con bacterias.

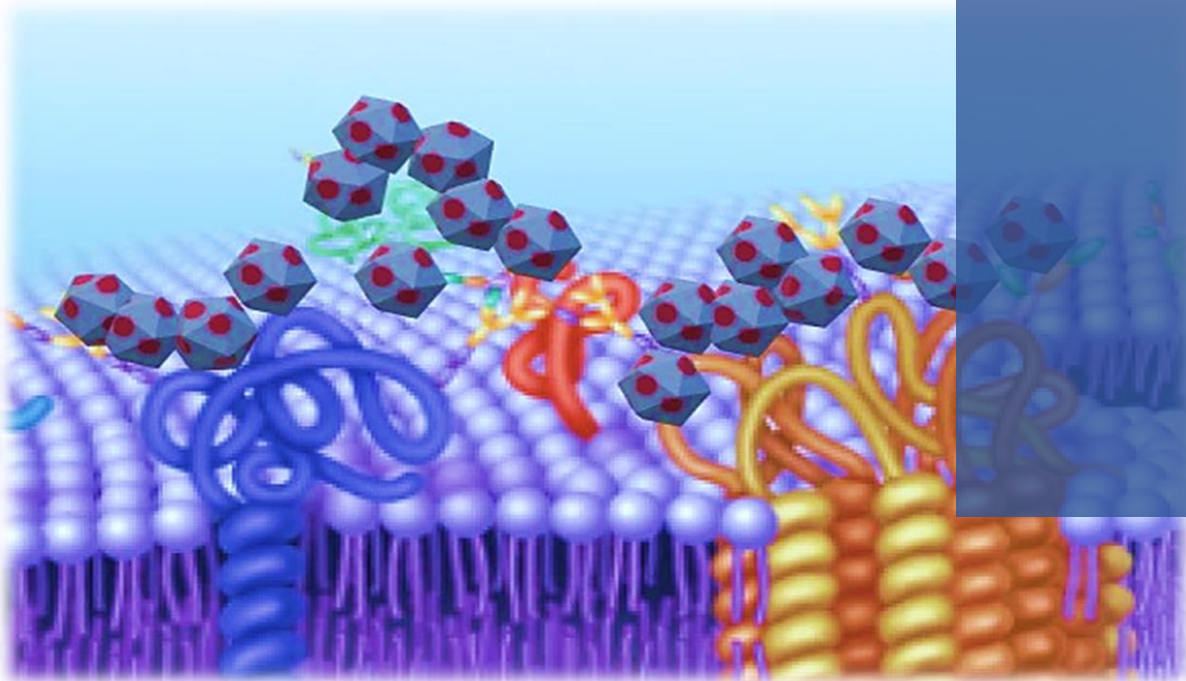
Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis muestran que los conjugados nanoimanes-porfirina (o BODIPY) ofrecen como ventajas:

- La posibilidad de modificación *in situ* de macromoléculas inmovilizadas en las NP magnéticas.
- La utilización de luz visible para la erradicación de microorganismos.
- La inactivación efectiva de los microbios junto con la posibilidad de optimizar la estructura nanoimán-porfirina o BODIPY, con el fin de mejorar la interacción con la envoltura de células patógenas.
- La facilidad con que el conjugado se recupera del medio una vez finalizado el proceso por medio de un campo magnético externo.
- La reutilización del conjugado, evitando producir contaminación del medio tratado.
- La posibilidad de localizar el tratamiento, dirigiendo el conjugado al sitio de interés mediante un imán.
- Los conjugados nanoimanes-BODIPY en particular, brindan la posibilidad de marcar las células patógenas, debido a la capacidad fluorescente, o de inactivarlas mediante la acción fotodinámica dependiendo del BODIPY inmovilizado.

CAPITULO VI

REFERENCIAS

BIBLIOGRÁFICAS



CAPÍTULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Sixty-eight World Health Assembly. *Global action plan on antimicrobial resistance* **2015**, <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>.
2. Stefani S., G. A., *Int. J. Infect. Dis.* **2010**, *14*, 19.
3. Liu, Y.-Y., Wang Y., Walsh T. , *Lancet Infect Dis.* **2016**, *16* (2), 161.
4. C., G. Q., *Infectio* **2010**, *14* (S2), S172.
5. Referencia, L. N. d., Resistencia a los antimicrobianos: causas, consecuencias y perspectivas en Argentina. **2014**, http://186.33.221.24/medicamentos//files/Resistencia_antimicrobiana_en_Argentina.pdf.
6. Hamblin M. R., H. T., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*(5), 436.
7. Chiosis G., B. I., *Science* **2001**, *293*, 1484.
8. Sulakvelidze A., A. A. Z., Morris J. G., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 649.
9. Cleveland J., M. T. J., Nes I. F., Chikindas, M. L., *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *71*, 1.
10. Nigam A., G. D., Sharma A., *Microbiol. Res.* **2014**, *169*, 643.
11. Taylor, P. W. S., P. D.; Luzio, J. P., *Drug Discov. Tod.* **2002**, *7*, 1086.
12. Hamblin MR, H. T., *Photochem Photobiol Sci* **2004**, *3*, 436.
13. T., M., *Mini Rev. Med. Chem.* **2009**, *9*, 947.
14. Tang H.M., H. M. R., Yow C.M. , *J Infect Chemother* **2007**, *13*, 87.
15. Carvalho, C. M. B. G., A. T. P. C.; Fernandes, S. C. D.; Prata, A. C. B.; Almeida, J. *Photochem. Photobiol.* **2007**, *88*, 112-118.
16. Oliveira, A. A., A.; Carvalho, C. M. B.; Tome´ , J. P. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Tome´ , A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A., *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *106*, 1986.
17. Kuznetsova, N. A. M., D. A.; Kaliya, O. L.; Vorozhtsov, G. N., *J. Hazard. Mater.* **2007**, *146*, 487.
18. Arad, O., Gavaldá, A., Rey, O., Rubio, N., Sánchez-García, D., Borrell, J., Teixidó, J., Nonell, S., Cañete, M., Juarranz, A., Villanueva, A., Stockert, J., Díaz Jiménez, P. , *Afinidad* **2002**, *59*.
19. Bonnett, R., *Gord. and Br. Sc. Pub.* **2000**.
20. Spikes, J. D., *Photochem. Photobiol* **1997**, *47*, 5.
21. Raab, O., *Zeit für Biol.* **1990**, *39*, 524.
22. A. Jesionek, H. v. T., *Munch. Med. Wschr* **1903**, *47*, 2042.
23. Tappeiner H., J. A., *Dtsch. Arch. Klin. Med.* **1904**, *80*, 427.
24. Diamond I., G. S., McDonagh A., *Lancet* **1972**, *2*, 1175.
25. Kelly J. F., S. M. E., *J. Urol.* **1976**, *115*, 150.
26. Dougherty, T. J. G., C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Peng, Q., *J. Natl. Cancer I.* **1998**, *90* (12), 889.
27. Levy, J. G. O., M., *Photochem. Photobiol* **1996**, *64* (5), 737.
28. Castano, A. D., T.; Hamblin, M. R., *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2004**, *1*, 279.
29. L. L.; Espada, J.; Cañete M., S. J. C. J. A. V. A. N. S. H. R. W. S. A. T. D. E. N. R. V. C., *Curr. Topics Pharmacol* **2004**, *8*, 185.
30. Bechet D., M. S., Guillemin F., Barberi-Heyob M, *Cancer Treat. Rev* **2014**, *40*, 229.
31. Gayathri D., C. T., Abraham A., *Photodiag. Photodyn. Ther* **2013**, *10*, 510.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

32. Bozzini G., C. P., Betrouni N., Maurage C., Leroy X., Simonin S., Martin-Schmitt C., Villers A., Mordon S, *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2013**, *10*, 296.
33. Yangyan X., X. G., Pingbo O., *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2013**, *10*, 644.
34. Rebeiz C. A., M.-Z. A., Hopen H. J., Wu S. M., *Enzyme Microb. Tech* **1984**, *6*, 390.
35. Nandihalli U. B., R. C. A., *Pestic. Biochem. Phys* **1991**, *40*, 27.
36. Rebeiz C. A., J. J. A., Rebeiz C. C., *Pestic. Biochem. Phys* **1988**, *30*, 11.
37. Ben Amor T., J. G., *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2000**, *30*, 915.
38. Rebeiz C. A., J. J. A., Rebeiz C. C., *J. Photochem. Photobiol. B: Biol* **1993**, *18*, 97.
39. Ringot C., S. V., Barriere M., Saad N., Bressollier P., Granet R., Couleaud P., Frochot C., Krausz P., *Am. Chem. Soc* **2011**, *12*, 1716.
40. Yuri Nagata J., H. N., Kimura E., Batistela V., Sano Suga Terada R., Graciano A., Baesso M., Fujimaki Hayacibara M., *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2012**, *9*, 122.
41. Shoaib Haider S., K. H. A., Fawad J., *Photodiag. Photodyn. Ther* **2013**, *10*, 632.
42. Rodrigues G., F. L., Wainwright M., Braga G., *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2012**, *119*, 89.
43. Menezes H., P. A., Brancini G., Leão H., Massola Júnior N., Bachmann L., Wainwright M., Kenupp Bastos J., Braga G., *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2014**, *131*, 74.
44. Wainwright M., C. K. B., *Int. Biodeter. Biodegrad* **2004**, *53*, 119.
45. Lim M., L. Y., Zhang Y., Jang J., *Biom.* **2012**, 1912.
46. Magaraggia M., F. F., Gandolfi A., Joria G., *J. Environ. Monit* **2006**, *8*, 923.
47. DeRosa M. C., C. R., *J. Coord. Chem. Rev.* **2002**, *233*, 351.
48. Jori, G. B., S. B., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3* (5), 403.
49. Maisch, T. S., R. M.; Jori, G.; Abels, C., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3* (10), 907.
50. Demidova, T. N., Gad, F., Zahra, T., Francis, K. P., Hamblin, M. R. , *J. Photochem. Photobiol. B: Biol* **2005**, *81*, 15.
51. G., S. M. F. C. B. A. D. D. N. D. R., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 815.
52. Nowak-Ste pniowska, A. M., M.; Wiktorska, K.; Romiszewska, A.; Padzik-Graczc., *A.Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2011**, *8*, 39.
53. Hamblin M. R., J. G., Photob., E. S. f., Ed. 2011.
54. Yin R., D. T., Serafim A. E., Melo W., Vecchio D., Huang Y. Y., Gupta A., Hamblin M. R., *Curr. Opin. Pharmacol.* **2013**, *13*, 731-762.
55. Sharma, S. K.; Mroz, P.; Dai, T.; Huang, Y. Y.; Denis, T. G. S.; Hamblin, M. R., Photodynamic therapy for cancer and for infections: What is the difference? *Isr. J. Chem.* **2012**, *52*, 1-15.
56. Alves E., F. M. A. F., Neves M. G., Cunha A., Nadais H., Almeida A., *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **2015**, *22*, 34.
57. Jori, G., Brown, S. B., *Jour. Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3* (5), 403.
58. Maisch, T., *Lasers Med. Sci.* **2007**, *22*, 83.
59. Durantini, E. N., *Curr. Bioact. Compd.* **2006**, *2*, 127.
60. O'Riordan K., A. O. E., Hasan T., *Photodiag. Photodyn. Therapy* **2005**, *2* (4), 247.
61. Maisch, T.; Szeimies, R.-M.; Jori, G.; Abels, C., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 907.
62. Cormick, M. P., Rovera, M., Durantini, E. N., *Photochem. Photobiol. A: Chem* **2008**, *194*, 220.
63. Simonetti O., C. O., Orlando F., Alongi C., Lucarini G., Silvestri C., Zizzi A., Fantetti L., Roncucci G., Giacometti A., Offidani A., Provinciali M. , *Br. J. Dermatol.* **2011**, *164*, 987.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

64. Yin R., W. M., Huang Y-Y, Landi G., Vecchin D., Chiang L. Y., Hamblin M. R., **2015**, 79, 14.
65. D. A. Caminos, E. N. D. B., *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 4253.
66. Sharma, S. K. M., P.; Dai, T.; Huang, Y. Y.; Denis, T. G. S.; Hamblin, M. R., *Isr. J. Chem.* **2012**, 52, 1.
67. Ochsner, M. J., *Photochem. Photobiol. B* **1997**, 39, 1.
68. Vakrat-Haglili Y., W. L., Brumfeld V., Brandis A.; Salomon Y., McLlroy B., Wilson B. C., Pawlak A., Rozanowska M., Sarna, T., Scherz., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 6487.
69. Tanielian, C. M., R.; Seghrouchni, R.; Schweitzer, C., *Photochem. Photobiol* **2000**, 71, 12.
70. Wilkinson, F. H., W. P.; Ross, A. B., *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1995**, 24, 663.
71. Günther G., L. E., Zanocco A., *Bol. Soc. Chil. Quim.* **2000**, 45, 1.
72. E. A.; Perencevich E. N.; Herwaldt L. A., M. J. S. W. M. A. L. L. S. M. L. D. J. D. D. D. J. S. T. C. C., *Am. J. Infect. Control* **2014**, 42, 868.
73. Teixeira J. A.; Balcão V. M., R. A. C. M. C. G. P. F. C. D. F. F. S. J. A. C. M. V. V. M. M., *Microbiol. Res.* **2016**, 191, 51.
74. Williams, J. D., *J. Antimicrob. Chemother.* **1995**, 35, 721.
75. Kristiansen, J. E., *Dan. Med. Bull.* **1990**, 37, 165.
76. Hamblin, M. R. J., G., *The Royal Society of Chemistry: Camb.* **2011**, 11, 3.
77. Madigan M. T., M. J. M., Parker, J., *11th edition, Prentice Hall* **2005**, ISBN 0-13-144329-1.
78. Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K., Foster, T., *CA: a cancer journal for clinicians* **2011**, 61 (4), 250.
79. Baffreau J., L.-L. S. N. V. A., Williams, R. M., Hudhomme, P., *Chem* **2008**, 14 (16), 4974.
80. Merchat M., S. J. D., Bertoloni G., Jori G., *Jour. of Photoch. and Photob. B: Biol.* **1996**, 35, 149.
81. Ganber, G., *Drugs.* **2001**, 61, 1.
82. Hancock, R. E. W., *Trends Microbiol.* **1997**, 5, 37.
83. Boyle, R. W., Dolphin, D., *Photochem. Photobiol. Sci.* **1996**, 64, 469.
84. Driaf K., G. R., Krausz P., Kaouadji M., Thomasson F., Chulia A. J., Verneuil B., Spiro M., Blais J. C., Bolbach G., *Can. J. Chem.* **1996**, 74, 1150.
85. Durantini E. N., S. J. J., *Synth. Commun.* **1999**, 29, 3353.
86. Lindsey S. J., S. Y. C., Hsu H. C., Kearney P. C., Marguerettaz A. M. Rothmund and Adler, *J. Org. Chem* **1987**, 52, 827.
87. Kadish K.M, S. K. M., Guillard R., *Academic Press, Florida, USA* **2000**.
88. Gust D., M. T. A., Moore A. L., Liddel P. A., *Methods of Enzymology.* **1992**, 115 (2081).
89. Lazzeri D., D. E. N., *ARKIVOC* **2003**, 10, 227.
90. Milanesio M. E., A. M. G., Yslas E. I., Borsarelli C. D., Silber J. J., Rivarola V., Durantini E. N., *Photochem Photobiol.* **2001**, 74, 14.
91. Ruzié C., M. L., Boitrel B, *Tetrah. Lett.* **2002**, 43, 7423.
92. Gryko D., L. J. S., *J. Org. Chem* **2000**, 65, 2249.
93. Milanesio M. E., G. M., Otero L. A., Sereno L., Silber J. J., Durantini E. N., *J. Porp. Phth.* **2003**, 7, 42.
94. Smith, K. M., *Elsevier, Ed. Amsterdam.* **1975**.
95. Roeder, J. G. Moser, *Harw. Academic Pub. Am.* **1998**, Chap. 1.2, 9.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

96. Szacilowski K., M. W., Drzewiecka-Matuszek A., Brindell M., Stochel G., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *105*, 2647.
97. A. Treibs, F. H. K., *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1968**, *718* 208.
98. López Arbeloa F., B. J., Martínez V., Arbeloa T., López Arbeloa I., *Inter. Rev. Phys. Chem.* **2005**, *24*, 339.
99. A. Loudet, K. B., *Chem. Rev.* **2007**, *107* 4891.
100. Wood T.E., T. A., *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1831.
101. Ulrich J., Z. R., Harriman A., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 1184.
102. Bergström F., M. I., Hägglöf P., Wortmann R., Ny T., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 196.
103. Boens N., L. V., Dehaen W., *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1130.
104. Zhu H., F. J., Wang J., Mu H., Peng X., *Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12820.
105. A. Kamkaew, S. H. L., H.B. Lee, L.V. Kiew, L.Y. Chung, K., *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 77.
106. Yogo T., U. Y., Ishitsuka Y., Maniwa F., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* 12162.
107. Caruso E., B. S., Barbieri P., Leva B., Orlandi V., *Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2012**, *114*, 44.
108. Esna, I., Banuelos J., Lopez A., Costela A., Garcia-Moreno I., *RSC Adv.* **2013**, *3* (5), 1547.
109. Krumova K., C. G., *Journ of the Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (49), 17560.
110. Ye J-H., H. Z. W. Y., Zhang W., Zhang Y., *Tetrah. Lett.* **2012**, *53* (50), 6858.
111. Gibbs J. H., R. L. T., McCandless G., Fronczek F., Vicente M., *Bio. & Med. Chem.* **2013**, *21* (18), 5770.
112. Jiao L., Y. C., Li J., Wang Z., Wu M., Hao E., *Org. Chem. Am. Chem. Soc.* **2009**, *74* (19), 7525.
113. Li L., H. J., Nguyen B., Burgess Kevin., *Org. Chem. Am. Chem. Soc.* **2008**, *73* (5), 1963.
114. Jiao L., P., Zhou J., Wei Y., Mu X., Bai G., Hao E., *Org. Chem. Am. Chem. Soc.* **2011**, *76* (24), 9988.
115. Yu C., J. L., Yin H., Zhou J., Pang W., Wu Y., Wang Z., Yang G., Hao, E., *Eur. Journ. of Org. Chem.* **2011**, *2011* (28), 5460.
116. Baruah M., Q. W., Flors C., Boens N., *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 5998.
117. Schmitt A., H. B., Wild M, Jung M., *J. Fluoresc.* **2009**, *19*, 755.
118. Gary-Bobo M., M. Y., Rouxel M., Brevet D., Hocine O, Maynadier M., Gallud A., Da Silva A., Mongin O., Blanchard-Desce M., Richeter S., Looock B, Maillard P, Morère A., Garcia M., Raehm L., Durand J-O., *Int. J. Pharm* **2012**, *432*, 99.
119. Parveen S., M. R., Sahoo S. K., *Nanomed. Nanotech. Biol. Med* **2012**, *8*, 147.
120. Tanaka M., K. M., Yoshihara Y., Shinomiya N., Seki S., Nemoto K., Hirayama T., Dai T., Huang L., Hamblin M. R., Morimoto Y., *Photochem. Photobiol* **2012**, *88*, 227.
121. Couleaud P., M., Frochot C., Richeter S., Raehm L., Durand. J., *Nanoscale* **2010**, *2*, 1083.
122. Brevet D., G.-B. M., Raehm L., Richeter S., Hocine O., Amro K., Looock B., Couleaud P., Frochot C., Morère A., Maillard P., Garcia M., Durand J-O., *Chem. Commun* **2009**, 1475.
123. Chatterjee D. K., F. L. S., Zhang Y., *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1627.
124. Bonnett, R. K., M. A.; Lalov, I. G.; Artarsky, S. V., *Water Res.* **2006**, *40*, 1269.
125. K. Maaz, A. M., S.K. Hasanain, y A.Ceylan., *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2007**, *308*, 289.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 126.Pankhurst, Q. A. C., J.; Jones, S. K.; Dobson, J., *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, *36*, 167.
- 127.Berry, C. C. C., A. S. G. J., *Phys. D: Appl. Phys* **2003**, *36*, 198.
- 128.A. Bumb, M. W. B., P. L. Choyke, L. Fugger, A. Eggeman, D. Prabhakaran, J. Hutchinson and P J Dobson., *Nanotechnology* **2008**, *19*, 335601.
- 129.Jongnam P., K. A., Yosun H., Je-Geun P., Han-Jin Noh, Jae-Hoon P., Nong-Moon H. and Taeghwan H. , *Nat. Mat.* **2004**, *3*, 891.
- 130.Huang P., Z. L., Jing Y., Dapeng G., Xu G., Cheng B., Zhang L., Wang C., *Biom.* **2011**, *32* (13), 3447.
- 131.Hong R.Y., P. T. T., Li H.Z., *Jour.l of Magnet. and Mag. Mat.* **2006**, *303*, 60.
- 132.Shashwat S. Banerjee, D.-H. C., *Jour. of Haz. Mat.* **2007**, *147*, 792.
- 133.McCarthy J. R, K. K. A., Sun E. Y., Weissleder R., *Nnanom.* **2007**, *403*, 139.
- 134.Ngwenya N., N. E., Parsons J., *Rev. of environ. contam. and toxic., Springer New York* **2013**, *10*, 1007.
- 135.Qu X., B. J., Li Q., Alvarez P. J., *Acc. Chem. Res* **2013**, *46*, 834.
- 136.Brown D., B. J., West J., *Rev. Environ. Sci. Biotechnol* **2011**, *10*, 79.
- 137.Ternes T.A., S. J., Herrmann N., McDowell D., Ried A., Kampmann M., Teiser B. , *Water Res* **2003**, *37*, 1976.
- 138.Gunten, U. v., *Water Res* **2003**, *7*, 1443.
- 139.Gunten, U. v., *Water Res* **2003**, *37*, 1469.
- 140.Wu W.W., B. M. M., Korshin G.V., *Wat. Res* **2001**, *35*, 3545.
- 141.W. Yang, H. Z., N. Cicek, *Crit. Rev. Env. Sci. Tec* **2014**, *44*, 1443.
- 142.Caminos D., D. E., *Mol. Biol. Educ.* **2007**, (35), 64.
- 143.Guan Y.P. , L. H. Z., An Z.T., Ke J.J., Chen J.Y. , CN Patent No. ZL 98124516.1. **1998**.
- 144.Carvalho C., A. E., Costa L., Tome´ J. , Faustino M., Almeida A. , *ACS Nano* **2010**, *4* (12), 7133.
- 145.Zhang Y., K. N., Zhang M., *Biom.* **2002**, *23*, 1553.
- 146.Pan Z-Z., Z. Y.-J., Chen Z., Ruan C-Q., Xu L., Chen Q-X., Liu B., *Int. Jour. of Biol. Macrom.* **2013**, *62*, 211.
- 147.Haller, I., In *Am. Chem. Soc.*, 1978; p 8051.
- 148.Caminos, D. A. D., E. N, *J. Porphyr. Phthalocya* **2005**, *9*, 334.
- 149.Golf H., R. H.-U. a. W. A., *Eur. J. Org. Chem.* **2015** 1548.
- 150.Andrés M. Durantini, L. E. G., Richard Lincoln, Sol R. Martínez, and Gonzalo Cosa*, *Jour. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 1215.
- 151.Mora J., M. M., Durantini E., *Jour. of Photoch. and Photob. A: Chem.* **2013**, *270*, 75.
- 152.Milanesio M., Á. M., Silber J., Rivarola V., Durantini E., *Photochem. Photobiol* **2003**, *2*, 926.
- 153.Cormick, M. P. A., M. Gabriela Rovera, Marisa Durantini, Edgardo N., *Eu. Jour. of Med. Chem.* **2009**, *44* (4), 1592.
- 154.Gomes, A.; Fernandes, E.; Lima, J. L. F. C., Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Bioph. Methods* **2005**, *65* (2–3), 45-80.
- 155.Wang, M.; Maragani, S.; Huang, L.; Jeon, S.; Canteenwala, T.; Hamblin, M. R.; Chiang, L. Y., Synthesis of decacationic [60]fullerene decaiodides giving photoinduced production of superoxide radicals and effective PDT-mediation on antimicrobial photoinactivation. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63* (0), 170-184.
- 156.Gottfried V., P. D., Winkelman J.W., Kimel S. , *Photochem. Photobiol* **1988**, *48*, 157.
- 157.Milanesio, M. E.; Alvarez, M. G.; Yslas, E. I.; Borsarelli, C. D.; Silber, J. J.; Rivarola, V.; Durantini, E. N., Photodynamic studies of metallo 5,10,15,20-tetrakis(4-methoxyphenyl)

porphyrin: photochemical characterization and biological consequences in a human carcinoma cell line. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 14-21.

158.Ehrenshaft, M.; Deterding, L. J.; P., M. R., Tripping up Trp: modification of protein tryptophan residues by reactive oxygen species, modes of detection, and biological consequences. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *89*, 220-228.

159.Harrigan, W. F., McCance, M. E., Laboratory methods in food and dairy microbiology. *Academic Press, London.* **1986**.

160.Agazzi M., S. M., Gsponer N., Milanesio M., Durantini E., *Jour. of Photoch. and Photob. A: Chem.* **2015**, *310*, 171.

161.Spesia M, L. D., Pascual L., Rovera M., Durantini E., *FEMS Im. and Med. Microb.* **2005**, *44*, 289.

162.Kossakowska M., N. J., Kawiak A., Kurlenda J., Bielawski K., Grinhol M., *Photod. and Photod. Ther.* **2013**, *10*, 348.

163.Huang, P. L., Zhiming Lin, Jing Yang, Dapeng Gao, Guo Xu, Cheng Bao, Le Zhang, Chunlei Wang, Kan Song, Hua, Hu, Hengyao, Cui, Daxiang, Photosensitizer-conjugated magnetic nanoparticles for in vivo simultaneous magnetofluorescent imaging and targeting therapy. *Biomaterials* **2011**, *32* (13), 3447-3458.

164.Banerjee, S. S., Chen, Dong-Hwang, *Jour of Hazard. Mat.* **2007**, *147* (3), 792.

165.M-H. Liao, D-H. C., *Jour. of Mat. Chem.* **2002**, *12*, 3648.

166.Ballatore M., D. J., Gsponer N., Suarez M., Gervaldo M., Otero L., Spesia M., Milanesio M., and Durantini E., *Environ. Sci. Technol* **2015**, *49*, 7456.

167.Praseuth D., G. A., Verlhoc J-B.,Kraljic I., Sissoeff I., Guille E., **1986**, *44*, 717.

168.Lambekt C. R., K. E., Spike J. D., *Photoch. and Photob.* **1986**, *44* (5), 595.

169.Ferraudi, G., Arguello, G. A., Ali, H., Van Lier, J. E., *Photoch. and Photob.* **1988**, *47* (5), 657.

170.Maoquan C., S. Y., Peng J., Dai X., Li H., Wu Q., Shi D., *Biomaterials* **2013**, *34* (16), 4078.

171.Cabello, R. R., Editorial Medica Panamericana Sa de: 2007.

172.Hernández, A. L., Editorial Ciencias Médicas: 2001.

173.Tortora, G. J., Funke, B.R., Case, C.L., *Introducción a la microbiología. Ed. Med. Panam.* 2007.

174.Medved'ová A., V. L., *Struc. and func. of food engin.. Rijeka: InTech* **2012**.

175.Caminos D., M. B. S. M. a. D. E., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5*, 56.

176.Merchat M., B. G., Giacomini P., Villanueva A., Jori G, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol* **1996**, *32*, 153.

177.Mukundan N.E., P. G., Dixon D.W., Kim M.S, *Marzilli. Inorg. Chem* **1994**, *33*, 4676.

178.Ballatore M., S. M., Milanesio M., Durantini E., *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *83*, 685.

179.Schmidt R., A. E., *J. Phys. Chem* **1990**, *94*, 4377.

180.Pineiro M., C. A. L., Pereira M. M., Rocha Gonsalves A. M. d'A., Arnaut L. G., Formosinho S., *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 2299.

181.Gsponer N., S. M., Durantini E., *Photod. and Photod. Thera.* **2015**, *12*, 67.

182.Gomes, A. F., E.; Lima, J. L. F. C, *J. Biochem. Biophys. Meth.* **2005**, *65*, 45.

183.Spesia M., R. M., Durantini E., *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *47* 2198.

184.Quiroga E.D. , A. M. G., Durantini E.N., *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2010**, *60* 123.

185.A.M. Durantini, D. A. H., J.E. Durantini, E.N. Durantini, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *144*,

651.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

186. Tianhong D., Y.-Y. H., Hamblin M., *Photodiag. and Photod. Ther.* **2009**, 6 (3), 170.
187. P.R. Ogilby, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, 9, 1543.
188. Novaira M., C. M., Durantini E., *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2012**, 246, 67.
189. Maisch, T. B., C.; Szeimies, R. M.; Lehn, N.; Abels, C., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49, , 1542.
190. Di Palma, M. A., Alvarez, M. G. and Durantini, E. N. , *Photochem. and Photob. B: Bio.* **2015**, 91.
191. Gsponer, N. S., Agazzi, M. L., Spesia, M. B., Durantini, E. N., *Methods* **2016**, 167.
192. Cormick, P. Q., E. D., Bertolotti, S. G., Alvarez M. G., and Durantini, E. N. , *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, 10, 1556.
193. Durantini, E. N., *Synth. Commun.* **1999**, 30 (24), 4201.
194. Kalyanasundaram K., N.-S. M., *Jour of Phys. Chem.* **1982**, 86, 5163.
195. Milanesio, M. E., Alvarez, M. G., Bertolotti S. G. and Durantini, E. N., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, 7, 963.
196. Cinzia Spagnul, L. C. T., Ross W. Boyle., *Photochem. and Photob. B: Bio.* **2015**, 150, 11.
197. Durantini A. M., H. D. A., Durantini J. E., Durantini E. N., *Europ. Journ. of Med. Chem.* **2018**, 144, 651.
198. Scanone A. C., G. N. S., Alvarez M. G. y Durantini E. N., *Journal of Photoch. and Photob. A: Chem.* **2017**, 346 452.

