



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

**SÍNTESIS Y PROPIEDADES FOTODINÁMICAS DE FULLERENOS
C₆₀ COMO AGENTES FOTOTERAPÉUTICOS**

Lic. Maximiliano L. Agazzi

Director: Dr. Edgardo N. Durantini

Co-directora: Dra. Mariana B. Spesia

Río Cuarto, Córdoba, Argentina

Marzo de 2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

Departamento de Química

Lic. Maximiliano L. Agazzi Firma..... Aclaración.....

. .

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

. .

Dra. Mariana B. Spesia Firma..... Aclaración.....

. .

COMISIÓN ASESORA Y JURADO

Dra. Ana N. Santiago Facultad de Ciencias Químicas.
Universidad Nacional de Córdoba.

Firma.....Aclaración.....

Dra. M. Lorena Gómez Departamento de Química. Facultad de Cs.
Exactas Físico-Químicas y Naturales.
Universidad Nacional de Río Cuarto.

Firma.....Aclaración.....

Dr. Hernán A. Montejano Departamento de Química. Facultad de Cs.
Exactas Físico-Químicas y Naturales.
Universidad Nacional de Río Cuarto.

Firma.....Aclaración.....

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:.....

Calificación:.....

A mis viejos...

*“Ciencia sin conciencia
es ruina del alma”
Francois Rabelais*

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres María y Guillermo por su apoyo constante e incondicional.
- A mis hermanos Juan, Mauro y Fede. A quienes admiro mucho y de quienes aprendo constantemente.
- A los amigos de ayer y de hoy. Los nuevos y los viejos. Los de cerca y los de lejos.
- A Rocío por su entrañable compañía.
- A mis directores Mariana y Edgardo. Por su cualidades académicas y humanas. Por su confianza, tiempo, paciencia y dedicación brindada en estos años. Gracias por tantas enseñanzas y por permitirme trabajar con libertad.
- A los integrantes del jurado, Ana, Lorena y Hernán, por sus excelentes aportes y consejos brindados durante todo el desarrollo de esta tesis doctoral, por el tiempo y la predisposición ofrecidos en todo momento y por sus valiosas devoluciones.
- A Bela por ayudarme con el diseño de tapa y con tantas otras. Por todo lo compartido y aprendido.
- A Dani por ayudarme con los pendrives y sobre todo por su genuina amistad.
- A todos los miembros del PDI, a los que siguen y a los que ya no están. Agradezco su compañerismo, aportes y todos los momentos compartidos.
- A Jorge Robledo, por su inestimable capacidad para fomentar y despertar vocaciones científicas.
- A la querida y hermosa Universidad Nacional de Río Cuarto. Por permitirme formarme en estos 12 años en lo académico y principalmente en lo humano.
- A todos los integrantes del departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico Químicas y Naturales que han contribuido a mi formación.
- A todo el Súper Gran Becario por tan lindos momentos compartidos y por el compañerismo.
- Al Consejo de Sabios y al CLC por aquellos memorables recreos con sabiduría y risa.
- A la banda del fútbol de los jueves/viernes. A los viejos y los pibes. Por esos picados inolvidables.
- A los queridos estudiantes y amigos del genial Secundario no docente de la universidad.
- Al Café Científico y a Fer Melgar por enseñarme lo apasionante, desafiante y necesario que es comunicar públicamente la ciencia
- A los queridos compañeros de Graduados del Bicentenario, Sinergia y Becarios de investigación, con los que compartimos sueños de transformación.
- A CONICET por otorgarme la beca de posgrado, sin la cual no hubiera sido posible la realización de mi doctorado.
- A la vieja y gloriosa Educación Pública que me permitió casi desde la cuna, realizar todas mis trayectorias educativas. A todos los que piensan, trabajan y luchan para defenderla y mejorarla.
- A mi país y a sus habitantes. Gracias por bancar la educación e investigación pública que me permiten hoy recibirme. Espero retribuir todo lo brindado en el lugar que me toque estar.

Lejos está esto de ser un logro individual
Muchas gracias a todos.

RESUMEN

La "edad de oro" de la terapia antimicrobiana comenzó con el descubrimiento de los antibióticos. Sin embargo el uso generalizado de agentes antimicrobianos produjo el aumento de resistencia a los antibióticos por parte de bacterias y otros microorganismos infecciosos. Así, la inactivación fotodinámica (PDI) se ha convertido en una estrategia emergente para el tratamiento de microorganismos patógenos. Con el fin de evaluarlos como fotosensibilizadores para PDI, se sintetizaron cuatro derivados del fullereno C_{60} (MPC_{60} , DPC_{60}^{2+} , MMC_{60} y DMC_{60}^{3+}). Estos compuestos absorben principalmente en la región ultravioleta. Estudios cinéticos con distintos sustratos indican que producen eficientemente especies reactivas de oxígeno (ROS) por ambos mecanismos fotodinámicos (Tipo I y Tipo II). Estudios *in vitro* de PDI con la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* indicaron que los fullerenos catiónicos son más eficientes, produciendo ambos fotosensibilizadores una PDI de 99.99% con una concentración de 0,5 μM , luego de 30 min de irradiación. Con la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* sólo DMC_{60}^{3+} mostró fotoinactivación, con un 99,97% de eficacia a 1 μM y 30 min de irradiación. Por lo tanto, DMC_{60}^{3+} es una molécula muy efectiva para la PDI de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Además la PDI puede potenciarse relevantemente con ioduro de potasio (KI).

Por otro lado, para disminuir la desventaja principal del C_{60} como fotosensibilizador relacionada a sus bajas absorciones en el visible, se propuso el diseño de díadas conformadas por una antena captadora de luz y dadora de energía unida al C_{60} . Como antenas se propusieron fluoróforos derivados del BODIPY. Se realizó la síntesis de dos BODIPYs (BDP2 y BDP4). Éstos presentan una importante absorción en la región verde del espectro. En la emisión se observó una disparidad en las intensidades debido a las diferencias estructurales. Se evidenció una baja producción de oxígeno singlete ($O_2(^1\Delta_g)$), y una contribución del mecanismo tipo I. Las propiedades fotodinámicas se estudiaron en presencia de KI. Se observó un aumento del entrecruzamiento de sistemas (ISC) por efecto de átomo pesado externo, que incrementa la producción de ROS y genera especies reactivas de iodo. Ambos BODIPYs inactivan eficientemente *S. aureus*, alcanzando una PDI completa con una concentración de 1 μM y 5 min de irradiación. En *E. coli*, se encontró una mayor inactivación con 5 μM de BDP4. En presencia de I^- se potenció sustancialmente la PDI de ambos BODIPYs, alcanzando una eficiencia total para BDP2 y BDP4. De esta manera, se comprobó que tales BODIPYs pueden utilizarse dualmente como agentes terapéuticos, ya sea como fluoróforos para imágenes de diagnóstico celular y como fotosensibilizadores combinados con KI para PDI.

Finalmente se sintetizaron dos díadas ($BDP-C_{60}$ y $BDP-C_{60}^{2+}$), utilizando como antenas a BDP2 y su precursor sin metilar (BDP1). Los espectros de absorción son una combinación lineal de los espectros de las estructuras individuales. Ambas estructuras, muestran una emisión muy débil, lo que revela una desactivación importante del estado excitado singlete del BODIPY por parte del C_{60} . La espectroscopía de especies transitorias demuestra un preponderante proceso fotoinducido de transferencia de energía (PET) en tolueno, y la aparición de un proceso de transferencia de electrones (PeT) en un medio más polar de dimetilformamida (DMF). Los estudios de fotooxidación mostraron una mayor producción de ROS para $BDP-C_{60}$ y $BDP-C_{60}^{2+}$ en comparación a las unidades estructurales. Los ensayos de PDI indicaron que la díada catiónica es un fotosensibilizador más efectivo para la fotoinactivación de *S. aureus*, presentando una inactivación de 99,999% con una concentración de 5 μM y 30 min de irradiación con luz visible, mostrando contribución de ambos mecanismos fotodinámicos. Los resultados obtenidos para las díadas de BODIPY- C_{60} demuestran que estos nuevos diseños estructurales pueden potenciar la acción fotodinámica del fullereno C_{60} por efecto antena, optimizando la PDI en sitios donde se requiera de mayor penetración de la luz.

ABSTRACT

The "golden age" of antimicrobial therapy began with the discovery of antibiotics. However the widespread use of antimicrobial agents has led to increased resistance to antibiotics by bacteria and other infectious microorganisms. Thus, photodynamic inactivation (PDI) has become an emerging strategy for the treatment of pathogenic microorganisms. In order to evaluate them as photosensitizers for PDI, four C₆₀ fullerene derivatives were synthesized (MPC₆₀, DPC₆₀²⁺, MMC₆₀ y DMC₆₀³⁺). These compounds absorb mainly in the ultraviolet region. Kinetic studies with different substrates indicate that efficiently produce reactive oxygen species (ROS) by both photodynamic mechanisms (Type I and Type II). *In vitro* studies of PDI with Gram positive bacteria *Staphylococcus aureus* indicated that cationic fullerenes achieve the highest inactivation, producing both photosensitizers a PDI of 99.99% with a concentration of 0.5 μM and after 30 min of irradiation. Gram negative bacterium *Escherichia coli* only showed an effective inactivation with DMC₆₀³⁺, exhibiting a PDI of 99.97% with 1 μM of concentration and 30 min of irradiation. Therefore, DMC₆₀³⁺ is a very effective molecule for the PDI of Gram positive and Gram negative bacteria. In addition, PDI can be significantly enhanced with potassium iodide (KI).

On the other hand, in order to diminish the main disadvantage of the C₆₀ as a photosensitizer related to its low absorptions in the visible, the design of dyads was proposed. They were formed by a light-harvesting antenna and an energy donor attached to the C₆₀. As antennas, fluorophores derived from BODIPY were proposed. The synthesis of two BODIPYs (BDP2 and BDP4) was performed. These present an important absorption in the green region of the spectrum. In the emission a disparity in the intensities was observed due to the structural differences. There was evidence of a low production of singlet oxygen (O₂(¹Δ_g)), and a contribution of type I mechanism. The photodynamic properties are studied in the presence of KI. An increase in the intersystem crossing (ISC) due to the effect of external heavy atom was observed, which increases ROS production and generates reactive iodine species. Both BODIPYs efficiently inactivate *S. aureus*, reaching a complete PDI with 1 μM and 5 min of irradiation. In *E. coli*, greater inactivation was found with 5 μM of BDP4. In the presence of I⁻ the PDI of both BODIPYs was substantially potentiated, reaching a total efficiency for BDP2 and BDP4. In this way, it was found that such BODIPYs can be used dually as theranostic agents, either as fluorophores for cellular diagnostic images and as photosensitizers combined with KI for PDI.

Finally two dyads were synthesized (BDP-C₆₀ and BDP-C₆₀²⁺), employing BDP2 and its unmethylated precursor (BPD1) as light-harvesting antennas. The absorption spectra correspond to the a linear combination of the spectra of the individual structures. Both structures show a very weak emission, which reveals an important quenching of the singlet excited state of the BODIPY by the C₆₀. Transient spectroscopy demonstrates a predominantly photoinduced energy transfer process (PET) in toluene, and the appearance of a photoinduced electron transfer process (PeT) in a more polar medium of dimethylformamide (DMF). The photooxidation studies showed a higher production of ROS for BDP-C₆₀ and BDP-C₆₀²⁺ compared to the structural units. *In vitro* studies indicated that the cationic dyad is a more effective photosensitizer for the photoinactivation of *S. aureus*, presenting a PDI of 99.999% with 5 μM of concentration and 30 min of irradiation, showing contribution of both photodynamic mechanisms. The results obtained for the dyads of BODIPY-C₆₀ show that these new structural designs can enhance the photodynamic action of the C₆₀ fullerene by antenna effect, optimizing the PDI in places where greater penetration of light is required.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	19
ÍNDICE DE FIGURAS.....	21
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	33
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	37
1. INTRODUCCIÓN.....	43
1.1. La problemática de la resistencia microbiana	43
1.2. Bacterias.....	46
1.2.1. Gram positivas y negativas.....	46
1.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	48
1.2.3. <i>Escherichia coli</i>	50
1.3. Inactivación Fotodinámica.....	51
1.3.1. Fundamentos y condiciones óptimas para la PDI	51
1.3.2. Efecto fotodinámico en microorganismos.....	56
1.3.3. Mecanismos de fotosensibilización.....	57
1.3.4. Reacciones del oxígeno molecular singlete.....	60
1.4. Fotosensibilizadores para PDI.....	61
1.5. Derivados del fullereno C ₆₀	65
1.5.1. Propiedades generales	65
1.5.2. Obtención de fullereno C ₆₀	68
1.5.3. Síntesis de derivados del fullereno C ₆₀	69
1.5.4. Propiedades espectroscópicas del fullereno C ₆₀ y sus derivados.....	72
1.5.5. Fotofísica y fotoquímica de fullerenos	74
1.5.6. Fullerenos C ₆₀ como fotosensibilizadores en PDI.....	76
1.5.7. Fullerenos C ₆₀ conjugados con antenas captadoras de luz.....	80
1.6. BODIPYs como antenas captadoras de luz.....	84
1.6.1. Propiedades generales de BODIPYs	84

1.6.2. Síntesis de BODIPYs	86
1.6.3. Funcionalización del BODIPY	87
1.6.4. Características espectroscópicas de BODIPYs	89
1.6.5. BODIPYs como fotosensibilizadores	90
1.6.6. Díadas de BODIPY-C ₆₀	91
2. OBJETIVOS	97
2.1. Objetivo general.....	97
2.2. Objetivos específicos	97
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	101
3.1. Equipamiento	101
3.2. Sistemas de irradiación	102
3.3 Reactivos y solventes.....	103
3.4. Síntesis	104
3.4.1. Síntesis de derivados del fullereno C ₆₀	104
3.4.2. Síntesis de derivados del BODIPYs.....	106
3.4.3. Síntesis de díadas BODIPY-C ₆₀	108
3.5. Estudios espectroscópicos.....	108
3.6. Absorción de especies transitorias resuelta en el tiempo.....	110
3.7. Cálculos computacionales.....	110
3.8. Estudios electroquímicos	110
3.9. Estudios en medios homogéneos. Fotólisis en estado estacionario	111
3.9.1. Fotooxidación de 1,3-difenilisobenzofurano	111
3.9.2. Fotooxidación de 9,10-dimetilantraceno.....	112
3.9.3. Fotooxidación de 2,2'-(antraceno-9,10-diil)bis(metilmalonato) de sodio	112
3.9.4. Fotooxidación de azul de nitrotetrazolio.....	112
3.9.5. Fotooxidación de L-triptófano	113
3.9.6. Generación de especies de iodo por BODIPYs	114

3.10. Estudios en medios microheterogéneos	114
3.10.1. Estudios en micelas inversas de AOT	114
3.11. Estudios con microorganismos	115
3.12. PDI de bacterias	116
3.12.1. Inactivación fotodinámica de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> con derivados del fullereno C ₆₀ . Metodología I	116
3.12.2. Inactivación fotodinámica de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> con derivados del fullereno C ₆₀ . Metodología II	117
3.12.3. Inactivación fotodinámica de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> con BODIPYs	117
3.12.4. Inactivación fotodinámica de <i>S. aureus</i> con díadas BODIPY-C ₆₀	117
3.13. Mecanismos de acción fotodinámica <i>in vitro</i>	118
3.13.1. Mecanismo de acción fotodinámica de DPC ₆₀ ²⁺ , DMC ₆₀ ³⁺ y BDP-C ₆₀ ²⁺ en bacteria	118
3.13.2. Efecto del NADH en la PDI	118
3.13.3. Efecto del KI en la PDI	119
3.14. Experimentos control y análisis estadísticos	119
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	125
4.1. Síntesis de derivados del fullereno C ₆₀ (MPC ₆₀ y DPC ₆₀ ²⁺)	125
4.2. Estudios espectroscópicos	127
4.2.1. Espectroscopia de absorción UV-visible	127
4.2.2. Espectroscopía de fluorescencia	128
4.3. Actividad fotodinámica	130
4.3.1. Producción de O ₂ (¹ Δ _g)	131
4.3.2. Determinación de O ₂ ^{*-}	138
4.3.3. Fotooxidación de L-triptófano	139
4.4. Inactivación fotodinámica <i>in vitro</i> de <i>S. aureus</i>	141
4.5. Mecanismo de acción fotodinámico <i>in vitro</i> de DPC ₆₀ ²⁺	145
4.5.1. PDI en una atmósfera anóxica	146

4.5.2. PDI de suspensiones celulares de D ₂ O	147
4.5.3. Efecto del ión azida en la PDI.....	147
4.5.4. Efecto del DABCO en la PDI	148
4.5.5. Efecto del D-manitol en la PDI.....	149
4.5.6. Efecto del NADH en la PDI.....	150
4.5.7. Efecto del I ⁻ en la PDI	152
4.6. Diseño de un nuevo derivado del fullereno C ₆₀	155
4.7. Síntesis de derivados del fullereno C ₆₀ (MMC ₆₀ y DMC ₆₀ ³⁺).....	156
4.8. Estudios espectroscópicos.....	157
4.8.1. Espectroscopía de absorción UV-visible	157
4.8.2. Espectroscopía de fluorescencia	158
4.9. Actividad fotodinámica.....	159
4.9.1. Producción de O ₂ (¹ Δ _g).....	159
4.9.2. Determinación de O ₂ ^{*-}	160
4.9.3. Fotooxidación de L-triptófano	161
4.10. Inactivación fotodinámica <i>in vitro</i> de bacterias	162
4.11. Mecanismo de acción fotodinámico <i>in vitro</i> de DMC ₆₀ ³⁺	165
4.12. Derivados de BODIPYs como fotosensibilizadores	173
4.13. Síntesis de BODIPYs.....	173
4.14. Propiedades espectroscópicas de absorción y fluorescencia	175
4.15. Actividad fotodinámica.....	179
4.15.1. Fotooxidación de DPBF.....	179
4.15.2. Fotooxidación de L-triptófano	181
4.16. Efecto del KI en la acción fotodinámica.....	184
4.16.1. Efecto del KI en la emisión de fluorescencia.....	185
4.16.2. Espectroscopía de absorción de transientes en presencia de KI	187
4.16.3. Fotooxidación de DPBF y Trp en presencia de KI	189

4.16.4. Generación de especies reactivas de iodo	192
4.17. Unión de BODIPYs en bacterias	193
4.18. PDI sensibilizada por BODIPYs	194
4.19. Díadas BODIPY-C ₆₀ como fotosensibilizadores	198
4.20. Síntesis de díadas BODIPY-C ₆₀	201
4.21. Propiedades espectroscópicas de absorción y emisión	204
4.22. Espectroscopía de especies transitorias resuelta en el tiempo	209
4.23. Cálculos Computacionales	212
4.25. Estudios electroquímicos	214
4.26. Actividad fotodinámica.....	217
4.26.1. Producción de O ₂ (¹ Δ _g).....	217
4.26.2. Determinación de O ₂ ⁻ con NBT.....	221
4.26.3. Fotooxidación de Trp	222
4.27. PDI de díadas	225
4.28. Mecanismo de acción fotodinámico <i>in vitro</i> de BDP-C ₆₀ ²⁺	229
5. CONCLUSIONES.....	235
6. REFERENCIAS	245

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones óptimas para producir inactivación fotodinámica ocasionando un daño mínimo en las células huésped.....	56
Tabla 2. Características espectroscópicas de los fullerenos y rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) en DMF.	129
Tabla 3. Parámetros cinéticos (k_{obs}) y rendimientos cuánticos (Φ_Δ) de producción de $O_2(^1\Delta_g)$ de los derivados de fullereno en diferentes medios.....	137
Tabla 4. Inactivación de <i>S. aureus</i> tratada con 0,5 μ M de DPC_{60}^{2+} en presencia de diferentes concentraciones de KI.....	153
Tabla 5. Características espectroscópicas y rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) de MMC_{60} y DMC_{60}^{3+} en DMF.....	159
Tabla 6. Parámetros cinéticos (k_{obs}) y rendimientos cuánticos (Φ_Δ) de producción de $O_2(^1\Delta_g)$ de los derivados MMC_{60} y DMC_{60}^{3+} en DMF.....	160
Tabla 7. Parámetros espectroscópicos y rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_f) de BODIPYs.....	178
Tabla 8. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de DPBF (k_{obs}^{DPBF}), Trp (k_{obs}^{Trp}), y rendimientos cuánticos de oxígeno molecular singlete (Φ_Δ).....	184
Tabla 9. Rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) de BODIPYs a diferentes concentraciones de KI.	186
Tabla 10. Tiempo de vida del estado triplete (τ_T) de BDP3 en ausencia y presencia de KI en las dos longitudes de onda de máxima absorción en DMF.....	188
Tabla 11. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de DPBF (k_{obs}^{DPBF}) y Trp (k_{obs}^{Trp}) en presencia de KI.	191

Tabla 12. Parámetros espectroscópicos y rendimientos cuánticos de fluorescencias (Φ_F) de BDP1, BDP2, BDP-C ₆₀ , BDP-C ₆₀ ²⁺	209
Tabla 13. Potenciales redox de MAC ₆₀ , BDP1 and BDP-C ₆₀ . Los potenciales anódicos y catiónicos son reportados vs SCE.....	216
Tabla 14. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de DPBF (k_{obs}^{DPBF}) y rendimientos cuánticos de oxígeno molecular singlete (Φ_Δ).	218
Tabla 15. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de DPBF (k_{obs}^{DPBF}) y rendimientos cuánticos de oxígeno molecular singlete (Φ_Δ) en tolueno/AOT (0,1 M)/agua (W ₀ =10) y DMF/TFA (2% v/v).	220
Tabla 16. Parámetros cinéticos para la reacción de Trp (k_{obs}^{Trp}) de las díadas BDP-C ₆₀ , BDP-C ₆₀ ²⁺ y sus unidades estructurales (BDP1, BDP2, MAC ₆₀ y MAC ₆₀ ⁺) en DMF.	223
Tabla 17. Parámetros cinéticos para la reacción de Trp (k_{obs}^{Trp}) de las díadas BDP-C ₆₀ y BDP-C ₆₀ ²⁺ en DMF/H ₂ O 5% y en presencia de DABCO y D-manitol.	225

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. (A) Cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923. (A) Cultivo en caldo tripticasa soya después de un crecimiento durante toda la noche (<i>Overnight</i> , ON). (B) Colonias circulares características de <i>S. aureus</i> creciendo sobre placa de agar tripticasa soya. (C) Imagen al microscopio óptico de <i>S. aureus</i> , 100x.....	49
Figura 2. Cepa de <i>E. coli</i> EC7. (A) Cultivo en caldo tripticasa soya después de un crecimiento durante toda la noche (<i>Overnight</i> , ON). (B) Colonias características de <i>E. coli</i> creciendo sobre placa de agar tripticasa soya. (C) Imagen al microscopio óptico de <i>E. coli</i> , 100x.....	51
Figura 3. Espectro de absorción de fullereno C ₆₀ en DMF.	73
Figura 4. Espectro de absorción UV-vis de DTC ₆₀ ²⁺ en DMF.....	73
Figura 5. Espectro de emisión de DTC ₆₀ ²⁺ en DMF.....	74
Figura 6. Espectros de absorción (línea roja) y emisión (línea azul) del BODIPY1 en DMF.	89
Figura 7. Cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923. A) Cultivo en CTS después de un crecimiento durante toda la noche (<i>Overnight</i> , ON). B) Colonias típicas en ATS.	115
Figura 8. Cepa de <i>E. coli</i> EC7. A) Cultivo en CTS después de un crecimiento durante toda la noche (<i>Overnight</i> , ON). B) Colonias típicas en ATS.	116
Figura 9. Espectros de absorción UV-visible de A) MPC ₆₀ y B) DPC ₆₀ ²⁺ en DMF (línea continua), tolueno (línea discontinua) y tolueno/AOT (0,1 M)/agua (W ₀ =10) (línea de puntos).....	127
Figura 10. Espectros de emisión de fluorescencia de C ₆₀ (línea de puntos), MPC ₆₀ (línea continua) y DPC ₆₀ ²⁺ (línea discontinua) en DMF, λ _{exc} =450 nm.	129

Figura 11. A) Descomposición de DPBF sensibilizada por MPC₆₀ en DMF, irradiado con luz monocromática ($\lambda=480$ nm) B) Gráfico de primer orden para la fotooxidación de DPBF (20 mM) fotosensibilizada por C₆₀, (■), MPC₆₀ (●) y DPC₆₀²⁺ (▲) en DMF. 131

Figura 12. Descomposición de DMA sensibilizada por MPC₆₀ en DMF, irradiado con luz monocromática ($\lambda_{irr}=450$ nm) 133

Figura 13. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de DMA (35 μ M) fotosensibilizada por C₆₀, (■), MPC₆₀ (●) y DPC₆₀²⁺ (▲) en DMF. 134

Figura 14. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de DMA (35 μ M) fotosensibilizada por C₆₀, (■), MPC₆₀ (●) y DPC₆₀²⁺ (▲) en micelas inversas de tolueno/AOT (0,1 M)/agua (W₀=10). 136

Figura 15. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de ABMM (35 μ M) fotosensibilizada por MPC₆₀ (●) y DPC₆₀²⁺ (▲) en DMF/agua (1:1). 137

Figura 16. A) Aumento de la absorbancia a medida que transcurre el tiempo de irradiación debido a la aparición del producto diformazan. MPC₆₀ + NBT + NADH en DMF. B) Detección de O₂^{•-} mediante la reacción con NBT (2 mM) a diferentes tiempos de irradiación con luz visible. NBT + NADH(■); NBT + MPC₆₀ (◄); NBT + DPC₆₀²⁺ (▼); NBT + NADH + MPC₆₀ (●) NBT + NADH+ DPC₆₀²⁺ (▲) en DMF. 138

Figura 17. A) Fotodescomposición de Trp sensibilizada por MPC₆₀ en DMF, irradiado con luz monocromática ($\lambda=450$ nm). B) Gráficos de primer orden para la fotooxidación de Trp (20 μ M) sensibilizada por MPC₆₀ (●) y DPC₆₀²⁺ (▲) en DMF. 140

Figura 18. Curvas de supervivencia de células de *S. aureus* (2 ml, $\sim 10^6$ UFC/ml) incubadas con 0,5 μ M de MPC₆₀ (■) y DPC₆₀²⁺ (▲) por 30 min a 37 °C en la oscuridad y expuestas a luz visible por diferentes tiempos de irradiación en tubos de cultivo (13x100 mm). Cultivos de control: células tratadas con 0.5 μ M MPC₆₀ (□) and DPC₆₀²⁺ (△) en la oscuridad; células no tratadas con fotosensibilizador e irradiadas (●). 143

Figura 19. Curvas de supervivencia de células de *S. aureus* (2 ml, $\sim 10^8$ UFC / ml) incubadas con 0,5 μ M de MPC₆₀ (■) y DPC₆₀²⁺ (▲) por 30 min a 37 °C en la oscuridad y expuestas a luz visible por diferentes tiempos de irradiación en policubetas de 96 pocillos. Cultivos de control: células tratadas con 0,5 μ M MPC₆₀ (□) y DPC₆₀²⁺ (△) en la oscuridad; células no tratadas con fotosensibilizador e irradiadas (●). 144

Figura 20. Supervivencia de células de *S. aureus* (0,2 ml, $\sim 10^8$ UFC/ml) incubadas con 0.5 μ M DPC₆₀²⁺ en la oscuridad por 30 min a 37 °C e irradiadas con luz visible durante 15 min en policubeta de poliestireno de 96 pocillos: (1) cultivo control en oscuridad; 2) cultivo control irradiado; 3) cultivo control tratado con DPC₆₀²⁺ y mantenido en oscuridad; 4) cultivo tratado con DPC₆₀²⁺ e irradiado; 5) cultivo control en atmósfera de argón e irradiado; 6) cultivo tratado con DPC₆₀²⁺ en atmósfera de argón e irradiado; 7) cultivo control en D₂O e irradiado 8) cultivo tratado con DPC₆₀²⁺ en D₂O e irradiado 9) cultivo control con 50 mM de azida e irradiado; 10) cultivo tratado con DPC₆₀²⁺, 50 mM azida e irradiado; 11) cultivo tratado con DPC₆₀²⁺, 50 mM azida en atmósfera de argón e irradiado; 12) cultivo control con 50 mM de DABCO e irradiado; 13) cultivo tratado con DPC₆₀²⁺, 50 mM de DABCO e irradiado; 14) cultivo control con 50 mM de D-manitol e irradiado; 15) cultivo tratado con DPC₆₀²⁺, 50 mM de D-manitol e irradiado..... 150

Figura 21. Supervivencia de células de *S.aureus* (0.2 ml, $\sim 10^8$ CFU/ml) incubadas con 0,5 μ M de DPC₆₀²⁺ en oscuridad por 30 min a 37 °C y expuesta a luz visible por 15 min; 1) cultivo control en oscuridad; 2) cultivo conteniendo 50 mM de NADH e irradiado con luz visible por 15 min; 3) cultivo tratado con DPC₆₀²⁺ e irradiado; 3) cultivo tratado con DPC₆₀²⁺ conteniendo 10 mM de NADH e irradiado; 4) cultivo tratado con DPC₆₀²⁺ conteniendo 25 mM de NADH e irradiado; 5) cultivo tratado con DPC₆₀²⁺ conteniendo 50 mM de NADH e irradiado..... 151

Figura 22. Supervivencia de células de *S.aureus* (0,2 ml, $\sim 10^8$ CFU/ml) incubadas con 0.5 μM de DPC_{60}^{2+} en oscuridad por 30 min a 37 °C y expuesta a luz visible por 15 min; 1) cultivo control en oscuridad; 2) cultivo control en oscuridad conteniendo KI; 3) cultivo control en oscuridad conteniendo DPC_{60}^{2+} 4) cultivo tratado con DPC_{60}^{2+} e irradiado 5) cultivo tratado con DPC_{60}^{2+} conteniendo 10 mM de KI e irradiado; 6) cultivo tratado con DPC_{60}^{2+} conteniendo 25 mM de KI e irradiado; 7) cultivo tratado con DPC_{60}^{2+} conteniendo 50 mM de KI e irradiado. 153

Figura 23. Espectros de absorción UV-visible de A) MMC_{60} y B) DMC_{60}^{3+} en DMF (línea continua), tolueno (línea discontinua) y tolueno/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$) (línea de puntos)..... 158

Figura 24. Espectros de emisión de fluorescencia de los fullerenos MMC_{60} (línea continua) y DMC_{60}^{3+} (línea discontinua) en DMF, $\lambda_{\text{exc}}=450$ nm. 158

Figura 25. A) Descomposición de DPBF (20 μM) sensibilizada por DMC_{60}^{3+} (10 μM) en DMF, irradiado con luz monocromática ($\lambda=470$ nm), Δt : 60 segundos. B) Gráfico de primer orden para la fotooxidación de DPBF (20 μM) fotosensibilizada por C_{60} (■), MMC_{60} (●) y DMC_{60}^{3+} (▲) en DMF. 159

Figura 26. Detección de $\text{O}_2^{\cdot -}$ mediante la reacción con NBT (2 mM) a diferentes tiempos de irradiación con luz visible. NBT + NADH (o); NBT + MMC_{60} (∇); NBT + DPC_{60}^{2+} (□); NBT + DMC_{60}^{3+} (Δ); NBT + NADH+ MMC_{60} (▼); NBT + NADH+ DMC_{60}^{3+} (▲) en DMF. [NADH]=0,5 mM. [FS]=10 μM 161

Figura 27. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de Trp (20 μM) sensibilizada por MPC_{60} (●) y DMC_{60}^{3+} (▲) en DMF. 162

Figura 28. Curvas de inactivación de suspensiones celulares *S. aureus* a partir de $\sim 10^6$ UFC/ml (A) y $\sim 10^8$ UFC/ml (B), tratada con $0,5 \mu\text{M}$ de MMC_{60} (■) y DMC_{60}^{3+} (▲) e irradiadas con luz visible. Cultivo de control sin tratar irradiado (□). 163

Figura 29. Curvas de inactivación de *E. coli* a partir de $\sim 10^6$ UFC/ml (A) y $\sim 10^8$ UFC/ml (B), tratadas con $1 \mu\text{M}$ de MMC_{60} (■) y DMC_{60}^{3+} (▲) e irradiadas con luz visible. Cultivo de control sin tratar irradiado (□). 164

Figura 30. Supervivencia de células de *S. aureus* (0,2 ml, $\sim 10^8$ UFC/ml) incubadas con $0,5 \mu\text{M}$ DMC_{60}^{3+} en la oscuridad por 30 min a 37°C e irradiadas con luz visible durante 15 min en policubeta de poliestireno de 96 pocillos: (1) cultivo control en oscuridad; 2) cultivo control irradiado; 3) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} e irradiado; 4) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} en atmósfera de Ar e irradiado; 5) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} en D_2O e irradiado 6) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} , 50 mM azida e irradiado; 7) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} , 50 mM azida e irradiado en atmósfera de Ar; 8) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} , 50 mM de DABCO e irradiado; 9) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} , 50 mM de D-manitol e irradiado. 10) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} , 50 mM de KI e irradiado. 167

Figura 31. Supervivencia de células de *E. coli* (0,2 ml, $\sim 10^8$ UFC/ml) incubadas con $1 \mu\text{M}$ DMC_{60}^{3+} en la oscuridad por 15 min a 37°C e irradiadas con luz visible durante 15 min en policubeta de poliestireno de 96 pocillos: 1) cultivo control en oscuridad; 2) cultivo control irradiado; 3) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} e irradiado; 4) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} en atmósfera de Ar e irradiado; 5) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} en D_2O e irradiado 6) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} , 50 mM azida e irradiado; 7) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} , 50 mM azida e irradiado en atmósfera de Ar; 8) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} , 50 mM de DABCO e irradiado; 9) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} , 50 mM de D-manitol e irradiado. 10) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} , 50 mM de KI e irradiado. 168

Figura 32. Espectros de absorción de UV-visible de BODIPYs en diferentes medios. A) BDP2 B) BDP4. DMF (negro), agua (verde), <i>n</i> -heptano (fucsia), tolueno (azul), <i>n</i> -heptano/AOT(0,1M) /agua (W ₀ =10) (rojo).....	175
Figura 33. Espectros de emisión de fluorescencia de BDP2 (línea continua) y BDP4 (línea discontinua) en DMF.....	177
Figura 34. Descomposición de DPBF sensibilizada por BDP2 (A) y BDP4 (B) en DMF, irradiado con luz monocromática ($\lambda=500$ nm), Δt : 120 s.	179
Figura 35. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de DPBF fotosensibilizada por BDP2 (▲) y BDP4 (▼) en DMF (A) y <i>n</i> -heptano/AOT(0,1M) /agua (W ₀ =10) (B).....	180
Figura 36. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de Trp fotosensibilizada por BDP2 (▲) y BDP4 (▼) en DMF. Inserto: Fotodescomposición de Trp sensibilizada por BDP2 en DMF, irradiado con luz monocromática ($\lambda_{irr}=500$ nm).....	182
Figura 37. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de Trp en DMF/5% H ₂ O fotosensibilizada por: (A) BDP2 (▲) y (B) BDP4 (▼) con adición de DABCO (50 mM) (●) and D-manitol (50 mM) (■), $\lambda_{irr}=500$ nm.	183
Figura 38. Espectros de emisión de BDP2 (A) y BDP4 (B) en DMF a diferentes concentraciones de KI, λ_{exc} 470 nm. Sin KI (línea continua), y con KI: 10 mM (línea discontinua), 25 mM (línea de puntos) e KI 50 mM (línea discontinua con punto).	185
Figura 39. Variación de la intensidad de emisión de fluorescencia en función de [KI] en DMF de BDP2 ($\lambda_{max}^{Em} = 513$ nm) (▲) y BDP4 ($\lambda_{max}^{Em} = 512$ nm) (▼), $\lambda_{exc}= 470$ nm.	186
Figura 40. (A) Espectro de absorción de transientes de BDP2 en solución de DMF saturada en argón, determinado a diferentes tiempos, luego de excitación con pulso de laser a 532 nm. (B) Perfiles de decaimiento de absorción de BDP2 a 420 nm en presencia de 0, 10, 25 and 50 mM KI, inserto: cambios en la diferencia de absorbancia inicial (ΔA_i) con la concentración de KI a 420 nm. (C) Perfiles de decaimiento de absorción de BDP2 a 620	

nm en presencia de 0, 10, 25 and 50 mM KI, inserto: cambios en la diferencia de absorbancia inicial (ΔA_i) con la concentración de KI a 620 nm.	187
Figura 41. (A) Espectro de absorción de transientes de BDP4 en solución de DMF saturada en argón, determinado a diferentes tiempos, luego de excitación con pulso de laser a 355 nm. (B) Perfiles de decaimiento de absorción de BDP4 a 420 nm en ausencia de KI y en presencia de 50 mM de KI.....	189
Figura 42. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de DPBF ($\lambda_{irr} = 500$ nm) fotosensibilizada por BDP2 (A) y BDP4 (B) sin adición de KI (\blacktriangle), con adición de 10 mM KI (\bullet) y 50 mM KI (\blacksquare).....	190
Figura 43. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de Trp ($\lambda_{irr} = 500$ nm) fotosensibilizada por BDP2 (A) y BDP4 (B) sin adición de KI (\blacktriangle) y con adición de 50 mM KI (\bullet).	191
Figura 44. Espectros de absorción de (A) BDP2 (1 μ M) y (B) BDP4 (1 μ M) en DMF/H ₂ O 5% con 10 mM KI registrados antes (línea de puntos), y luego de la irradiación con luz visible a diferentes tiempos (5, 10, 15 y 30 min, línea continua). Espectro referencia de una solución de iodo (20 μ M, línea discontinua). Control de KI sólo e irradiado por 30 min (línea de guión punto).....	192
Figura 45. Microscopía de fluorescencia en <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> incubadas con 5 μ M de BDP2 y BDP4 durante 30 minutos a 37 ° C en la oscuridad. Inserto: Microscopía de campo claro (objetivo de microscopio 100 \times , barra de escala \sim 2 μ m).	194
Figura 46. Curvas de inactivación de A) <i>S. aureus</i> ($\sim 10^7$ UFC/ml) tratada con 1 μ M de BDP2 (\blacktriangle), BDP4 (\blacktriangledown), BDP2 + 50 mM KI (Δ) y BDP4 + 50 mM KI (∇). B) <i>E. coli</i> ($\sim 10^7$ UFC/ml) tratada con 5 μ M de BDP2 (\blacktriangle), BDP4 (\blacktriangledown), BDP2 + 50 mM KI (Δ) y BDP4 + 50 mM KI (∇) e irradiadas con luz visible. Cultivo de control sin tratar (\bullet). Cultivo de control tratado con 50 mM KI sin fotosensibilizador e irradiado (\odot).	195

Figura 47. Curvas de supervivencia de *E. coli* ($\sim 10^7$ CFU/ml) con (A) 5 min y (B) 15 min de irradiación tratada con 5 μ M BDP3 (\blacktriangle) o BDP4 (\blacktriangledown) y diferentes concentraciones de KI. Cultivo de control irradiado sin fotosensibilizador (\bullet). 196

Figura 48. Espectros de absorción de UV-visible de (A) MAC_{60} (línea discontinua), BDP1 (línea discontinua y punto), BDP- C_{60} (línea continua) y (B) MAC_{60}^+ (línea discontinua), BDP2 (línea discontinua y punto), BDP- C_{60}^{2+} (línea continua) en DMF..... 205

Figura 49. Espectros de absorción UV-visible de BDP- C_{60} (A) y BDP- C_{60}^{2+} (B) en tolueno (línea continua) y DMF (línea discontinua). Inserto: Espectros de absorción en tolueno (línea continua) y tolueno/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$) (línea discontinua)..... 206

Figura 50. Espectros de emisión de fluorescencia de BDP1 (línea continua), BDP- C_{60} (línea de puntos), BDP- C_{60} (x100, x10) (línea discontinua) en tolueno (A) y DMF (B).. 207

Figura 51. Espectros de emisión de fluorescencia de BDP2 (línea continua), BDP- C_{60}^{2+} (línea de puntos), BDP- C_{60}^{2+} (x100, x10) (línea discontinua) en tolueno (A) y DMF (B) 207

Figura 52. Espectros de absorción (A) y emisión de fluorescencia (B) de BDP- C_{60} con adición de 0 μ l (línea negra), 2 μ l (línea roja), 5 μ l (línea azul), 10 μ l (línea verde) and 20 μ l (línea fucsia) de TFA en DMF. 208

Figura 53. (A) Espectro de absorción de especies transitorias de BDP- C_{60} en solución de tolueno saturada en argón, determinado a diferentes tiempos, luego de excitación con pulso de laser a 532 nm. (B) Perfiles de decaimiento de absorción de BDP- C_{60} , a 360 nm (línea azul), 520 nm (línea verde) y 700 nm (línea negra). Ajuste exponencial de los perfiles de decaimiento (línea roja)..... 210

Figura 54. Espectro de absorción de transientes de BDP- C_{60} en solución saturada en argón, determinado a diferentes tiempos luego de excitación del pulso laser a 532 nm en DMF (A) and DMF/TFA (1%) (B). Perfiles de decaimiento de absorción de BDP- C_{60} , a 350 nm

(línea azul), 520 nm (línea verde) y 700 nm (línea negra). Ajuste exponencial de los perfiles de decaimiento (línea roja) en DMF (C) y DMF/TFA (1%) (D).....	211
Figura 55. (A) Espectro de absorción de especies transitorias de BDP-C ₆₀ ²⁺ en solución de tolueno saturada en argón, determinado a diferentes tiempos, luego de excitación con pulso de laser a 532 nm. (B) Perfiles de decaimiento de absorción de BDP-C ₆₀ ²⁺ , a 360 nm (línea azul), 520 nm (línea verde) y 700 nm (línea negra). Ajuste exponencial de los perfiles de decaimiento (línea roja).....	212
Figura 56. (A) Estructura optimizada (i) orbital molecular ocupado de menor energía, HOMO (ii) y orbital molecular ocupado de mayor energía. LUMO (iii) de BDP-C ₆₀ . (B) Diagrama de los orbitales moleculares y niveles de energía del estado excitado de (ii) BODIPY y estado fundamental de (i) <i>N,N</i> -dimetilanilina y (iii) <i>N</i> -metilfulleropirrolidina. Todos los cálculos se realizaron por DFT en el nivel CAM-B3LYP/6-31+G(d) utilizando Gaussian 09.	213
Figura 57. Estructura optimizada (A), orbital molecular ocupado de menor energía, HOMO (B) y orbital molecular no ocupado de más baja energía, LUMO (C) de BDP-C ₆₀ ²⁺	214
Figura 58. Curvas de voltametría cíclica de (A) BDP1, (B) MAC ₆₀ y (C) BDP-C ₆₀ . 0.6 mM en <i>o</i> -DCB conteniendo 0,1 M de TBABF ₄ , usando un electrodo de trabajo de Pt. Velocidad de barrido: 100 mV/s.....	215
Figura 59. Descomposición de DPBF sensibilizada por BDP-C ₆₀ en DMF (A) y BPD-C ₆₀ ²⁺ en tolueno/AOT (0,1 M)/agua (W ₀ =10) (B), irradiado con luz monocromática (λ _{irr} =500 nm).....	217
Figura 60. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de DPBF fotosensibilizada por MC ₆₀ (●), BDP1 (■), BDP2 (□), BDP-C ₆₀ (▼) y BDP-C ₆₀ ²⁺ (▲), en tolueno (A) DMF (B). λ _{irr} =500 nm.	218

Figura 61. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de DPBF fotosensibilizada por BDP-C₆₀ (▼) y BDP-C₆₀²⁺ (▲), en tolueno/AOT (0,1 M)/agua (W₀=10). 219

Figura 62. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de DPBF fotosensibilizada por BDP-C₆₀ (A) y BDP-C₆₀²⁺ (B) en DMF (▼) y DMF/TFA(2%) (▲)..... 220

Figura 63. Detección de O₂^{•-} mediante la reacción con NBT (2 mM) a diferentes tiempos de irradiación con luz visible. NBT + NADH (■); NBT + BDP-C₆₀ (▽); NBT + BDP-C₆₀²⁺ (Δ); NBT + NADH+ BDP-C₆₀ (▼) NBT + NADH+ BDP-C₆₀²⁺ (▲) en DMF/1% H₂O. 222

Figura 64. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de Trp en DMF fotosensibilizada por (A) MAC₆₀ (●), BDP1 (■) BDP-C₆₀ (▼) y (B) MAC₆₀⁺ (●), BDP2 (■) y BDP-C₆₀²⁺ (▲). 223

Figura 65. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de Trp en DMF/H₂O 5% fotosensibilizada por (A) BDP-C₆₀ (▼) y (B) BDP4 (▲) con adición de DABCO (50 mM) (●) y D-manitol (50 mM) (■), λ_{irr}=500 nm. 224

Figura 66. Supervivencia de *S. aureus* (~10⁸ UFC/ml) incubadas con 5 μM de MAC₆₀ (■) y 5 μM BDP-C₆₀ (▼) durante 30 min a 37 °C en la oscuridad y expuestas a la luz visible durante diferentes tiempos de irradiación. Controles: células sin tratar en la oscuridad (o), células tratadas con 5 μM MAC₆₀ (□) y BDP-C₆₀ (▽) en la oscuridad. 226

Figura 67. Supervivencia de *S. aureus* (~10⁸ UFC/ml) incubadas con 5 μM de MAC₆₀⁺ (■) y 5 μM BDP-C₆₀²⁺ (▲) durante 30 min a 37 °C en la oscuridad y expuestas a la luz visible durante diferentes tiempos de irradiación. Controles: células sin tratar (o), células tratadas con 5 μM MC₆₀⁺ (□) y BDP-C₆₀²⁺ (Δ) en la oscuridad..... 227

Figura 68. Espectro de absorción de hemoglobina y otros componentes de los tejidos biológicos. 228

Figura 69. Supervivencia de *S. aureus* ($\sim 10^8$ UFC/ml) bajo las siguientes condiciones: (1) cultivo de control sin tratar en la oscuridad, (2) sin tratar irradiado 45 min sin filtro, (3) sin tratar irradiado 45 min con filtro 455-800 nm, (4) tratado con BDP-C₆₀²⁺ sin irradiar, (5) tratado con MAC₆₀⁺ sin irradiar, (6) tratado con MAC₆₀⁺ irradiado 45 min con filtro 455-800 nm, y (7) tratado con BDP-C₆₀²⁺ irradiado 45 min con filtro. [FS] = 5 μ M..... 229

Figura 70. Supervivencia de células de *S. aureus* (0,2 ml, $\sim 10^8$ UFC/ml) incubadas con 5 μ M BDP-C₆₀²⁺ en la oscuridad por 30 min a 37 °C e irradiadas con luz visible durante 30 min en policubeta de poliestireno de 96 pocillos: (1) cultivo control en oscuridad; 2) cultivo control con D₂O e irradiado; 3) cultivo control con azida e irradiado; 4) cultivo control con DABCO e irradiado; 5) cultivo control con D-manitol e irradiado; 6) cultivo tratado con BDP-C₆₀²⁺ e irradiado; 7) cultivo tratado con BDP-C₆₀²⁺ en D₂O e irradiado; 8) cultivo tratado con BDP-C₆₀²⁺, 50 mM azida e irradiado; 9) cultivo tratado con BDP-C₆₀²⁺, 50 mM de DABCO e irradiado; 10) cultivo tratado con BDP-C₆₀²⁺, 50 mM de D-manitol e irradiado..... 230

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Resistencia de las bacterias a los antibióticos.....	44
Esquema 2. Membrana y pared celular de A) bacterias Gram positivas y B) bacterias Gram negativas.	47
Esquema 3. Fotosensibilizadores de origen natural.....	53
Esquema 4. Etapas de la inactivación fotodinámica para el tratamiento de tejidos infectados.....	55
Esquema 5. Diagrama de Jablonski modificado para un fotosensibilizador.	58
Esquema 6. Mecanismos de acción fotodinámica tipo I y II.....	59
Esquema 7. Peroxidación del ácido linoleico mediada por $O_2(^1\Delta_g)$	61
Esquema 8. Mecanismo de fotooxidación de guanina.	61
Esquema 9. Estructuras moleculares de los fotosensibilizadores empleados en PDI.	65
Esquema 10. Representaciones estructurales del fullereno C_{60}	65
Esquema 11. Estructura anfifílica de fullerenos.....	67
Esquema 12. Vías de síntesis y derivatización del fullereno C_{60}	69
Esquema 13. Representación estructural de derivados de fulleropirrolidinas.....	70
Esquema 14. Síntesis de fulleropirrolidina a partir de la cicloadición [3+2] de iluro de azometino.	70
Esquema 15. Síntesis de distintos derivados de fulleropirrolidinas a partir de la cicloadición [3+2] de iluro de azometino.....	71
Esquema 16. Mecanismo de síntesis de la cicloadición 1,3-dipolar para obtener derivados del fullereno C_{60} con anillos pirrolidínicos.	71
Esquema 17. Síntesis de derivado de fulleropirrolidina dicatiónico.	72
Esquema 18. Representación esquemática de los mecanismos fotoquímicos tipo I (transferencia de carga) y tipo II (transferencia de energía) de fullereno C_{60}	75

Esquema 19. Derivados del fullereno C ₆₀ empleado como fotosensibilizadores en PDI. ..	77
Esquema 20. Derivado decacatiónico del fullereno C ₆₀ evaluado como fotosensibilizador en PDI in vitro e in vivo en presencia de KI.	79
Esquema 21. Penetración de la luz en los tejidos.....	80
Esquema 22. Mecanismos de fotosensibilización tipo I y II para díadas dador-fullereno C ₆₀	81
Esquema 23. Estructura representativa de díadas porfirina-fullereno C ₆₀	82
Esquema 24. Estructura representativa de díada porfirina-fullereno C ₆₀ evaluada en PDI de bacterias.....	82
Esquema 25. Estructura representativa de un sistema dador-aceptor eficiente en PDT.	83
Esquema 26. Estructura representativa de una díada decacatiónica evaluada en PDT.....	83
Esquema 27. Reacción llevada a cabo por Treibs y Kreuzer.	84
Esquema 28. Estructuras resonantes del BODIPY.....	84
Esquema 29. Sistema de numeración IUPAC para el BODIPY.	85
Esquema 30. Síntesis de BODIPYs a partir de pirroles y cloruros de ácido.....	86
Esquema 31. Síntesis de BODIPYs a partir de pirroles y anhídridos de ácido.....	86
Esquema 32. Síntesis de BODIPYs a partir de pirroles y aldehídos.....	87
Esquema 33. Síntesis de BODIPYs asimétricos.	87
Esquema 34. Vías de síntesis y derivatización del BODIPY.	88
Esquema 35. Primeros BODIPYs evaluados en PDI de microorganismos.....	91
Esquema 36. Primeros sistemas BODIPY-C ₆₀ sintetizados y estudiados.	92
Esquema 37. Díada BODIPY-C ₆₀ con procesos PET y PeT.	92
Esquema 38. Díadas BDP-C ₆₀ evaluadas como fotocatalizadores.	93
Esquema 39. Díadas BODIPY-C ₆₀ con grupos aminos libres facilitadores de PeT.....	93
Esquema 40. Díadas de BODIPY-C ₆₀ sintetizadas mediante cicloadición de Bingel.	94

Esquema 41. Diferentes sistemas de irradiación. I) Fotooxidación de DMA, DPBF, NBT y Trp. II) Inactivación de células de <i>S. aureus</i> y <i>E.coli</i> . III) Inactivación de <i>S. aureus</i> y <i>E.coli</i> . A: proyector, B: monocromador, C: celda de cuarzo, D: filtro de agua y E: suspensión de microorganismos, F: policubetas.....	102
Esquema 42. Síntesis de MPC ₆₀	126
Esquema 43. Síntesis de DPC ₆₀ ²⁺	126
Esquema 44. Reacción de DPBF con O ₂ (¹ Δ _g).....	131
Esquema 45. Reacción de DMA con O ₂ (¹ Δ _g).....	132
Esquema 46. A) Representación esquemática de una micela inversa. B) Micela inversa de tolueno/AOT (0,1 M)/agua (W ₀ =10).....	135
Esquema 47. Reacción de ABMM con O ₂ (¹ Δ _g).....	136
Esquema 48. Formación del DF a partir de la reacción entre ³ FS* y NADH, y entre el O ₂ ⁻ y NBT.....	138
Esquema 49. Reacción de L-triptófano con el oxígeno molecular singlete.....	139
Esquema 50. Mecanismos fotodinámicos de derivados del C ₆₀	146
Esquema 51. Desactivación del O ₂ (¹ Δ _g) y del estado excitado triplete del fotosensibilizador por el ion azida.....	147
Esquema 52. Desactivación del O ₂ (¹ Δ _g) por el DABCO.....	148
Esquema 53. Desactivación de radicales libres por D-manitol.....	149
Esquema 54. Procesos de desactivación química y física de O ₂ (¹ Δ _g) en presencia de NADH.....	151
Esquema 55. Síntesis de MMC ₆₀	156
Esquema 56. Síntesis de DMC ₆₀ ³⁺	156
Esquema 57. Síntesis de BODIPYs.....	174

Esquema 58. Diferencias en la libre rotación del grupo sustituyente en la posición meso de los BODIPYs.....	178
Esquema 59. Paso sintético a través de la reacción de Vilsmeier-Haack.	201
Esquema 60. Posiciones 2,6- (β -) del BODIPY más electrófilas.....	201
Esquema 61. Reacción de Vilsmeier-Haack.	202
Esquema 62. Mecanismo de reacción de Vilsmeier-Haack.	202
Esquema 63. Reacción de cicloadición 1,3-dipolar al C_{60}	203
Esquema 64. Metilación con CH_3I	203
Esquema 65. Síntesis de derivados del C_{60}	203
Esquema 66. Estructuras moleculares de BDP1, BDP2, MAC_{60} , MAC_{60}^+ , BDP- C_{60} y BDP- C_{60}^{2+}	204

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A

A: absorbancia

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

AOT: 1,4-bis(2-etilhexil)sulfosuccinato de sodio

aPDT: terapia fotodinámica antimicrobiana

ATS: agar tripticasa soya

B

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

BDP1: 1,3,5,7-tetrametil-8-[4-(N,N-dimetilamino)fenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-sindaceno

BDP2: 1,3,5,7-tetrametil-8-[4-(N,N,N-trimetilamino)fenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno

BDP3: 8-[4-(3-(N,N-dimetilamino)propoxil)fenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno

BDP4: 8-[4-(3-(N,N,N-trimetilamino)propoxil)fenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno

BDP5: 1,3,5,7-tetrametil-2-formil-8-[4-(N,N-dimetilamino)fenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno

⁰BDP: estado fundamental del BODIPY

¹BDP*: estado excitado singlete del BODIPY

³BDP*: estado excitado triplete del BODIPY

BDP-C₆₀: díada sin carga de BODIPY y fullereno C₆₀

BDP-C₆₀²⁺: díada dicatiónica de BODIPY y fullereno C₆₀

BODIPY: 4,4-difluoro-4-borata-3a-azonia-4a-aza-s-indaceno

C

CTS: caldo tripticasa soya / estado de separación de carga

C₆₀: estructura con forma de pelota de futbol conformada por 60 átomos de C

⁰C₆₀: estado fundamental del fullereno C₆₀

¹C₆₀*: estado excitado singlete del fullereno C₆₀

³C₆₀*: estado excitado triplete del fullereno C₆₀

D

DAC₆₀⁺: N,N-dimetil-2-(40-acetamidofenil)fulleropirrolidinio

DABCO: diazobiciclo[2.2.2]octano

DBO: demanda biológica de oxígeno

DCM: diclorometano

DCE: 1,2-dicloroetano

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

DF: diformazán

DMA: 9,10-dimetilantraceno

DMC₆₀³⁺: N,N-dimetil-2-[4'-(1-N-metil,4-N,N-dimetilpiperazino)]fulleropirrolidinio

DMF: N,N-dimetilformamida

DPBF: 1,3-difenilbenzofurano

D₂O: agua deuterada u óxido de deuterio

DTC₆₀²⁺: N,N-dimetil-2-(40-N,N,N-trimetilaminofenil)fulleropirrolidinio

DPC₆₀²⁺: N,N-Dimetil-2-[4'-(3-N,N,N-trimetilamino)propoxifenil]fulleropirrolidinio

E

ε: coeficiente de extinción molar

η_q : eficiencia en la desactivación del estado excitado singlete de una molécula

E_s : energía del primer estado excitado de una molécula

G

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

H

Hep-2: línea celular de laringe carcinoma humano

$^1\text{HNMR}$: espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón

HPLC: cromatografía líquida de alta presión

HOMO: orbital molecular de mayor energía ocupado

H_2O_2 : peróxido de hidrógeno

I

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

ISC: entrecruzamiento de sistemas

IR: radiación infrarroja

K

k_{obs} : constante de velocidad observada

k_q : constante de *quenching*

K_{SV} : constante de Stern-Volmer

L

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

LUMO: orbital molecular de más baja energía desocupado

M

MAC₆₀: *N*-metil-fulleropirrolidina

MAC₆₀⁺: *N,N*-dimetil-fulleropirrolidinio

MMC₆₀: *N*-metil-2-[4'-(4-metilpiperazino)]fulleropirrolidina

MPC₆₀: *N*-metil-2-[4'-(3-*N,N*-dimetilamino)propoxifenil]fulleropirrolidina

MS: espectroscopía de masa

MSSA: *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

N

NBT: azul de nitrotetrazolio

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

O

***o*-DCB**: orto-diclorobenceno

HO: radical hidroxilo

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

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

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

P

PBS: buffer fosfato salino

P-C₆₀: díadas de porfirinas y fullerenos C₆₀

PDI: inactivación fotodinámica

PDT: terapia fotodinámica

PET: transferencia de energía fotoinducida

PeT: transferencia de electrones fotoinducida

PpIX: protoporfirina IX

ps: picosegundos

FS: fotosensibilizador

⁰FS: estado fundamental del fotosensibilizador

¹FS_n^{*}: estado excitado singlete de mayor energía del fotosensibilizador

¹FS^{*}: estado excitado singlete del fotosensibilizador

³FS^{*}: estado excitado triplete del fotosensibilizador

R

Φ_F: rendimiento cuántico de fluorescencia

Φ_Δ: rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete

Φ_T: rendimiento cuántico de producción de triplete

R_f: 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

R_{cc}: distancia de centro a centro entre el dador y el aceptor de electrones en la díada

S

S_NAr: Sustitución nucleofílica aromática

S₀: estado fundamental de una molécula

S₁: primer estado excitado de una molécula

SCE: electrodo saturado de calomelanos

T

τ¹: tiempo de vida del estado singlete excitado de una molécula

τ³: tiempo de vida del estado triplete excitado de una molécula

TBO: azul de toluidina O

TEA: trietilamina

TFA: ácido trifluoroacético

TLC: cromatografía de capa fina

Trp: aminoácido L-triptófano

U

UFC: unidades formadoras de colonias

UV: ultravioleta

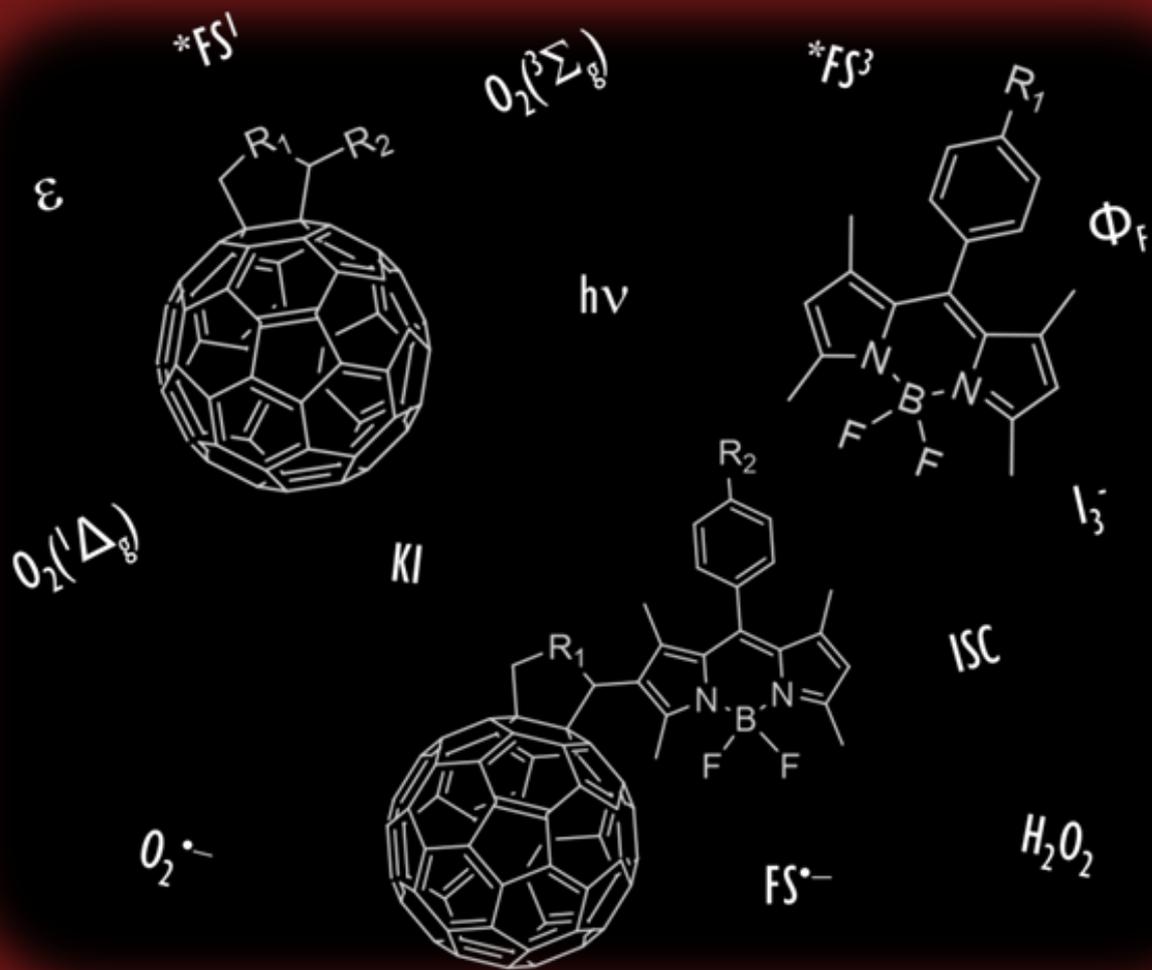
UV-vis: ultravioleta visible

V

VC: voltametría cíclica

W

W₀: relación molar [agua]/[surfactante]



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

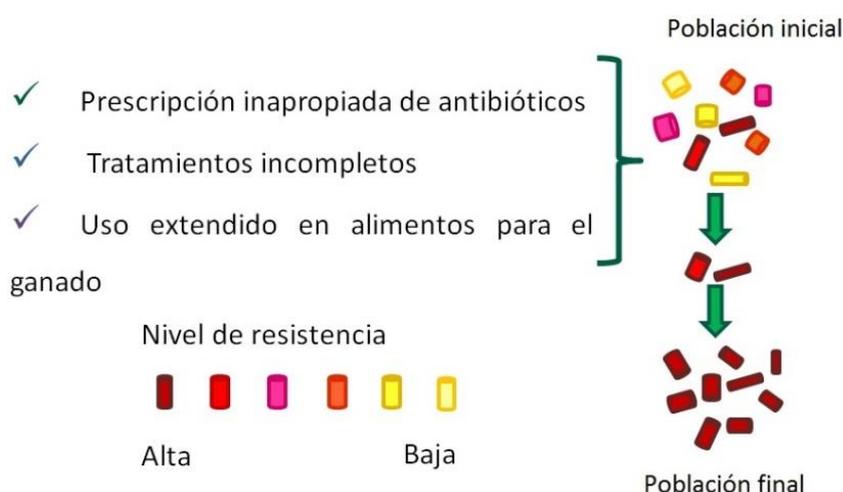
1.1. La problemática de la resistencia microbiana

El descubrimiento de la penicilina en 1928 por el Dr. Alexander Fleming y el desarrollo de los antibióticos en general, generó un gran optimismo, y junto con el surgimiento de las vacunas, hizo pensar que las enfermedades infecciosas se reducirían gradualmente hasta un nivel en el que ya no tendrían un significativo impacto en la salud humana.¹ Sin embargo, aunque los antibióticos han salvado incontables vidas y transformado la práctica de la medicina, el optimismo inicial fue por demás prematuro y las enfermedades infecciosas continúan liderando las causas de muerte a nivel mundial.² Más aún, el rápido incremento en la aparición de resistencia a antibióticos entre las bacterias patógenas podría finalizar con el periodo conocido como la “Era de los antibióticos”.³ Las bacterias se replican a gran velocidad y una mutación que ayuda a sobrevivir a un microbio, bajo la presencia de un antibiótico, rápidamente se vuelve predominante en dicha población microbiana, fenómeno conocido como presión selectiva.⁴ Como consecuencia, ciertas infecciones que en el pasado podían ser tratadas fácilmente, hoy conducen a una mayor morbilidad y pueden poner en riesgo la vida de un paciente incluso en un ambiente hospitalario.⁵ Este problema se agrava aún más por la gran variedad de mecanismos adoptados por las células microbianas para aumentar su resistencia a las agresiones externas. Estos incluyen un engrosamiento de su pared exterior, la codificación de nuevas proteínas que impiden la penetración de los fármacos, la aparición de mutantes deficientes en los canales porina que permiten la afluencia de productos químicos añadidos externamente, entre otros.⁶

El continuo cambio en el espectro de los agentes patógenos que causan infecciones en los seres humanos y los factores ambientales, sociales, políticos, económicos han impactado en la propagación de estas enfermedades.⁷ Nuevos agentes, como el HIV, que afectan al sistema inmune, han permitido la aparición de nuevas infecciones. Por otro lado las nuevas técnicas de diagnóstico han demostrado que enfermedades presentes durante décadas, son producidas por microorganismos. El avance en cirugía, técnicas como transfusiones y trasplantes de órganos ha permitido extender la sobrevivencia de miles de personas, sin embargo estos pacientes pueden quedar expuestos a patógenos oportunistas e infecciones intrahospitalarias. Lo mismo ocurre con aquellos que son

inmunocomprometidos, que no poseen un problema de salud específico, pero están expuestos a ser atacados por numerosos agentes y deben ser tratados con antibióticos durante largos periodos de tiempo. Además, el deterioro de las condiciones sociales en los países en desarrollo y en las potencias industrializadas también han contribuido al resurgimiento de algunas enfermedades como la tuberculosis.

Sumado a lo anterior, la inapropiada y exagerada prescripción de antibióticos de algunos médicos hasta hace unas décadas, sumado al error de algunos pacientes en el incumplimiento de los tratamientos prescritos, la automedicación y la utilización extendida de los antibióticos en el alimento para ganado han agravado la problemática (Esquema 1).⁸⁻¹⁰ También se puede mencionar la hospitalización prolongada, las enfermedades crónicas, la internación en terapia intensiva, la inserción de dispositivos invasivos y el incumplimiento de las normas de aislamiento y de las medidas de bioseguridad.¹¹



Esquema 1. Resistencia de las bacterias a los antibióticos.

Todas las causas descriptas han permitido ensanchar la problemática de la resistencia microbiana, y actualmente se pueden encontrar cepas que son resistentes a múltiples drogas y las infecciones que generan se tornan muy difíciles de tratar. Estas cepas multirresistentes tienen fuerte presencia en los hospitales, un medio donde se hace uso de varios tipos de antibióticos, favoreciendo su selección.

El tratamiento de estos patógenos multirresistentes involucra antibióticos más fuertes o en concentraciones tan elevadas que comprometen la salud del paciente. Una alternativa sería el uso conjunto de diferentes antibióticos con el fin de reducir las posibilidades de desarrollar algún tipo de resistencia. Sin embargo muchos de los

antibióticos disponibles están químicamente relacionados, y los patógenos están desarrollando mecanismo de defensas contra ellos.¹²

El costo de las enfermedades infecciosas es alto en los servicios de salud de naciones desarrolladas. En el año 2014, se estima que el Reino Unido invirtió U\$S 2 mil millones para programas de resistencia a los antimicrobianos y US\$ 1,2 billones en Estados Unidos en el año 2016, sin embargo la morbilidad no logró reducirse considerablemente. Según el Center Disease Control, en los EEUU, 2 millones de personas contraen infecciones de microorganismos resistencias y de esas, 20 mil fallecen por año.¹³ Según la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades, en la Unión Europea, se estima que fallecen 25.000 personas al año en hospitales públicos y privados tras infectarse con bacterias resistentes a los antibióticos

Más grave es el caso de naciones en desarrollo donde los controles sanitarios son más deficientes. En la República Argentina mueren unas 14.000 personas por año debido a estas enfermedades, de las cuales más de 10.000 se deben a septicemia, siendo los ancianos la población más afectada (~8000 en personas entre 65 y 85 años). Recientemente, el servicio de antimicrobianos de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán" realizó un estudio, recomendado por la Organización Mundial de la Salud, sobre las bacterias que resisten a los fármacos más potentes disponibles (actualmente denominadas "superbacterias"),¹⁴ y que afectan a los pacientes en los hospitales de la Argentina. Sólo en la Ciudad de Buenos Aires, la tasa asciende a 40 internados cada 10 mil habitantes.

A su vez, las compañías farmacéuticas dedican muchos recursos al desarrollo de nuevos antibióticos pero principalmente se dedican a mejorar las estructuras de los medicamentos ya establecidos.⁴ El conocimiento de los genomas de los distintos patógenos, puede llevar al desarrollo de mecanismos de control más directos. Sin embargo, se buscan antibióticos que sean de amplio espectro, ya que la fragmentación en muchos antibióticos específicos para cada caso, no es deseable económicamente para las corporaciones farmacéuticas. No obstante, la resistencia antimicrobiana es un problema complejo y multidimensional que afecta a toda la sociedad y depende de múltiples factores y actores relacionados entre sí donde las intervenciones aisladas tienen poco impacto. Para minimizar la aparición y propagación de esta problemática de envergadura global son necesarias acciones coordinadas e integrales. Todos los países deben tener planes de acción

nacionales contra la resistencia microbiana. Es necesario potenciar las inversiones e innovaciones en la investigación y desarrollo de nuevos tratamientos, antimicrobianos, vacunas y pruebas diagnósticas.

En 2015, el informe de O'Neill reportó preocupantes previsiones de que para el año 2050 la aceleración de la resistencia a los antibióticos podría causar 300 millones de muertes adicionales y costar 100 billones de dólares.¹⁵ Considerando que como se dijo previamente, la era antibiótica está arribando a su final, y que la posibilidad de descubrir nuevas clases de antibióticos se considera bastante improbable, a pesar de que se realicen mejoras incrementales, resulta necesario estudiar y desarrollar tecnologías antimicrobianas alternativas que eviten que las bacterias desarrollen resistencia. En tal sentido, y como veremos más adelante, el uso de agentes fotosensibilizadores para Inactivación Fotodinámica de microorganismos (PDI), y en particular de bacterias, puede desempeñar un rol importante en el marco esta lucha que se está desarrollando en el siglo XXI.¹⁶

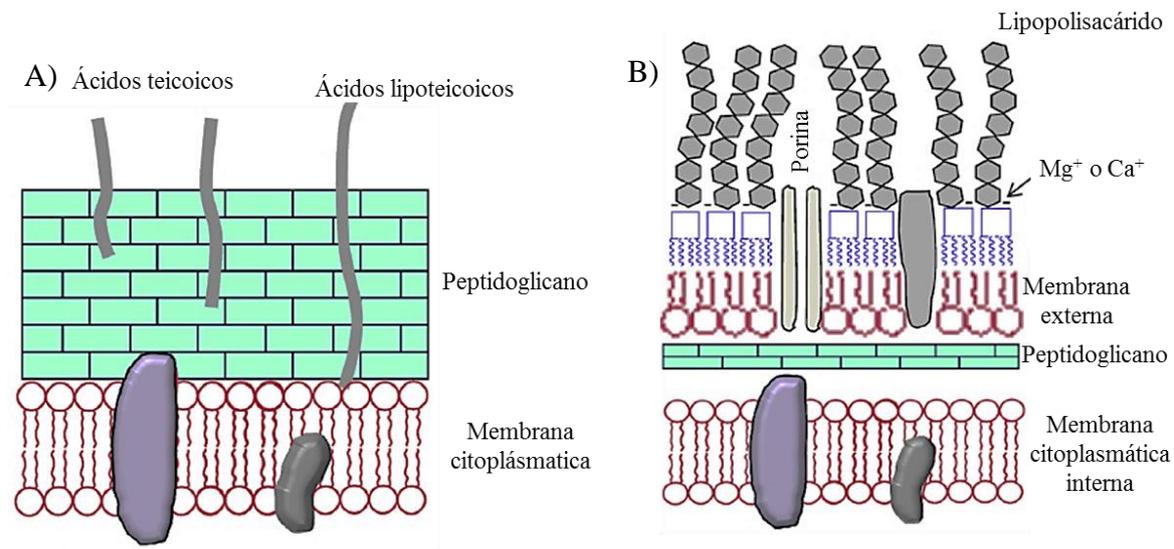
1.2. Bacterias

1.2.1. Gram positivas y negativas

Las células microbianas presentan una gran variedad de tamaño, arquitectura subcelular y composición bioquímica. Como consecuencia, la susceptibilidad a los procesos de fotosensibilización puede ser significativamente diferente en función del microorganismo a tratar. Las células bacterianas se pueden dividir en dos grupos que poseen grandes diferencias en su estructura y organización celular: bacterias Gram positivas y Gram negativas (Esquema 2).¹⁷

Las bacterias Gram positivas, están rodeadas por una pared exterior separada de la membrana plasmática por un espacio periplásmico. La pared gruesa de entre 20-80 nm representa una malla protectora constituida principalmente por capas de peptidoglicano, que son atravesadas por ácidos lipoteicoicos y teicoicos cargados negativamente estando los primeros anclados en la membrana citoplasmática (Esquema 2A).¹⁸ Por lo tanto, la pared exterior posee un alto grado de porosidad que le permite a diferentes moléculas difundir fácilmente hacia la membrana plasmática interna.¹⁹ Se han encontrado varias macromoléculas con un peso molecular de hasta aproximadamente 60.000 Da que pueden atravesar fácilmente la pared para llegar a la membrana interna.^{18,20} Por lo tanto, los agentes fotosensibilizantes más comunes, cuyo peso molecular generalmente no es

superior a 1500 Da, pueden cruzar rápidamente la pared exterior y localizarse en el entorno inmediato de los sitios endocelulares fotosensibles.¹⁷



Esquema 2. Membrana y pared celular de A) bacterias Gram positivas y B) bacterias Gram negativas.

Por otro lado, las bacterias Gram negativas se caracterizan por la presencia de una membrana externa organizada de entre 10-15 nm de espesor que se encuentra del lado externo de la red de peptidoglicano, cuyos componentes (lipoproteínas, lipopolisacáridos (LPS), proteínas con función porina) proporcionan a la superficie exterior un cuasi-continuo de cargas negativas que están parcialmente neutralizadas por los cationes divalentes Mg^{2+} y Ca^{2+} (Esquema 2B).²¹ La molécula fotosensibilizadora es más grande que los cationes, esto hace que la estructura del lipopolisacárido se distorsione y permita al fotosensibilizador unirse y/o penetrar en la membrana externa más fácilmente.²² El sistema de pared y membrana celular de las bacterias Gram negativas, altamente organizado, inhibe la penetración de los compuestos con un peso molecular mayor a 600-700 Da.^{21,23,24} La fotosensibilización de estas bacterias puede aumentarse utilizando compuestos con cargas positivas intrínsecas. Estos agentes catiónicos interactúan fuertemente con los sitios cargados negativamente de la superficie externa de las bacterias Gram negativas, incrementando la eficiencia de los procesos fotodinámicos.²⁵

Sobre la base de las consideraciones mencionadas anteriormente, las bacterias Gram negativas son el objetivo más desafiante para cualquier tipo de tratamiento antimicrobiano. En general, los estudios *in vitro* con microorganismos, indican que las bacterias Gram positivas son susceptibles al efecto producido por una gran variedad de

fotosensibilizadores, mientras que las Gram negativas son resistentes a la acción de agentes neutros y aniónicos.²⁶

El sitio de acción objetivo más frecuente en PDI cuando se emplean fotosensibilizadores tales como fenotiazinas, porfirinas o ftalocianinas es la membrana citoplasmática.¹⁷ Una serie de observaciones experimentales directas e indirectas apoyan este hecho.²⁷⁻²⁹ Sin embargo, el proceso general de inactivación es de naturaleza de objetivos múltiples, es por ello, que a las células microbianas les es difícil desarrollar estrategias de protección. Por lo tanto hasta el día de hoy, no han aparecido cepas que muestren resistencia a la inactivación fotodinámica.¹⁷ Estudios de inactivación fotodinámica de *V. fischeri* y *E. coli* con el fotosensibilizador 5,10,15-tris(1-metilpiridinio-4-il)-20-(pentafluorofenil)-porfirina (Tri-Py⁺-Me-PF) ponen de manifiesto que las bacterias no desarrollan resistencia a la PDI.³⁰ Para los ensayos se empleó una concentración de la molécula de 5µM y las suspensiones celulares se irradiaron durante 270 min (40 W m⁻²). Las cepas sobrevivientes a la iluminación en presencia del fotosensibilizador, se sometieron nuevamente a la PDI. Este procedimiento se repitió 10 veces y en ningún estudio *V. fischeri* y *E. coli* mostraron resistencia al tratamiento.³⁰ Los mismos tipos de ensayos se llevaron a cabo con el virus T4 y no se observó resistencia a la PDI luego de diez ciclos consecutivos.³¹

Vale la pena destacar, que en varios casos las infecciones son causadas por una flora microbiana heterogénea. Por lo tanto, el protocolo aprobado para el tratamiento de estas infecciones no se puede enfocar en un solo tipo de patógeno, sino que debe caracterizarse por actuar de manera eficaz en contra de un amplio espectro de microorganismos con muy diferentes características biológicas, morfológicas y fisiológicas.¹⁷

1.2.2. *Staphylococcus aureus*

S. aureus se incluye dentro de la familia *Micrococcaceae* y del género *Staphylococcus*. Son células esféricas Gram positivas, inmóviles, no esporuladas, y usualmente catalasa positivas. Poseen un diámetro que varía de 0,5 a 1,5 µm. Se disponen de a pares, tétradas o en racimos irregulares (Figura 1). Son anaerobios facultativos que producen ácidos a partir de glucosa, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Estos microorganismos son relativamente resistentes a la desecación y por ello fácilmente dispersables por las partículas de polvo a través del aire y de las superficies. Soportan

elevadas temperaturas (hasta 50°C durante 30 min) y altas concentraciones de cloruro de sodio.³²

La temperatura óptima de crecimiento de *S. aureus* es entre 30-37 °C. En medios sólidos las colonias típicas se presentan como circulares, lisas, mantecosas, redondas, ligeramente convexas y con un diámetro de 1 a 4 mm. Algunas cepas, son productoras de pigmentos de color anaranjado a amarillo pálido.

S. aureus se encuentra en la flora bacteriana de la piel, la cavidad oral y el tracto respiratorio superior. Se estima que hasta el 20% de la población humana está colonizada por esta bacteria, pero no presentan signos o síntomas de infección.³³ *S. aureus* es un patógeno potencial y los individuos colonizados asintomáticos pueden transmitir la bacteria de una persona a otra, ya sea por contacto directo o a través de superficies colonizadas.³⁴



Figura 1. (A) Cepa de *S. aureus* ATCC 25923. (A) Cultivo en caldo triplicasa soya después de un crecimiento durante toda la noche (*Overnight*, ON). (B) Colonias circulares características de *S. aureus* creciendo sobre placa de agar tripticasa soya. (C) Imagen al microscopio óptico de *S. aureus*, 100x.

Este microorganismo es el principal causante de infecciones bacterianas en humanos de todo el mundo.³⁵ La gravedad puede ir desde infecciones en la piel hasta una neumonía necrotizante mortal. El mayor inconveniente que presenta este patógeno es la capacidad de adquirir resistencia a los antibióticos,³⁶ lo cual es desconcertante porque los fármacos son cruciales para el tratamiento de muchos tipos de infecciones bacterianas. El desarrollo de cepas resistentes ocurre en los hospitales de todo el mundo y causa una importante morbilidad y mortalidad. Estudios experimentales han demostrado que *S. aureus* resistente a la meticilina,³⁷ sobrevive entre 12-60 días en los objetos inanimados de los hospitales.^{38,39}

Por lo tanto, es imperativo proporcionar perspectivas para la profilaxis y para el desarrollo de nuevos tratamientos destinados a erradicar infecciones producidas por *S. aureus*. En este sentido, la PDI ha sido propuesta como una alternativa para el control de infecciones bacterianas.⁸

Esta bacteria, puede producir un cierto número de porfirinas endógenas, predominantemente protoporfirina IX (PpIX), a través de una variante de la vía normal de biosíntesis del grupo hemo.^{40,41} Trabajos previos han demostrado que MRSA y otros microorganismos de importancia médica, pueden ser ópticamente inactivados utilizando luz de longitudes de onda entre 400-420 nm con una inactivación óptima a 405 nm.^{42,43} Sin embargo, esto es posible empleando una elevada fluencia de luz ($J\ cm^{-2}$), lo que puede afectar en gran medida a las células huésped, disminuyendo la selectividad del tratamiento.⁴⁴

1.2.3. *Escherichia coli*

E. coli es probablemente el microorganismo mejor conocido del mundo, ya que se ha utilizado como modelo en numerosas investigaciones científicas para estudiar todo tipo de aspectos genéticos y fisiológicos. Su genoma entero se conoce desde hace algunos años y su biología general está bien estudiada.^{45,46}

E. coli es un bacilo Gram negativo típico de la familia Enterobacteriaceae (Figura 2) la misma que incluye a otras bacterias patógenas de humanos como son *Shigella*, *Samonella*, *Klebsiella*, etcétera. Las bacterias de la familia Enterobacteriaceae están constituidos por bacilos no esporulados, que fermentan y oxidan la glucosa, carecen de indofenol oxidasa, reducen los nitratos a nitritos y se hayan ampliamente distribuidos en la naturaleza.⁴⁷ El tamaño promedio de la mayoría de estas bacterias oscila entre 0,5 y 2 μm de ancho y de 2 a 4 μm de largo. La temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de sus especies es de 37°C aunque *E. coli* puede resistir hasta 42°C.⁴⁷ El requerimiento de nutrientes en el metabolismo de esta bacteria no es altamente exigente y crecen de manera similar en todos los medios empleados. Las colonias son relativamente grandes de color grisáceo de aspecto húmedo y de bordes definidos. En los caldos líquidos las cepas enturbian el medio homogéneamente. *E. coli* produce colicinas, una sustancia bactericida que tiene actividad contra algunas cepas de su misma especie o de especies relacionadas.⁴⁷

La bacteria *E. coli* tiene como hábitat el intestino del hombre y de los animales, donde son capaces de respirar anaeróbicamente, mientras que otras pueden parasitar

plantas o ser comensales de animales invertebrados y vertebrados (vida saprofítica), donde respiran aeróbicamente. En particular, *E. coli* prefiere utilizar azúcares sencillos como la glucosa, produce ácido y gas en presencia de lactosa y al no ser una bacteria fijadora, requiere nitrógeno soluble como el sulfato de amonio.⁴⁸

Este microbio es el principal habitante facultativo que integra la flora normal, por cuanto también es el patógeno humano aislado con mayor frecuencia como agente causal de infecciones de las vías urinarias y de heridas, de afecciones respiratorias, meningitis y septicemia. Ciertas cepas de *E. coli* también son patógenos intestinales importantes que causan una amplia variedad de enfermedades gastrointestinales.⁴⁹



Figura 2. Cepa de *E. coli* EC7. (A) Cultivo en caldo tripticasa soya después de un crecimiento durante toda la noche (*Overnight*, ON). (B) Colonias características de *E. coli* creciendo sobre placa de agar tripticasa soya. (C) Imagen al microscopio óptico de *E. coli*, 100x.

1.3. Inactivación Fotodinámica

1.3.1. Fundamentos y condiciones óptimas para la PDI

Como se describió previamente, la aparición continua de microorganismos resistentes a los antibióticos se ha convertido en una gran amenaza para la salud pública a escala global. Por esta razón, además de mejorar los sistemas básicos e integrales de seguimiento, monitorización y prevención de la problemática, fortalecer la seguridad e higiene, el acceso al agua potable, el control de las infecciones en los centros sanitarios y la vacunación, es imperativo el desarrollo de nuevas drogas y metodologías antibióticas.⁵⁰ En tal sentido, se han desarrollado y estudiado diferentes tratamientos antimicrobianos alternativos:^{51,52}

- **Modificación del fenotipo bacteriano:** se basa 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.⁵³

- Terapia con bacteriófagos: consiste en la utilización de fagos que son virus que invaden a las células bacterianas y, en el caso de fagos líticos, alteran el metabolismo bacteriano causando lisis.⁵⁴

- Uso de bacteriocinas: son péptidos secretados por una amplia variedad de bacterias con el objetivo de eliminar la competencia del medio.^{51,55}

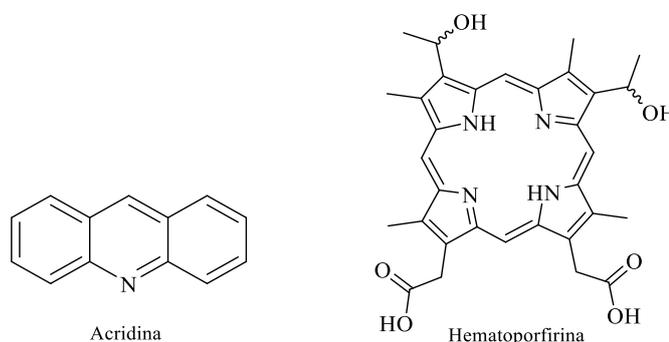
- Uso de los denominados no-antibióticos. En farmacología las drogas se clasifican en agentes antimicrobianos y drogas para el tratamiento de enfermedades no infecciosas.⁵⁶ Los compuestos desarrollados para tratar dolencias no infecciosas, pero con actividad antimicrobiana, son conocidos como los no-antibióticos.⁵⁷⁻⁵⁹

En esta búsqueda y desarrollo de metodologías alternativas para el tratamiento de microorganismos patógenos, es que surge la PDI, basada en el proceso de fotosensibilización.

Las PDI como aplicación fototerapéutica deriva de la terapia fotodinámica, también conocida como PDT por su denominación en inglés *photodynamic therapy*, la cual representa una modalidad bien establecida para el tratamiento de tumores malignos.^{60,61} En la actualidad, esta técnica se aplica en el área clínica. Sin embargo, continúan las investigaciones *in vivo* para que en un futuro se pueda emplear en el tratamiento de cánceres difíciles de tratar como por ejemplo la leucemia.^{62,63} Por otro lado, en las últimas décadas, la investigación y el desarrollo en este campo ha permitido el uso de fotosensibilizadores en el tratamiento de enfermedades infecciosas.⁵⁰ Esta metodología se ha denominado inactivación fotodinámica, y también se conoce como terapia fotodinámica antimicrobiana (aPDT), nombre que deja entrever los orígenes de este tratamiento alternativo para la erradicación de microbios.⁶⁴

A inicios del siglo XX, un estudiante de medicina de la universidad de Ludwig-Maximilian (Munich, Alemania) llamado Oscar Raab, visualizó por primera vez la posibilidad de inactivar microorganismos por medio de la acción combinada de la luz visible y un fotosensibilizador. Tal acción se observó cuando paramecios (organismos unicelulares de la clase Protista), incubados con pequeñas concentraciones de acridina (Esquema 3), permanecían vivos en la oscuridad pero mostraban muerte celular bajo irradiación con luz solar. Estos resultados se publicaron hacia 1900 y Hermann von Tappeiner, director del laboratorio, junto a Albert Jesionek plantearon algunas aplicaciones dermatológicas para tales sustancias que actuaban como “fotosensibilizadores”. En 1904 von Tappeiner y Jodlbauer usaron por primera vez el término “*photodynamische wirkung*”,

haciendo hincapié en el requerimiento del oxígeno en el proceso. El término alemán se tradujo al inglés como “*photodynamic action*” y en la actualidad se hace referencia al mismo como efecto o actividad fotodinámica.⁶⁵ Este fenómeno despertó un gran interés en los científicos, que ampliaron las investigaciones y evaluaron el efecto fotodinámico en diferentes medios biológicos. Así, Hasselbach demostró que dicho efecto sólo ocurría en presencia del oxígeno, confirmando lo planteado previamente por von Tappeiner. En 1912 el laboratorio de investigación orgánica de Hans Fischer mostró que la hematoporfirina (HpD) obtenida de la sangre y cuya estructura se muestra en el Esquema 3, presentaba un importante efecto fotodinámico en ratones.



Esquema 3. Fotosensibilizadores de origen natural.

El caso más destacado fue el del físico austríaco Friedrich Meyer-Betz que trabajaba en la clínica rusa de Königsberd (Kaliningrad, en la actualidad), quien en 1912 se inyectó a si mismo 200 mg de hematoporfirina por vía intravenosa. Después de la exposición a la luz del sol, ocurrió la fotosensibilización. Esto le produjo un fuerte cosquilleo y sensación de quemazón en las regiones de su cuerpo expuestas a la luz, principalmente en la cara y en las manos. La piel se puso roja y se hinchó en las áreas afectadas. Varias semanas después, el efecto fotodinámico aún persistía, aunque en menor medida. De esta manera, F. Meyer-Betz demostró drásticamente el efecto en humanos por parte de los fotosensibilizadores. Años más tarde se supo que las *porfirias*, un grupo de enfermedades asociadas con problemas en la biosíntesis del grupo hemo, proveían al torrente sanguíneo de porfirinas libres de hierro, que al llegar a la piel producían la fotosensibilización.⁶⁵ Posteriormente se encontró que otras afecciones de la piel que generaban sensibilidad a la luz se debían a la presencia de alguna molécula que producía el efecto fotodinámico.

El potencial uso de la PDT en contra de enfermedades de origen microbiano, no se explotó hasta mediados del siglo XX. Esto se debe, a que ciertos agentes fotosensibilizadores utilizados para el tratamiento de tumores (derivados del xanteno, de la acridina y porfirinas cargadas negativamente) no resultaban efectivos para combatir algunos de los patógenos más conocidos en su momento (bacterias Gram negativas y protozoos en etapa quística).^{66,67}

A fines del siglo XX, se dio un paso importante en el escenario global de los antimicrobianos empleando la PDI. En esta época, los descubrimientos realizados de forma independiente por tres grupos de investigación, mostraron que la luz visible activaba fotosensibilizadores catiónicos que pertenecen a la familia de las fenotiazinas,⁶⁸ porfirinas²⁶ y ftalocianinas.⁶⁹ Además, estos fotosensibilizadores generaban una muerte rápida y eficiente de bacterias Gram negativas, tales como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, además de producir la inactivación de hongos y bacterias Gram positivas.

En el siglo XXI, la investigación y el desarrollo en este campo han dado lugar en las últimas décadas, a la aplicación de fotosensibilizadores para el tratamiento de infecciones y esterilización de diferentes medios.^{70,71} Una gran variedad de fotosensibilizadores han demostrado tener propiedades prometedoras para la erradicación o control de los microorganismos patógenos como las bacterias.

Básicamente, la PDI consiste en tres etapas mostradas en el Esquema 4:

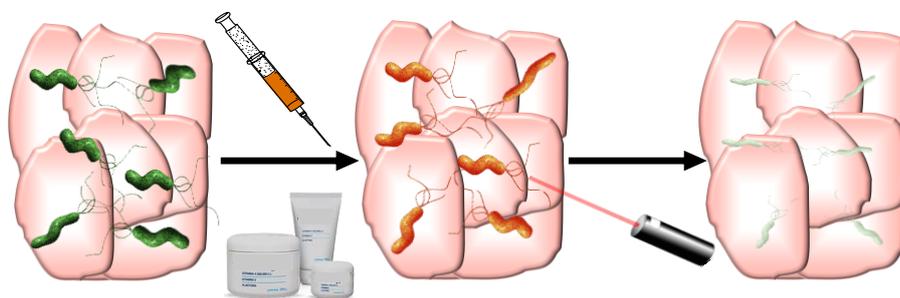
1) la acumulación preferencial del fotosensibilizador en las células microbianas luego de ser administrado por vía intravenosa o de manera tópica,

2) la iluminación del área afectada con luz de longitud de onda apropiada en presencia de oxígeno, que induce la actividad fotodinámica a través de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS por su denominación en inglés *Reactive Oxygen Species*),

3) la reacción de tales especies con ciertas macromoléculas de la célula bacteriana, lo que conduce a un daño letal en los microorganismos.^{25,72}

La primera etapa de la inactivación fotodinámica corresponde al tiempo de incubación de las células patógenas con el fotosensibilizador. En el caso de las bacterias, la unión debe ser de unos pocos minutos, independientemente del tipo de estructura del agente fototerapéuticos que se emplee. Este paso es de suma importancia debido a que la dosis de fotosensibilizador es del orden micromolar. Así, a estas concentraciones y a cortos

tiempos no hay acumulación significativa de estas moléculas en las células mamíferas del huésped.⁷³



Esquema 4. Etapas de la inactivación fotodinámica para el tratamiento de tejidos infectados.

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 fotosensibilizador. Posteriormente, se producen ROS que dan lugar a una disminución de la flora microbiana sin producir un daño apreciable en el tejido del huésped, lo que consiste en la tercera etapa de la PDI.^{74,75}

La selectividad del fotosensibilizador por las células microbianas, se demostró experimentalmente por investigaciones *in vitro*.⁷⁶ Los fibroblastos y queratinocitos, algunos de los componentes más frecuentes de tejidos humanos, no muestran ningún daño en condiciones de irradiación que provocan una disminución de 5 log en la supervivencia de los agentes infecciosos bacterianos típicos, tales como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* resistentes a la meticilina. Por otra parte, tejidos blandos de ratones infectados con *S. aureus*, se sometieron a PDI causando una disminución de 3 log en la población bacteriana y ocasionando un daño mínimo en el tejido del huésped después del tratamiento.⁷⁷ Por lo tanto, la PDI posee selectividad dual, primero debido a que el fotosensibilizador se acumula preferencialmente en las células de los microorganismos, y en segundo lugar, porque se irradia sólo la zona afectada.⁷⁸

Las condiciones óptimas de la PDI para producir una disminución drástica en el número de agentes patógenos y ocasionar un daño mínimo en los tejidos del huésped, se resumen en la Tabla 1.¹⁷

Tabla 1. Condiciones óptimas para producir inactivación fotodinámica ocasionando un daño mínimo en las células huésped.

<i>Parámetro</i>	<i>Condiciones óptimas</i>
<i>Estructura química del fotosensibilizador</i>	Fenotiazinas, ftalocianinas, derivados de fullerenos C ₆₀ y porfirinas catiónicas
<i>Factores estructurales que mejoran la actividad antimicrobiana</i>	Cadenas hidrocarbonadas, polipéptidos catiónicos, factores específicos (anticuerpos)
<i>Tiempo de incubación previa a la irradiación</i>	5 – 10 min (bacterias Gram positivas). Hasta 30 min (bacterias Gram negativas y hongos)
<i>Concentración del fotosensibilizador</i>	0,1 – 5 µM
<i>Fluencia</i>	Menor a 50 mW cm ⁻²
<i>Tiempo de irradiación</i>	Menor a 30 min (10 J cm ⁻²)

1.3.2. Efecto fotodinámico en microorganismos

Diferentes estudios indican que la PDI es una metodología adecuada y eficiente para el tratamiento de infecciones microbianas localizadas, incluyendo aquellas que se han vuelto crónicas después de tratamientos prolongados.^{17,22,79} En tal sentido, podemos mencionar un importante número de características favorables y beneficios:

- Posibilidad de desarrollar tratamientos que actúan de manera eficiente contra la mayoría de los patógenos microbianos, incluyendo bacterias Gram positivas y negativas, levaduras, hongos, virus, protozoos y parásitos.^{25,80,81}
- Alta susceptibilidad mostrada por un gran número de cepas microbianas sin aparición de especies resistentes, incluso después de múltiples tratamientos.^{82,83} Esto se debe a que el daño producido en las células por las ROS ocurre a través de un mecanismo de muerte inespecífica en comparación con los antibióticos que generalmente inhiben una enzima específica.^{84,85}
- Bajo riesgo de inducir efectos genotóxicos y mutagénicos tanto en las células huésped como en las microbianas.⁷²
- Posibilidad de ser aplicada sola o combinada con otros antibióticos.⁸⁶
- Selectividad del agente por el microorganismo. El patógeno es inactivado con una concentración de fotosensibilizador y con una dosis de luz, mucho más baja que las necesarias para un efecto similar en células eucariotas.⁸⁷ Además, pueden sintetizarse fotosensibilizadores con determinadas características estructurales, que permiten desarrollar interacciones y/o comportamientos específicos con el entorno microbiano

objetivo y no con los tejidos eucariotas, aumentando así, la selectividad del tratamiento (Sección 1.3.1.).

- Rápida velocidad de acción de la PDI, en comparación con los antibióticos que normalmente requieren muchos días o semanas para ser eficaces, facilitando la mutación microbiana y la consecuente generación de resistencia a los fármacos.⁸⁸

- 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.⁸⁹

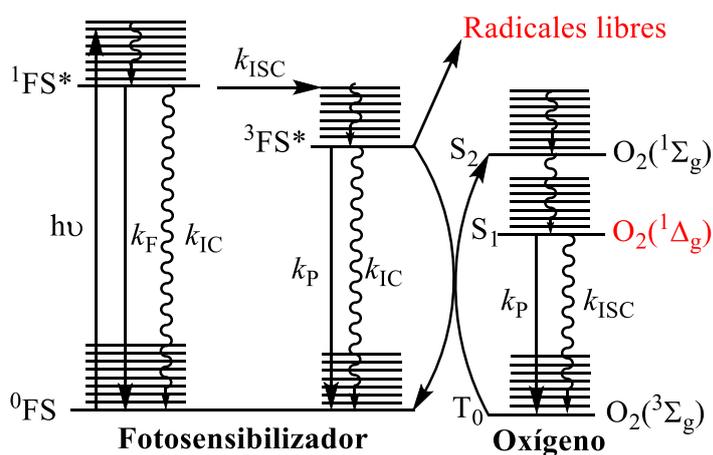
- Capacidad de inactivar especies resistentes a múltiples fármacos incluso de una manera más eficaz que a las cepas nativas.⁸⁸

Por todas las ventajas descriptas previamente, la PDI se ha convertido en una terapia emergente y prometedora, siendo probable que en un futuro se convierta en una opción terapéutica convencional. No obstante, este tipo de tratamiento está en pleno desarrollo y es necesario continuar con las investigaciones para encontrar fotosensibilizadores eficientes.

1.3.3. Mecanismos de fotosensibilización

El proceso básico por el cual la combinación de un fotosensibilizador (FS), luz y oxígeno resulta en un daño biomolecular se ilustra en los Esquemas 5 y 6. Inicialmente, el estado fundamental (^0FS) es un estado singlete, es decir, tiene un par de electrones apareados con espines opuestos en un orbital molecular.²² Cuando es excitado con luz de longitud de onda apropiada, uno de sus electrones es promovido desde el orbital molecular más alto ocupado (HOMO) hacia el orbital molecular de menor energía desocupado (LUMO) u otros estados de mayor energía. Durante este proceso el electrón conserva su espín. Este estado de excitación, es conocido como estado excitado singlete ($^1\text{FS}^*$) y es de corta vida, generalmente del orden de unos nanosegundos.²² El $^1\text{FS}^*$ puede perder su energía de excitación por la emisión de un fotón (proceso conocido como fluorescencia) o por una relajación vibracional no radiativa que convierte la energía interna en calor (conocido como conversión interna o CI). Además, desde tal estado puede ocurrir un entrecruzamiento de sistemas (ISC por sus siglas en inglés *InterSystem Crossing*) al estado excitado triplete ($^3\text{FS}^*$) debido a un acomplamiento espín-órbita.²² En este estado, la energía del FS puede disiparse por un proceso radiativo denominado fosforescencia (k_p) o por un decaimiento térmico no radiativo. El estado triplete excitado tiene un tiempo de

vida más largo que el singlete (del orden de micro y milisegundos) debido a que el electrón en el LUMO posee un espín paralelo al del HOMO. Por lo tanto, el electrón en el estado excitado no puede volver tan fácilmente a su estado fundamental, ya que es un proceso prohibido por espín y violaría el principio de exclusión de Pauli.²² Todos los procesos antes explicados se muestran en el Esquema 5.

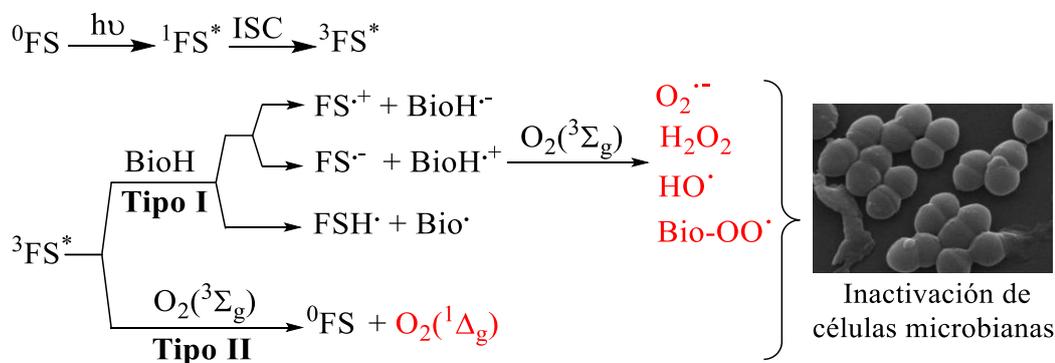


Esquema 5. Diagrama de Jablonski modificado para un fotosensibilizador.

La fotoactivación del fotosensibilizador puede conducir a dos tipos de reacciones fotoquímicas, una de las cuales involucra la generación de radicales libres con la posterior formación de ROS en presencia de oxígeno molecular, $O_2(^3\Sigma_g)$ (reacción fotoquímica tipo I, Esquema 6) y la otra la formación de oxígeno molecular en estado excitado de menor energía singlete, $O_2(^1\Delta_g)$ (reacción fotoquímica tipo II, Esquema 6).^{65,90}

En ambos mecanismos fotoquímicos, el fotosensibilizador en el estado fundamental (0FS) es excitado por la luz a un estado 1FS seguido por un entrecruzamiento de sistema (ISC) a un estado $^3FS^*$. En el proceso tipo I, el $^3FS^*$ puede reaccionar con un sustrato de origen biológico, BioH, para producir iones radicales o radicales libres a través de reacciones de transferencia de electrones o de protones. La transferencia de electrones entre el fotosensibilizador y el sustrato está controlada por los potenciales de oxidación y de reducción relativos de las dos especies.¹⁷ La mayoría de estos radicales reaccionan instantáneamente con $O_2(^3\Sigma_g)$ generando radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (HO^{\cdot}).^{80,91} Estos intermediarios son capaces de oxidar a una gran variedad de biomoléculas y por lo tanto, ocasionar la muerte de los microorganismos. Aunque el H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ son especies tóxicas, se presume que el proceso

oxidativo del mecanismo tipo I se debe principalmente al HO[•]. En la actualidad, se cree que HO[•] se puede generar directamente, ya sea por transferencia de electrones o de protones desde ³FS* al O₂(³Σ_g). Al igual que el H₂O₂, el HO[•] puede atravesar fácilmente las membranas biológicas produciendo daños en las células microbianas.⁹²



Esquema 6. Mecanismos de acción fotodinámica tipo I y II.

Por otro lado, en la reacción fotoquímica tipo II, el ³FS* transfiere su energía al O₂(³Σ_g) formando O₂(¹Δ_g). La larga vida del ³FS* le permite reaccionar con el oxígeno en su estado fundamental y ocasionar el daño oxidativo característico de la PDI.⁹³ El rendimiento cuántico de producción de O₂(¹Δ_g) (Φ_Δ) por parte del FS es un parámetro importante para evaluar su potencial aplicación en PDI. En principio, ¹FS* y ³FS* podrían generar O₂(¹Δ_g), sin embargo debido a que el tiempo de vida de ¹FS* es relativamente corto, se supone que ³FS* es la especie responsable de la producción del O₂(¹Δ_g). El valor de Φ_Δ depende de las condiciones experimentales utilizadas en la determinación, como lo son el tipo de solvente y las características del fotosensibilizador.⁶⁵

Los dos mecanismos de fotosensibilización pueden ocurrir simultáneamente y la relación entre ambos depende del fotosensibilizador, el sustrato y la naturaleza del medio.⁹⁴⁻⁹⁶ En aquellos sistemas en los cuales la concentración de oxígeno molecular es baja, el mecanismo de fotorreacción es principalmente el tipo I, mientras que cuando el medio es oxigenado adquiere importancia la formación de O₂(¹Δ_g).⁹⁷ Cuando el fotosensibilizador utilizado posee características hidrofóbicas, se ubica principalmente en la membrana celular en donde la concentración de oxígeno es relativamente alta. En este caso, el mecanismo tipo II es el principal responsable de la acción fotodinámica. Así mismo, la transferencia de electrones entre el ³FS* y un sustrato de origen biológico adecuado (BioH), mediante reacciones del tipo I, es favorecida en solventes polares. Por el contrario, los solventes poco polares benefician las fotorreacciones del tipo II.⁹⁵ Sin

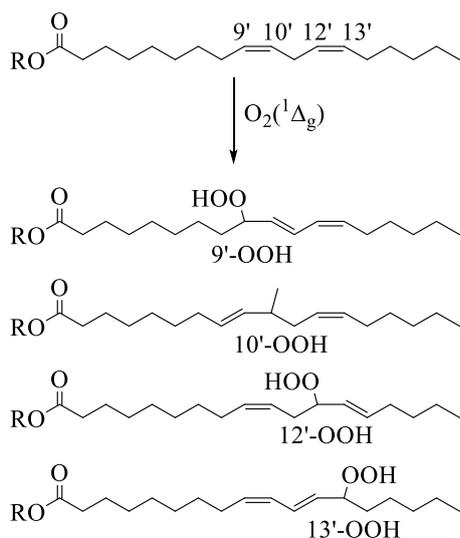
embargo, la presencia de $O_2(^3\Sigma_g)$ es fundamental para que cualquiera de los dos procesos tenga lugar, por lo que ambientes de hipoxia pueden poner en riesgo la eficacia de la PDI.⁷⁵

1.3.4. Reacciones del oxígeno molecular singlete

Las reacciones entre el $O_2(^1\Delta_g)$ y los dobles enlaces de estructuras macromoleculares cíclicas, pueden dividirse en tres categorías de reacciones de adición.²² La primera es la reacción eno, mediante la cual el $O_2(^1\Delta_g)$ se añade a un carbono de un doble enlace, desplazando el mismo a un carbono vecino y formando un hidroperóxido.⁹⁸ En segundo lugar, el $O_2(^1\Delta_g)$ puede participar en cicloadiciones de Diels-Alder, dando como resultado la formación de endoperóxidos puenteados.⁹⁹ El tercer tipo, es la adición del $O_2(^1\Delta_g)$ a un doble enlace carbono-carbono para formar un anillo inestable de 1,2-dioxetano.²²

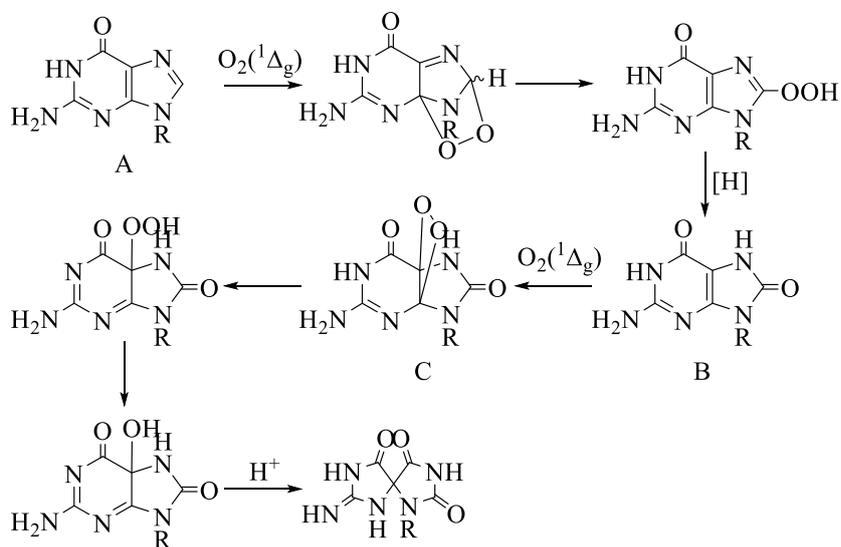
El $O_2(^1\Delta_g)$ puede reaccionar con las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos, específicamente con tirosina, histidina y triptófano. Además, reacciona con los aminoácidos cisteína y metionina para formar varios sulfóxidos debido a las relativamente altas densidades de electrones que poseen los restos de azufre.¹⁰⁰ El $O_2(^1\Delta_g)$ también puede conducir a la extensa carbonilación de proteínas y es responsable de la destrucción de grupos prostéticos (por ejemplo, el hemo en la catalasa).^{101,102} Además, lleva a cabo reacciones de tipo eno con lípidos insaturados para formar hidroperóxidos. Reacciona con el colesterol para dar lugar a hidroperóxidos,¹⁰³ y con componentes del ácido desoxirribonucleico (ADN), particularmente con guanina y timina (nucleósidos de purina) para producir endoperóxidos inestables y altamente reactivos.¹⁰⁴ Todas estas reacciones, inducen daños en ciertas biomoléculas, lo que conlleva a una pérdida de sus funciones biológicas conduciendo a la inactivación celular.¹⁰⁵

En el Esquema 7 se muestra la reacción entre el $O_2(^1\Delta_g)$ y el ácido linoleico.¹⁰⁶ Este proceso de peroxidación de lípidos se lleva a cabo a través de una reacción eno que da lugar a la formación de un hidroperóxido alílico, con un cambio concertado de un doble enlace. El $O_2(^1\Delta_g)$ puede agregar el grupo funcional $-OOH$ en las posiciones 9', 10', 12' o 13'.^{107,108}



Esquema 7. Peroxidación del ácido linoleico mediada por $O_2(^1\Delta_g)$.

En el Esquema 8 se observa el mecanismo de oxidación de la guanina a través de una reacción de cicloadición [2+4] producida por el $O_2(^1\Delta_g)$, que da como producto final 8-oxoG (B).¹⁰⁹ Este último compuesto, también es susceptible a la oxidación con $O_2(^1\Delta_g)$ dando lugar a la formación del diojetano (C) por medio de una reacción de cicloadición [2+2].



Esquema 8. Mecanismo de fotooxidación de guanina.

1.4. Fotosensibilizadores para PDI

Los fotosensibilizadores son moléculas capaces de excitarse por la absorción de radiación y transferir la energía a otras moléculas. En cuanto a los aspectos químicos, los

requisitos y propiedades más importantes que deben caracterizar a un fotosensibilizador para lograr una actividad fotodinámica efectiva son:^{60,61}

- Un proceso de síntesis adecuado.
- Alta pureza química.
- Un alto coeficiente de extinción molar (ϵ , $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), principalmente en aquellas longitudes de onda a las cuales la luz penetra más profundamente en los tejidos, que es llamada la ventana fototerapéutica (600-800 nm). Para erradicar infecciones superficiales, la luz azul (400-420 nm) intensamente absorbida puede resultar muy útil.^{110,111}

- Un tiempo de vida largo del estado excitado triplete ($\tau^3 > 1 \mu\text{s}$) para producir eficientemente ROS.^{112,113}

- Un rendimiento cuántico de formación de triplete (Φ_T) alto para favorecer la generación de ROS.⁷⁵

- Energía del estado triplete apropiada ($E_T > 95 \text{ kJ/mol}$) para transferir eficientemente la energía al estado fundamental del oxígeno y producir $O_2(^1\Delta_g)$.¹¹⁴

- Fotoestabilidad. El efecto fotodinámico puede ser incompleto si el fotosensibilizador se descompone rápidamente. Sin embargo, la degradación del mismo con la luz permite eliminarlo del organismo huésped o del medio.¹¹⁵

- El fotosensibilizador debe encontrarse en la célula en estado monomérico principalmente. Si está agregado, cambian sus propiedades fotofísicas y como consecuencia, disminuye su capacidad para producir el daño fotodinámico.^{116,117}

- Solubilidad en fluidos biológicos. En caso contrario, debe poder transportarse a la zona de la infección utilizando algún tipo de formulación y/o vehículo de transporte (liposomas, emulsiones, ciclodextrinas, glóbulos rojos, nanopartículas).¹¹⁸⁻¹²²

- Gran habilidad para inducir la muerte microbiana. Un buen sensibilizador debe producir una inactivación celular eficiente, aún a bajas dosis de luz irradiada.^{60,123}

Además, el fotosensibilizador ideal debería cumplir con ciertas características biológicas, tales como:

- Localización y retención selectiva en células patógenas. 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.

- Mínima toxicidad en ausencia de luz. El fotosensibilizador debe presentar baja citotoxicidad en ausencia de luz, lo que contribuye a la selectividad del tratamiento.

- Posibilidad de identificar una ventana terapéutica que permita una extensa mortalidad de los patógenos microbianos y que implique un daño mínimo de los constituyentes del tejido del huésped.¹²⁴

- Los mecanismos involucrados en la fotoinactivación de células no deben producir procesos mutagénicos ni dar lugar a cepas microbianas resistentes a la acción fotodinámica.^{30,31}

- Un amplio espectro de acción sobre bacterias, hongos, levaduras, protozoos y parásitos, con el fin de producir un efecto terapéutico eficaz al tratar aquellas enfermedades infecciosas que se caracterizan por la presencia de una flora heterogénea.¹²⁵

- Capacidad bactericida para evitar el crecimiento de microorganismos patógenos después del tratamiento. En caso de que el sensibilizador sea bacteriostático, es posible repetir la PDI tras la recurrencia de la infección.¹²⁶

- Rápida eliminación del fármaco y mínima fotosensibilidad cutánea.

- Localización del fotosensibilizador preferentemente en la membrana citoplasmática debido a que contiene componentes que reaccionan con ROS, como lípidos insaturados y proteínas, que serán los principales objetivos en el proceso de fotoinactivación. Como consecuencia, la muerte celular será predominantemente debida a un daño en la membrana en lugar de implicar el material genético.^{17,127}

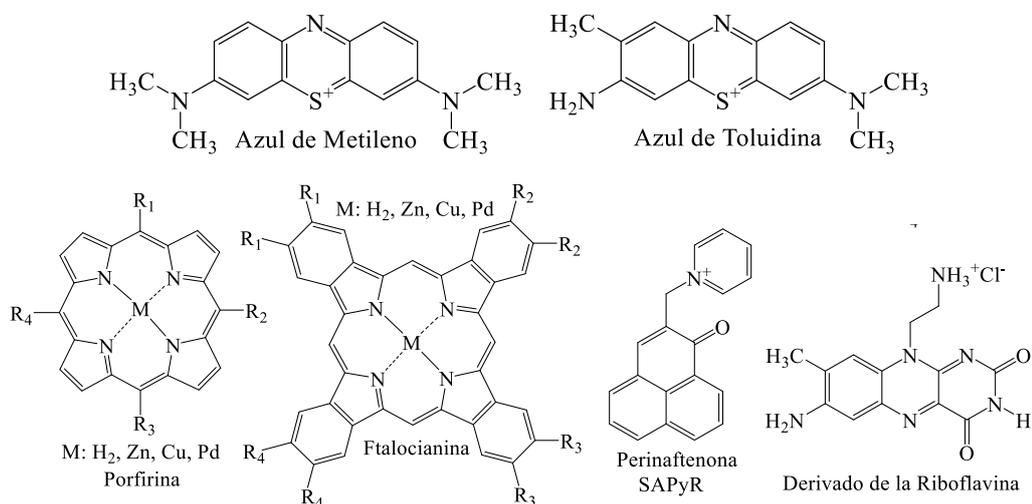
- Tipo y número de cargas: Debido a que los fotosensibilizadores que tienen una carga catiónica intrínseca resultaron capaces de fotoinactivar muchas clases de microorganismos, se concluyó que la presencia de cargas positivas era crucial para lograr efectos antimicrobianos de amplio espectro.²⁶ Aunque los fotosensibilizadores neutros y aniónicos son capaces de matar bacterias Gram positivas, las bacterias Gram negativas necesitan fotosensibilizadores con cargas positivas que les permita unirse y penetrar la barrera de permeabilidad exterior compuesta por lipopolisacáridos cargados negativamente.¹²⁸ Algunos estudios han demostrado que un alto número de cargas positivas hacen que el fotosensibilizador sea muy eficiente contra bacterias Gram negativas, pero un menor número de estas son mejores para matar bacterias Gram positivas y hongos.^{39,129} Por lo tanto, la mejor estructura para un fotosensibilizador antimicrobiano de amplio espectro, probablemente implique un cuidadoso equilibrio entre el número de cargas positivas y el carácter hidrofóbico de la molécula.^{130,131} Otra posibilidad es unir o

encapsular una molécula de fotosensibilizador no catiónico a un vehículo cargado positivamente. Estos pueden ser ciertos polímeros, tales como: polilisina,¹³¹ polietilenimina,¹³² liposomas catiónicos,¹³³ o nanopartículas con cargas positivas.¹³⁴⁻¹³⁶

Varios agentes fotosensibilizadores producen una inactivación eficaz de al menos una clase de patógeno microbiano.^{19,79,82,137,138} El azul de metileno y de toluidina son dos de los fotosensibilizadores más antiguos empleados para la PDI resultando eficientes para matar un amplio rango de microorganismos (Esquema 9). Pertenecen a la familia de las fenotiazinas y se caracterizan por una estructura aromática heterocíclica.¹³⁹ Para volver a estas moléculas más eficientes en su accionar, se han realizado diferentes modificaciones químicas en sus estructuras a través de distintas metodologías de síntesis.^{140,141} Otra familia de compuestos empleados, son los macrociclos aromáticos como las porfirinas y las ftalocianinas. Estas moléculas han demostrado ser muy eficientes para erradicar microorganismos siempre y cuando estén cargadas positivamente.¹⁴⁰ Además, cuando poseen el metal cinc coordinado en su estructura su eficacia se ve aumentada.¹²⁸ También se han estudiado moléculas con estructuras muy similares a las porfirinas llamadas clorinas y bacterioclorinas, las cuales tiene altos coeficientes de extinción molar en la región visible del espectro electromagnético y un mayor número de enlaces saturados.^{138,142} Por otro lado, las perinaftenonas también se han empleado para la PDI, las cuales son cetonas aromáticas con rendimientos de producción de oxígeno singlete cercanos a la unidad, por lo que sólo actúan mediante un mecanismo de acción fotodinámico tipo II.¹⁴³ Dentro de esta familia de compuestos, la estructura molecular mostrada en el Esquema 9 ha sido muy eficiente para la erradicación de biofilms de microorganismos patógenos.¹⁴⁰ Distintos derivados de la riboflavina (vitamina B2) también han sido empleados para la PDI dado que se activan con luz ultravioleta para generar ROS.¹⁴⁴ Esta clase de moléculas, se han estudiado para inactivar bacterias creciendo en la sangre.¹⁴⁴ Otro fotosensibilizador obtenido de la naturaleza es la cumarina, moléculas que actúan como metabolitos secundarios en un grupo reducido de plantas. Debido a su baja solubilidad en agua, estas moléculas han sido modificadas mediante síntesis orgánica y de esta manera se obtuvieron compuestos con un alto contenido en grupos oxidrilos.¹⁴⁵

A pesar de la amplia gama de fotosensibilizadores diseñados y estudiados, no existe el fotosensibilizador perfecto que reúna todas las características para actuar idealmente en la PDI. Es por esto que se continúa estudiando e investigando distintos compuestos con diversas características. Es en esta búsqueda, que en los últimos años surge el interés por el

fullereno C_{60} y sus derivados. Estas estructuras presentan algunas de las propiedades y características de las descritas previamente para los fotosensibilizadores, por lo que emergieron como compuestos prometedores e interesantes para ser utilizados como potenciales agentes fotosensibilizadores en PDI.

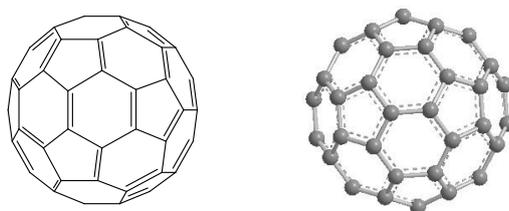


Esquema 9. Estructuras moleculares de los fotosensibilizadores empleados en PDI.

1.5. Derivados del fullereno C_{60}

1.5.1. Propiedades generales

Desde su descubrimiento¹⁴⁶ y aislamiento¹⁴⁷ los fullerenos (originalmente buckminsterfullerenos) han atraído la atención de un gran número de científicos. La forma más abundante de estos compuestos es el C_{60} . Esta molécula está constituida por 60 átomos de carbono dispuestos en una estructura esférica, de forma similar a una pelota de fútbol (Esquema 10). Se trata de una organización estructural conocida como icosaedro truncado, que contiene 12 pentágonos y 20 hexágonos, en los cuales, cada átomo de carbono se encuentra unido a otros tres átomos adyacentes por medio de hibridación sp^2 .¹⁴⁸



Esquema 10. Representaciones estructurales del fullereno C_{60} .

Las características químicas y físicas de esta nanoestructura, junto con su forma esférica, han despertado gran interés para su utilización en diferentes campos científicos-tecnológicos, como en química de materiales, nanotecnología, biología, entre otros.¹⁴⁹⁻¹⁵²

Los anillos aromáticos condensados presentes en el compuesto generan una conjugación extendida de orbitales moleculares que causan una absorción significativa de la luz visible. También, su gran afinidad electrónica, que le permite aceptar hasta seis electrones, hace del fullereno un buen candidato como aceptor de electrones.¹⁵³

Debido al creciente interés en la aplicación médica y nanotecnológica de los fullerenos, estas moléculas han ganado considerable atención como posibles fotosensibilizadores para mediar en la PDI de diversas enfermedades.^{154,155} Los fullerenos presentan algunas ventajas interesantes con respecto a los FS más convencionales. Son más fotoestables en comparación con FS derivados de tetrapirroles y colorantes sintéticos. Además, los C₆₀ producen ROS mediante ambas vías fotoquímicas, como la tipo I (radicales libres) y tipo II (O₂(¹Δ_g)), mientras que los FS tetrapirrólicos muestran en gran medida sólo producción a través de la vía fotoquímica tipo II.

En los últimos años, derivados de fullereno C₆₀ se evaluaron como fotosensibilizadores potenciales para inactivar microorganismos.^{156,157} Los fullerenos catiónicos resultaron ser fotosensibilizadores activos en un amplio espectro antimicrobiano, incluyendo principalmente bacterias y hongos.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸ Además, estas estructuras han mostrado un alto nivel de selectividad por los microorganismos con respecto a las células de mamífero, debido a que dichos fullerenos son incorporados lentamente en el último tipo de células por un proceso de endocitosis, dependiente del tiempo.¹⁵⁹

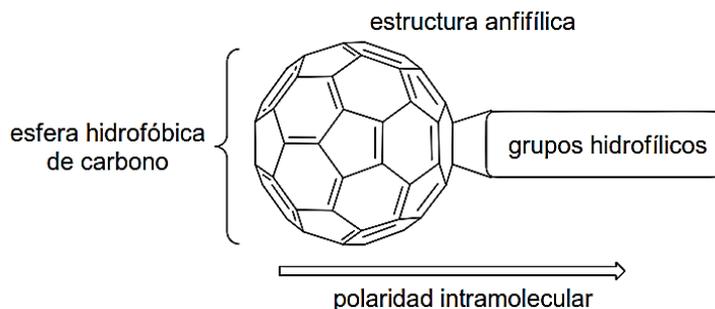
Un inconveniente importante para la aplicación de los C₆₀ como fotosensibilizadores es la baja solubilidad que presentan en disolventes polares y la consiguiente formación de agregados en soluciones acuosas y medios biológicos, perjudicando la generación de una fotoactividad eficiente.¹¹⁷

Se han desarrollado diferentes métodos para lograr la transferencia de fullerenos al agua. Uno de ellos se basa en la simple adición del C₆₀ seco al agua agitando vigorosamente la mezcla durante un período prolongado.¹⁶⁰⁻¹⁶² A pesar de que este método puede utilizarse para investigar el comportamiento del C₆₀ en agua, se forman grandes agregados y sólo permite bajas concentraciones de C₆₀. También, puede utilizarse el método de intercambio de disolvente, en donde se utiliza un disolvente orgánico volátil y

miscible con agua, para disolver el C_{60} . Luego se añade agua y se evapora el disolvente, formando los agregados del fullereno en suspensión de agua.¹⁶³ Alternativamente, la transferencia de fullereno se puede realizar mediante la disolución de C_{60} en un disolvente orgánico inmisible en agua, y la aplicación de ultrasonido mientras el disolvente orgánico es evaporando.¹⁶⁴ En todos estos métodos, la estructura del fullereno no se modifica y el núcleo de la molécula puede colisionar libremente con las moléculas de agua. Otra metodología muy utilizada, es la incorporación de fullerenos en estructuras supramoleculares solubles en agua, como pueden ser: surfactantes, liposomas, ciclodextrinas, nanopartículas, etc.¹⁶⁵⁻¹⁶⁸ En estos casos el fullereno forma complejos de inclusión con la estructura supramolecular, sin entrar en contacto con el agua.

Sin embargo, el desarrollo de la química covalente del C_{60} ha abierto la posibilidad de derivatizar la estructura esférica con distintos grupos funcionales, permitiendo mejorar su solubilidad en agua y disolventes biológicos, y así incrementar notablemente la utilidad biológica.¹⁶⁹⁻¹⁷¹ Esta metodología basada en la modificación química de la esfera del C_{60} , conduce a la formación de una amplia variedad de derivados, que poseen diferentes propiedades físicas y químicas. Diversas cadenas laterales hidrófilas, anfifílicas, o estructuras de anillos condensados se han unido al núcleo esférico del C_{60} . Esta funcionalización imparte una mayor capacidad para producir oxígeno singlete, radicales hidroxilo y anión radical superóxido en el medio biológico a partir de la iluminación.¹⁵⁷

Principalmente, los fullerenos se han modificado químicamente o funcionalizado por la introducción de sustituyentes con el fin de adquirir mayor solubilidad en medios biológicos. Los derivados de fullereno recientemente reportados se diseñaron para que presenten naturaleza anfifílica, de acuerdo con la estructura general que se muestra en el Esquema 11.



Esquema 11. Estructura anfifílica de fullerenos.

También, las modificaciones en las estructuras de los fullerenos se realizaron para obtener un aumento de la eficiencia y la selectividad de los agentes. La combinación de sustituyentes hidrófobos e hidrófilos en la estructura del fotosensibilizador resulta en la formación de un eje de polaridad intramolecular. Este efecto puede facilitar la penetración de la membrana celular y producir una mejor acumulación del fotosensibilizador en el entorno biológico, mejorando la eficacia de la fotosensibilización.¹⁷²

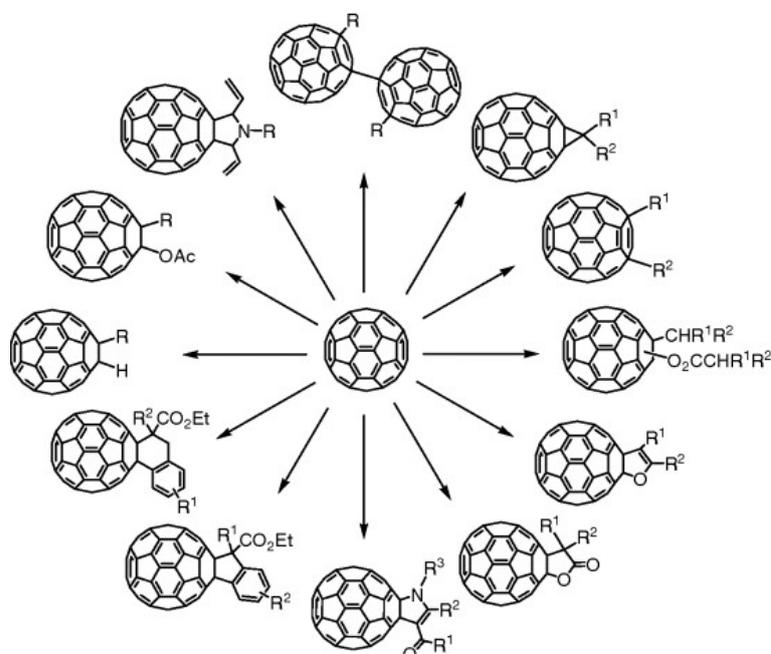
1.5.2. Obtención de fullereno C₆₀

En 1990, W. Krätschmer y D. R. Huffman desarrollaron una metodología simple y eficiente para producir fullerenos en cantidades de gramos e incluso kilogramos, lo cual impulsó la investigación científica de los fullerenos.^{173,174} En esta técnica, hollín de carbón es generado a partir de dos electrodos de grafito de alta pureza mediante la ignición de una descarga de arco entre ellos en una atmósfera inerte de gas helio. De manera alternativa, el hollín es producido por la ablación láser del grafito o la pirólisis de hidrocarburos aromáticos. Los fullerenos son extraídos del hollín utilizando un procedimiento de múltiples pasos. Primero, el hollín es disuelto en los disolventes orgánicos adecuados. Este paso lleva a una disolución que contiene más del 75% de C₆₀, así como otros fullerenos. Luego, estas fracciones son separadas usando cromatografía.^{173,174} usando hexano como fase móvil y alumina como fase estacionaria. El fullereno C₆₀ es separado del C₇₀ dando lugar a una fracción color magenta y otra roja, respectivamente.^{173,174} Sin embargo, la purificación del fullereno siguió siendo un desafío para los científicos hasta que un equipo de investigadores españoles desarrolló una nueva metodología de obtención.¹⁷⁵ Esta se basa en un proceso de ciclodeshidrogenación de alta calidad catalizado por una superficie. Después de depositar el compuesto aromático de partida sobre una superficie de platino y al calentar a 750 K, los precursores se transforman en la correspondiente molécula de fullereno C₆₀ con un rendimiento de aproximadamente el 100%. Este procedimiento de obtención presenta ciertas ventajas. Por un lado, es posible sintetizar especies inusuales del fullereno como por ejemplo, triazafullerenos con tres cargas positivas (C₅₇N₃)¹⁷⁶ Además, si el proceso se lleva a cabo en una atmósfera que contiene otras especies, éstas se pueden encapsular para formar fullerenos endohédricos.

1.5.3. Síntesis de derivados del fullereno C₆₀

El principal objetivo de la química del fullereno es la síntesis de derivados estables, caracterizables y de estructura bien definida. En este sentido, diferentes aproximaciones sintéticas han dado excelentes resultados. En el Esquema 12 se muestran algunas reacciones generales que han conducido a la obtención de distintos derivados del fullereno C₆₀.

Debido a la pobre deslocalización electrónica de su estructura, el C₆₀ es una molécula con una elevada reactividad, comportándose como una poliolefina o alqueno deficiente de electrones, experimentando una gran variedad de reacciones químicas.¹⁷⁷ Dentro de éstas, las más importantes y utilizadas son las reacciones de cicloadición, en donde el C₆₀ reacciona con diversos nucleófilos.¹⁷⁸

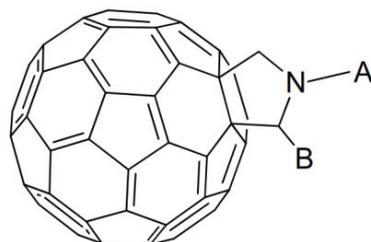


Esquema 12. Vías de síntesis y derivatización del fullereno C₆₀.

Una de las cicloadiciones más utilizadas para generar derivados del fullereno, es la reacción de cicloadición [3+2] desarrollada por Prato *et al.*,¹⁵³ llevada a cabo a partir de iluros de azometino y C₆₀. Esta vía conduce a la obtención de fulleropirrolidinas, derivados en los que un anillo de pirrolidina se encuentra fusionado a un enlace [6,6] del fullereno (Esquema 13).

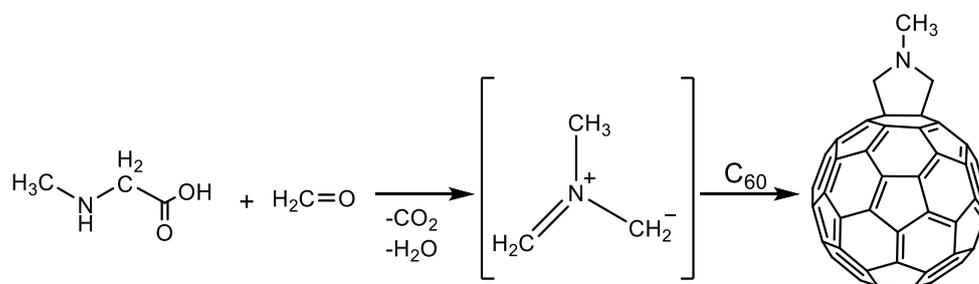
La gran variedad de iluros de azometino sustituidos que pueden generarse a partir de productos de partida fácilmente accesibles, junto con la elevada reactividad de estas

especies con olefinas pobres en electrones como el C_{60} , permite la obtención de fulleropirrolidinas altamente funcionalizadas con relativa facilidad.¹⁷⁹



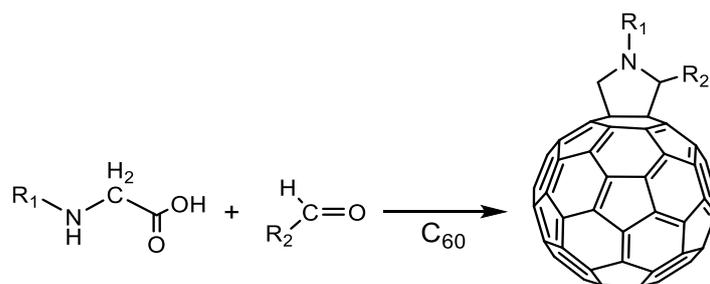
Esquema 13. Representación estructural de derivados de fulleropirrolidinas.

Uno de los procedimientos más versátiles y ampliamente utilizados para generar iluros de azometino es el denominado "método de descarboxilación", que consiste en la generación *in situ* del 1,3-dipolo intermediario, mediante descarboxilación de las sales de iminio, resultantes de la condensación de aldehídos con aminoácidos. En el Esquema 14 se muestra su versión más simple, que implica la reacción entre *N*-metilglicina (sarcosina), formaldehído y C_{60} en tolueno a reflujo. Esta reacción conduce a la formación del derivado de *N*-metilpirrolidina (1) con un 41% de rendimiento, que puede transformarse en un 82%, si se considera la cantidad de C_{60} que se recupera.^{179,180}



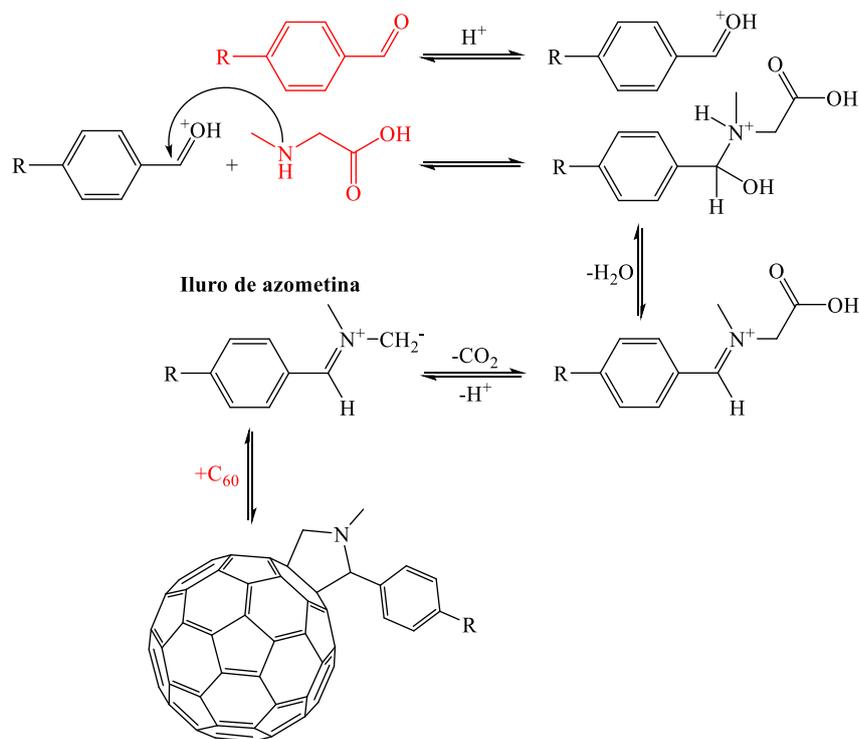
Esquema 14. Síntesis de fulleropirrolidina a partir de la cicloadición [3+2] de iluro de azometino.

El alcance de esta reacción es muy amplio. El uso de un aldehído de partida diferente (también se pueden utilizar cetonas) permite la preparación de 2-sustituidos-*N*-metil-3,4-fulleropirrolidinas.^{156,181} Por otro lado, la condensación de glicinas *N*-funcionalizadas con aldehídos da lugar a fulleropirrolidinas *N*-sustituidas (Esquema 15).^{85,182}



Esquema 15. Síntesis de distintos derivados de fulleropirrolidinas a partir de la cicloadición [3+2] de iluro de azometino.

En el Esquema 16 se ilustra el mecanismo de síntesis de la cicloadición 1,3-dipolar para obtener un derivado del fullereno C_{60} indicándose los reactivos de partida con color rojo.

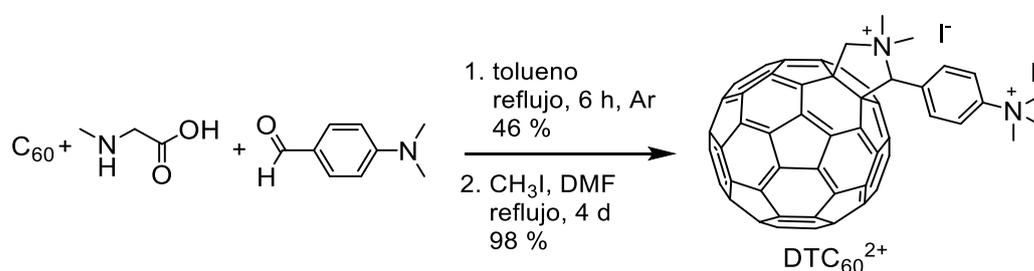


Esquema 16. Mecanismo de síntesis de la cicloadición 1,3-dipolar para obtener derivados del fullereno C_{60} con anillos pirrolidinos.

La adición de iluros de azometino a C_{60} a través de la ruta de descarboxilación es una metodología versátil para la obtención de derivados funcionalizados del fullereno. Las principales ventajas son las siguientes: (1) la reacción conduce principalmente sólo al compuesto correspondiente a la monoación; (2) una amplia variedad de aminoácidos y

aldehídos se encuentran fácilmente disponibles comercialmente; (3) dos cadenas funcionales se pueden introducir simultáneamente. Esto último ofrece la posibilidad de incorporar en un solo paso, tanto la funcionalidad que deseemos combinar con el C₆₀ como un complemento para mejorar la solubilización. Una funcionalidad importante que permite introducir este procedimiento es la de agregarle cargas a los derivados del fullereno obtenidos. Estos pueden ser fácilmente metilados para generar derivados catiónicos, que como se expresó anteriormente, resultan más activos y eficientes para la inactivación microbiana.

Spesia *et al.* sintetizaron un derivado dicatiónico del fullereno C₆₀ utilizando la ruta sintética descrita, formando el compuesto deseado mediante un proceso de dos pasos, como se ilustra en el Esquema 17:¹⁵⁸



Esquema 17. Síntesis de derivado de fulleropirrolidina dicatiónico.

Primeramente, obtuvieron el derivado del C₆₀ neutro mediante la cicloadición 1,3 dipolar del iluro de azometino, y luego mediante una metilación exhaustiva generaron el derivado dicatiónico, obteniendo en ambos pasos buenos rendimientos de los productos.

1.5.4. Propiedades espectroscópicas del fullereno C₆₀ y sus derivados

Los fullerenos se caracterizan por presentar fuertes absorciones en la región UV y bandas más débiles en la región visible.¹⁸³ Como se muestra en la Figura 3, el espectro de absorción de C₆₀ presenta una banda intensa por debajo de los 400 nm (~300 nm, $\epsilon \sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y una banda ancha entre los 450 y 650 nm, centrada a ~550 nm con un $\epsilon \sim 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, responsable del color púrpura del C₆₀.

Cuando el C₆₀ es funcionalizado, se conservan las características espectroscópicas básicas, pero la absorción de los derivados se extiende más hacia la región del IR cercano. En este sentido, las propiedades electrónicas de los fulleropirrolidinas son típicas de la mayoría de los fullerenos monosustituidos.

Análogamente al C_{60} , los espectros electrónicos de tales derivados están dominados por fuertes absorciones en región UV. Además, la absorción en el ultravioleta presenta una pequeña disminución de la intensidad que la correspondiente al fullereno sin sustituir.¹⁸⁴

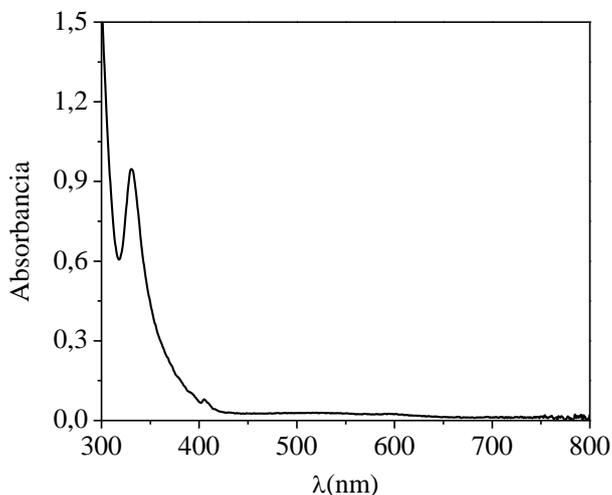


Figura 3. Espectro de absorción de fullereno C_{60} en DMF.

En la región visible, si bien disminuye la intensidad, se observa un rango más amplio de absorción, llegando hasta casi 800 nm, presentando un pico agudo a 430 nm, y una banda más amplia, pero de escasa intensidad, en torno a 700 nm.¹⁸³ En la Figura 4 se muestra el espectro de absorción del derivado del fulleropirrolidina (DTC_{60}^{2+}) cuya síntesis se mostró previamente en el Esquema 17.¹⁵⁸

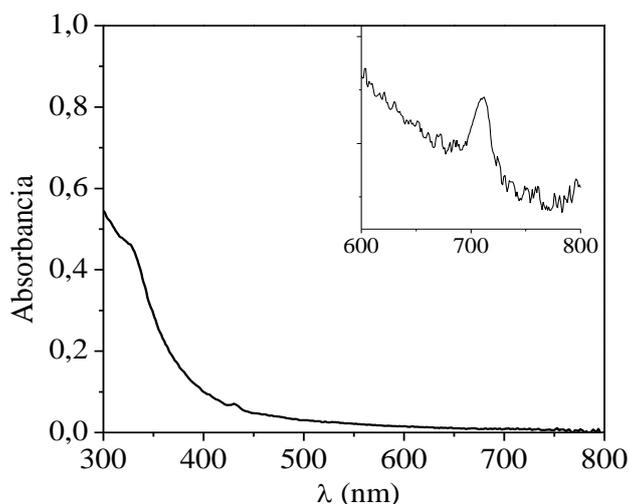


Figura 4. Espectro de absorción UV-vis de DTC_{60}^{2+} en DMF.

Como puede observarse, las principales absorciones se encuentran en la zona ultravioleta y en la región violeta del visible. A medida que se avanza por el espectro, desde la región del visible hacia el infrarrojo, se observa claramente una notoria disminución en las intensidades de absorción. La problemática que esto implica para la aplicación de estos compuestos como fotosensibilizadores se discutirá detalladamente más adelante.

En lo que respecta a la emisión de fluorescencia, los derivados del fullereno C_{60} presentan una escasa emisión con bajo rendimiento cuántico ($1,0 \times 10^{-4}$ - $6,0 \times 10^{-4}$).^{185,186} El espectro de fluorescencia de *N*-metilfulleropirrolidinas se encuentra en excelente acuerdo con su espectro UV-vis.^{184,187} Esto refleja el hecho de que las constantes de fuerza de los niveles de vibración en el primer estado excitado singlete se asemejan a las del estado fundamental singlete. En la Figura 5 se muestra el espectro de emisión del DTC_{60}^{2+} en DMF.¹⁵⁸ Estos espectros muestran una banda centrada en 712 nm, que es característica de fulleropirrolidinas. Teniendo en cuenta el buen acuerdo entre la absorción de más larga longitud de onda y la emisión de longitud de onda más corta, esta banda puede asignarse claramente a la banda de transición 0-0.

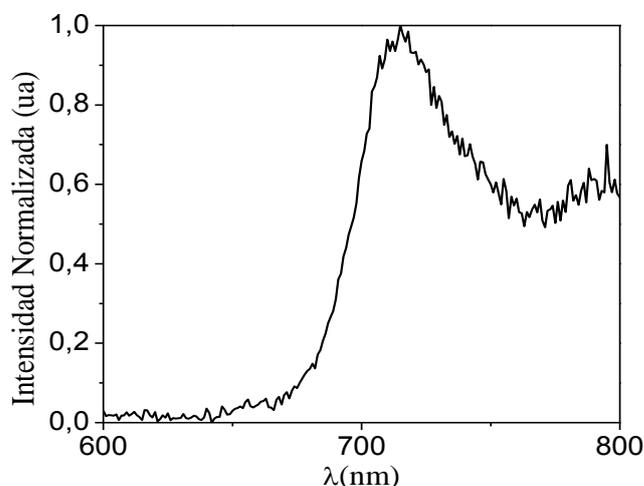


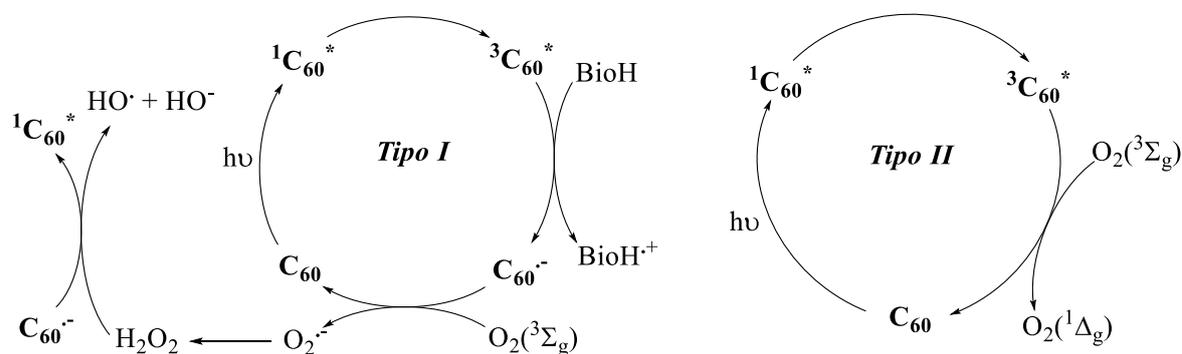
Figura 5. Espectro de emisión de DTC_{60}^{2+} en DMF.

1.5.5. Fotofísica y fotoquímica de fullerenos

Cuando el C_{60} se irradia con luz visible, es excitado de su estado fundamental (${}^0C_{60}$) al estado excitado (${}^1C_{60}^*$), siendo esta última una especie de relativamente corto tiempo de vida ($\sim 1,3$ ns). Además de perder energía por emisión de fluorescencia o conversión interna, el estado ${}^1C_{60}^*$ sufre predominante y rápidamente entrecruzamiento de sistema

(ISC) al estado triplete excitado ($^3C_{60}^*$), de larga vida (50-100 μ s), con un rendimiento cercano a la unidad. Este proceso es un ISC prohibido por spin con una alta constante de velocidad ($5.0 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$), impulsado por un eficiente acoplamiento spin-órbita.^{183,188}

Bajo condiciones aeróbicas, el $^3C_{60}^*$ del fullereno puede interactuar con oxígeno molecular en estado fundamental para formar ROS. Este proceso puede ocurrir por la transferencia de energía desde el $^3C_{60}^*$ para producir oxígeno singlete molecular, $O_2(^1\Delta_g)$, o por la transferencia de electrones para formar el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$).¹⁸⁹ El fullereno C_{60} es un gran generador de oxígeno singlete, con un rendimiento cuántico cercano a la unidad.¹⁹⁰⁻¹⁹² Por otro lado, el $^3C_{60}^*$ o $C_{60}^{\bullet-}$ pueden transferir un electrón al oxígeno molecular formando $O_2^{\bullet-}$. En contraste a la generación de $O_2(^1\Delta_g)$, que predomina en solventes orgánicos, el tipo de reacción de transferencia de electrón tiene lugar preferentemente en solventes polares, especialmente en presencia de agentes reductores tales como el NADH.¹⁹³ Estas dos vías, la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ y $O_2^{\bullet-}$ son análogas a los dos tipos principales de fotoprocesos conocidos como los mecanismos fotoquímicos de tipo II y tipo I, respectivamente, que se describieron anteriormente, y se representan en el Esquema 18.



Esquema 18. Representación esquemática de los mecanismos fotoquímicos tipo I (transferencia de carga) y tipo II (transferencia de energía) de fullereno C_{60} .

Debido al LUMO triplemente degenerado de baja energía, los fullerenos son conocidos por ser excelentes aceptores de electrones. Ellos son capaces de aceptar hasta seis electrones.¹⁹⁴ Existe cierta evidencia de que el fullereno en estados excitados (en particular, el triplete) son aún mejores receptores de electrones que en el estado fundamental.^{183,195} Por esto, se piensa que el triplete del fullereno reducido o el radical anión puede transferir un electrón al oxígeno molecular formando el radical anión superóxido $O_2^{\bullet-}$. Se demostró que el $O_2(^1\Delta_g)$ se genera efectivamente por fotoexcitación

del C_{60} en disolventes no polares, tales como benceno y benzonitrilo, mientras que, $O_2^{\bullet-}$ y HO^{\bullet} se producen en mayor medida en disolventes polares como el agua. También puede formarse peróxido de hidrógeno por dismutación del anión superóxido.

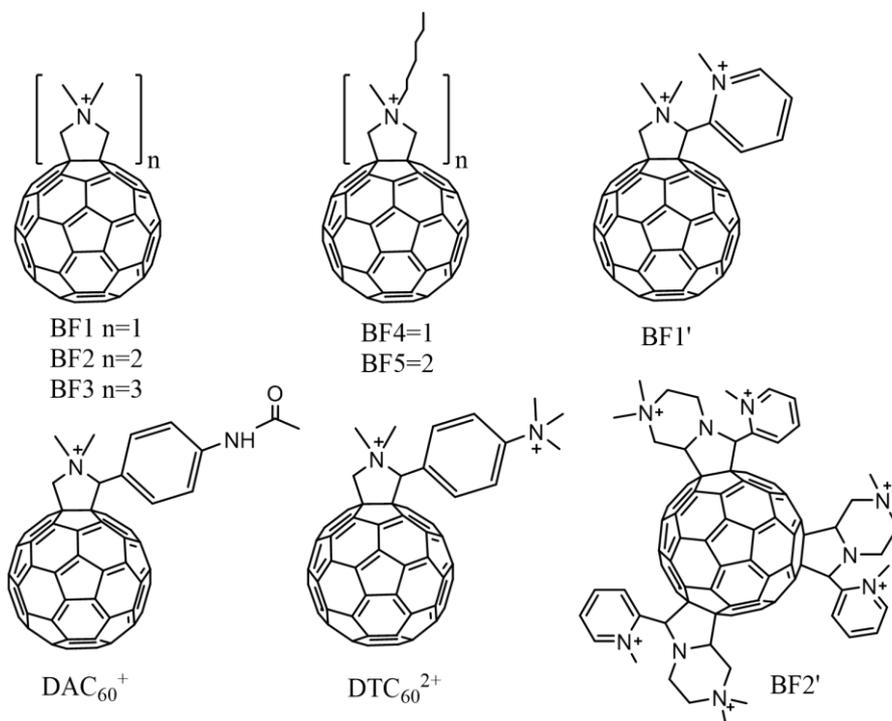
El estudio detallado de las vías mecanísticas preponderantes que generan la PDI por parte de los fullerenos resulta muy útil para entender el comportamiento del fotosensibilizador en medio biológico.^{181,196} En los últimos años, se empezaron a investigar diferentes alternativas que permiten incidir en el comportamiento de estos mecanismos, con el objetivo de lograr una potenciación de la PDI.^{4,197} Estas alternativas se basan principalmente en la adición de diferentes sustratos inorgánicos, los cuales modifican físico-químicamente el comportamiento de alguno de los mecanismos de acción fotodinámica.¹⁹⁸ Esta modificación puede generar una mayor producción de ROS y otras especies reactivas que presenten carácter antimicrobiano, y como consecuencia, una mayor PDI. Recientemente se comprobó que la adición de diferentes sales inorgánicas con aniones dadores de electrones (I^- , SCN^-) genera una potenciación de la inactivación en bacterias.^{199,200} Esto es importante, ya que abre la posibilidad de generar una especie de sinergismo entre el fotosensibilizador y la sal inorgánica, que permita optimizar y aumentar la eficacia de la inactivación microbiana.²⁰¹

Por otro lado, también se realizaron estudios de PDI en presencia de diferentes compuestos y ausencia de oxígeno. Esto resulta importante ya que existen infecciones causadas por bacterias anaerobias presentes en ambientes deficientes de oxígeno. Entonces se buscan las condiciones para que la acción fotodinámica se pueda también llevar a cabo en condiciones anóxicas. En este sentido, se observó que el anión azida (N_3^-) permite generar especies bactericidas en ausencia de oxígeno.²⁰² Sin embargo, debido a la importante toxicidad de una sal de azida, es necesario buscar otras vías menos tóxicas para evaluar la PDI en ambientes deficientes de oxígeno.

1.5.6. Fullerenos C_{60} como fotosensibilizadores en PDI

Diferentes derivados del fullereno C_{60} han mostrado una importante eficiencia como fotosensibilizadores en la PDI *in vitro* de un amplio espectro de microorganismos, principalmente aquellos fullerenos catiónicos con grupos amino-cuaternarios obtenidos por la cicloadición 1,3-dipolar descrita previamente (Esquema 19).^{159,203}

También se evaluaron *in vitro* fullerenos catiónicos sintetizados mediante otras rutas sintéticas como la adición de Bingel, que permite obtener derivados con diferentes características y propiedades.^{88,156}



Esquema 19. Derivados del fullereno C₆₀ empleado como fotosensibilizadores en PDI.

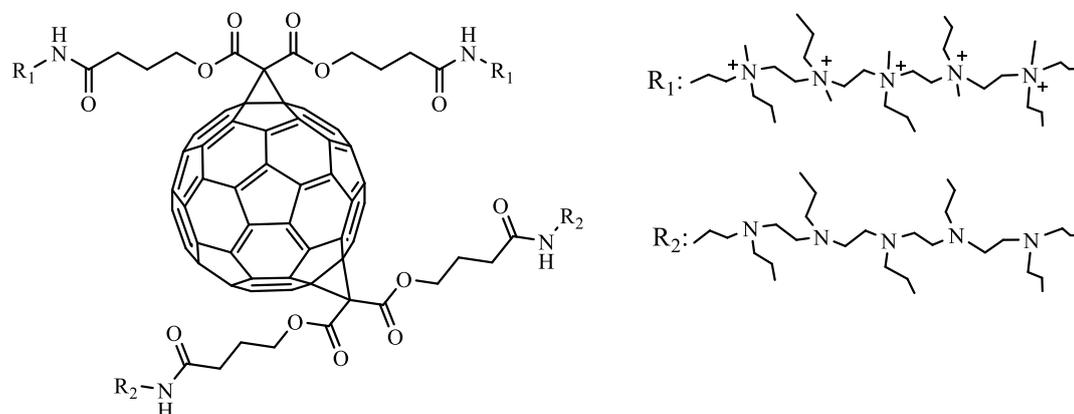
A pesar de los interesantes resultados que arrojaron los estudios *in vitro* realizados para llevar a cabo la PDI de microorganismos, no se han realizado en gran número estudios *in vivo* con fullerenos sobre modelos de infecciones. Una de las razones se debe a la dificultad de monitorear el progreso de la infección y su respuesta al tratamiento. Las técnicas microbiológicas estándar utilizadas para seguir las infecciones en modelos animales, con frecuencia implican el sacrificio de éstos, la eliminación del tejido infectado, la homogeneización, la dilución en serie, la siembra y el recuento de colonias. Estos ensayos utilizan un gran número de animales, consumen mucho tiempo y, a menudo, no son estadísticamente fiables. Para facilitar el proceso de monitoreo, se desarrolló un procedimiento que utiliza bacterias bioluminiscentes genéticamente modificadas y un sistema de imágenes sensibles a la luz para permitir la visualización en tiempo real de las infecciones.²⁰⁴ Cuando estas bacterias se tratan con PDI *in vitro*, la pérdida de luminiscencia es paralela a la pérdida de capacidad de formación de colonias. Se han desarrollado varios modelos de infecciones en heridas y abscesos de tejidos blandos en ratones que pueden ser seguidos por imágenes de bioluminiscencia. El tamaño y la

intensidad de la infección pueden monitorizarse secuencialmente de una manera no invasiva en ratones individuales en tiempo real. Cuando se introduce el fotosensibilizador en el tejido infectado y se ilumina, se observa una pérdida de luminiscencia dependiente de la dosis de luz irradiada. Si la bacteria es invasiva, dicha pérdida se correlaciona con el aumento de la supervivencia de los ratones, mientras que los animales en los grupos de control mueren de sepsis en 5 días. Este enfoque permite que muchos modelos animales de infecciones localizadas sean monitoreados con precisión para determinar la eficacia del tratamiento por PDI *in vivo*.

En 2011 se realizó el primer ensayo de PDI *in vivo* con un fullereno C₆₀ como fotosensibilizador, empleando ratones con heridas infectadas de bacterias patógenas Gram-negativas.¹⁵⁵ El fullereno BF3 (Esquema 19) con tres grupos dimetilpirrolidinio que había resultado ser un eficiente fotosensibilizador antimicrobiano *in vitro*, se evaluó como agente terapéutico *in vivo* en heridas infectadas de dos modelos de ratón. Los ratones fueron contaminados con dos bacterias bioluminescentes, *Proteus mirabilis* y *P. aeruginosa*, en una herida excisional en la espalda del ratón. Se colocó una solución de BF3 en la herida y se irradió con luz visible durante un tiempo determinado. Para ambas bacterias se observó una ligera reducción dependiente de la dosis de la bioluminiscencia de la herida no observada en los grupos control. El tratamiento fotodinámico de los ratones infectados con *P. mirabilis* permitió alcanzar un 82% de supervivencia en comparación con el 8% sin tratamiento. Sin embargo, la PDI de ratones infectados con *P. aeruginosa* no condujo a la supervivencia, pero cuando se combinó el efecto fotodinámico con una dosis subóptima del antibiótico tobramicina se produjo una acción terapéutica sinérgica con una supervivencia del 60%, comparada con una supervivencia del 20% con tobramicina sola.

Recientemente se evaluó la PDI en un modelo de ratón infectado con diferentes microorganismos bioluminiscentes utilizando un fullereno decacatiónico soluble en agua (Esquema 20).¹⁹⁹ Los animales se trataron con el fotosensibilizador combinado con ioduro de potasio. En presencia de esta sal no tóxica y en condiciones *in vitro*, se observó una inactivación potenciada en *Acinetobacter baumannii*, *S. aureus* y *C. albicans*. Los estudios *in vivo* mostraron una mayor pérdida de bioluminiscencia en ratones infectados con *A. baumannii*, por fotosensibilización con luz visible y ultravioleta, y en presencia de fullereno y KI.

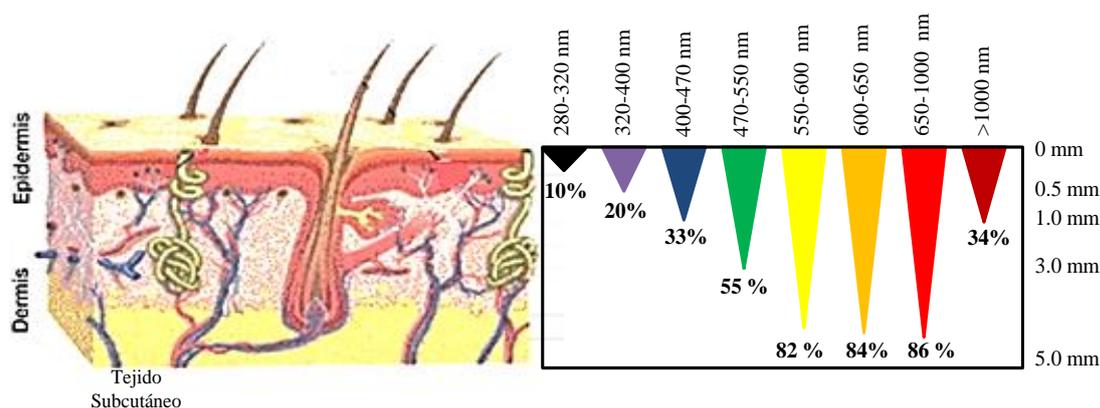
Estos resultados demuestran que la PDI *in vivo* inducida por derivados catiónicos del fullereno C₆₀ e irradiación con luz visible puede resultar en un tratamiento antimicrobiano altamente eficaz.



Esquema 20. Derivado decacatiónico del fullereno C₆₀ evaluado como fotosensibilizador en PDI *in vitro* e *in vivo* en presencia de KI.

Sin embargo, estos tratamientos pueden proyectarse principalmente para el tratamiento de infecciones superficiales y localizadas en áreas tales como heridas, quemaduras en la piel y en las mucosas, donde la luz no necesita penetrar más de 1 mm.¹⁹⁹ Como se anticipó en secciones precedentes, los derivados del C₆₀ muestran principalmente absorción en la zona ultravioleta y en la región azul del visible. En estas zonas espectrales, la penetración de la luz en el tejido es relativamente pobre, lo que evidencia un inconveniente para aplicar estos compuestos como fotosensibilizadores en infecciones de diferentes características, localizaciones y profundidades (Esquema 21).²⁰⁵⁻²⁰⁷ Esta es una importante diferencia con respecto a los fotosensibilizadores convencionales (tales como clorinas, bacterioclorinas, y ftalocianinas), que muestran picos sustanciales en las regiones de color rojo o rojo lejano, donde la penetración lumínica es la de mayor proporción.²⁰⁸

No obstante, existen diversas estrategias para reducir o superar este inconveniente, y así alcanzar mayor penetración de la luz irradiada. Algunas de las alternativas más estudiadas y utilizadas se basan en la utilización de agentes ópticos de compensación en el tejido,^{209,210} o en la excitación con dos fotones (2-PDT), en donde dos fotones de energía en el infrarrojo cercano, se entregan simultáneamente en un pulso muy corto, siendo equivalentes a un fotón de más corta longitud de onda y del doble de energía.²¹¹⁻²¹³



Esquema 21. Penetración de la luz en los tejidos.

Una de las estrategias más útiles y prometedoras es el diseño de nuevas moléculas fotosensibilizadoras mediante la unión covalente entre el C_{60} y antenas captadoras de luz. Así, mediante esta conjugación, se puede incrementar la absorción de luz y, paralelamente, desplazarla hacia mayores longitudes de onda. Este desplazamiento permite irradiar en zonas del espectro donde la penetración lumínica en los tejidos se incrementa y, conjuntamente, aumentar el rendimiento cuántico de producción de ROS.²¹⁴⁻²¹⁶

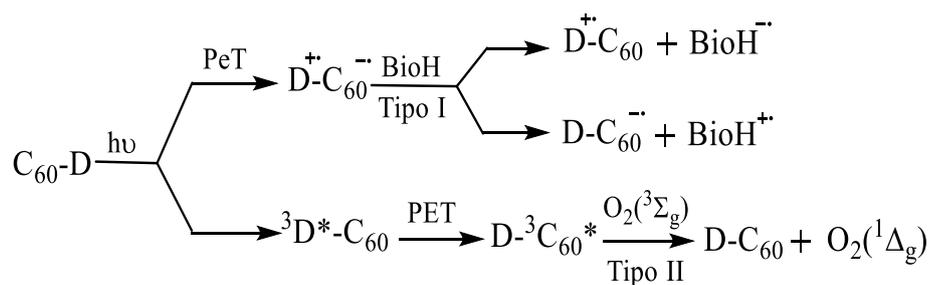
En línea con lo anterior, estos sistemas pueden diseñarse con estructuras que también puedan actuar fotoinducidamente, como dadoras de electrones hacia otras moléculas que puedan aceptarlos, tal es el caso del C_{60} .²¹⁷ Como se mencionó previamente, la estructura esférica presenta una capacidad aumentada de aceptar múltiples electrones, y además tiene una alta reactividad con radicales libres. Por lo tanto, utilizando estas propiedades, se pueden diseñar sistemas conjugados con estructuras dadoras y receptoras, tanto de luz como de electrones, y así producir $O_2(^1\Delta_g)$ por el mecanismo tipo II, o estados de separación de carga fotoinducidos que permitan generar ROS mediante el mecanismo tipo I.²¹⁸

1.5.7. Fullerenos C_{60} conjugados con antenas captadoras de luz

Estos sistemas conjugados conformados por un dador de energía y/o electrones unido covalentemente a un receptor, se han estudiado y utilizado principalmente, para imitar los centros fotosintéticos de reacción,²¹⁹⁻²²¹ y en el diseño de dispositivos fotovoltaicos para la conversión eficiente de luz solar en energía.^{222,223} Para tal fin, el fullereno C_{60} se utilizó frecuentemente, debido a sus interesantes propiedades como receptor y conductor de electrones. Como moléculas dadoras se han estudiado e investigado

principalmente las porfirinas y otras estructuras derivadas del anillo tetrapirrólico.^{224,225} En los últimos años, estos sistemas también se comenzaron a estudiar con el objetivo de aplicarlas como díadas fotosensibilizadoras para tratamientos fotodinámicos.¹⁷²

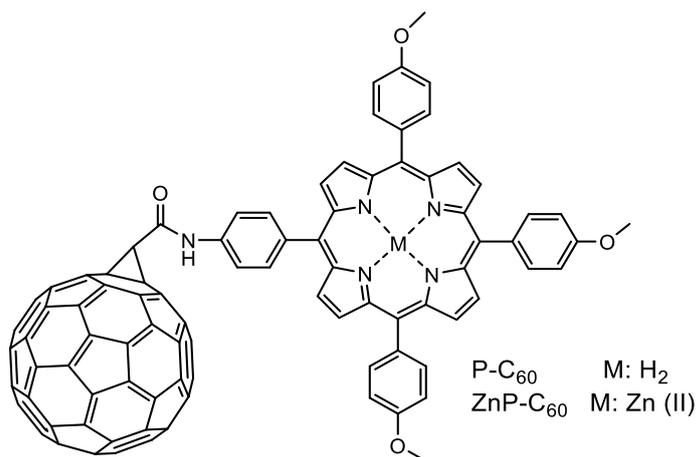
Las díadas D-C₆₀ pueden generar preferentemente O₂(¹Δ_g) o estados de separación de carga fotoinducidos, dependiendo de la estructura y del microentorno en que se localiza (Esquema 22).²²⁶ Así, estas díadas pueden ser fotosensibilizadores interesantes, debido a la posibilidad de competir eficientemente por un proceso de fotoreacción tipo I o II dependiendo de las condiciones del medio. En particular, en el fotoproceso tipo I, el estado de separación de carga de la díada formado por un proceso fotoinducido de transferencia de electrones (PeT), puede interactuar con un sustrato de origen biológico (BioH) dador o aceptor de electrones, dando lugar a la formación de aniones o cationes radicales de alta reactividad. Además, puede ocurrir una transferencia fotoinducida de energía (PET), desde la estructura dadora hacia el C₆₀, para favorecer la producción de O₂(¹Δ_g) por el mecanismo tipo II.



Esquema 22. Mecanismos de fotosensibilización tipo I y II para díadas dador-fullereno C₆₀.

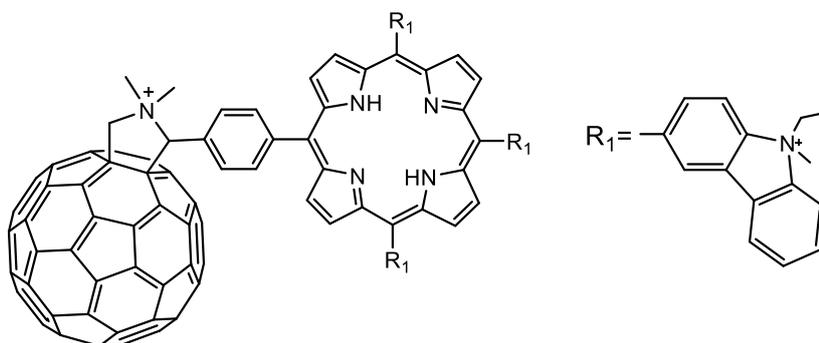
Anteriormente, una díada porfirina-fullereno C₆₀ (P-C₆₀) y su complejo con Zn(II) (ZnP-C₆₀) se evaluaron por primera vez como agentes fototerapéuticos para PDT (Esquema 23).^{227,228} Estas estructuras presentan elevada capacidad de producir estado de separación de cargas fotoinducido. Los estudios *in vitro*, en la línea celular de laringe carcinoma humano HEP-2, mostraron que las díadas se incorporan rápidamente al interior de las células. Por otra parte, ambas díadas fueron capaces de inactivar células a baja concentración de oxígeno.

Los resultados indicaron que estos sistemas son agentes eficientes para inactivar células en medios aeróbicos y también en condiciones anóxicas, mediante una combinación de los mecanismos de fotorreacción tipo I y II, dependiendo del microentorno en el cual se encuentren.



Esquema 23. Estructura representativa de díadas porfirina-fullereno C_{60} .

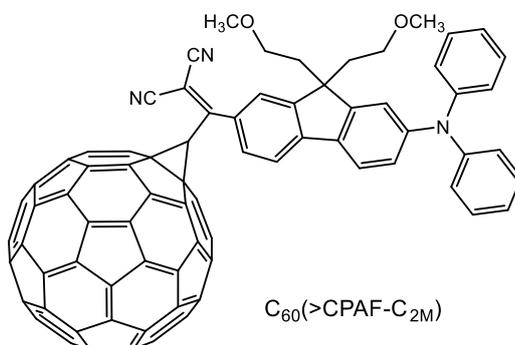
Recientemente, otra estructura catiónica formada por C_{60} y porfirina, también con alta capacidad de formar estado de separación carga fotoinducido, se evaluó como un nuevo FS en la inactivación de *S. aureus* (Esquema 24).²²⁹ Los estudios *in vitro* mostraron que la estructura conjugada resulta más eficiente en la PDI de bacterias, en comparación con la acción fotoinactivante de las estructuras de C_{60} y porfirina evaluadas separadamente.



Esquema 24. Estructura representativa de díada porfirina-fullereno C_{60} evaluada en PDI de bacterias.

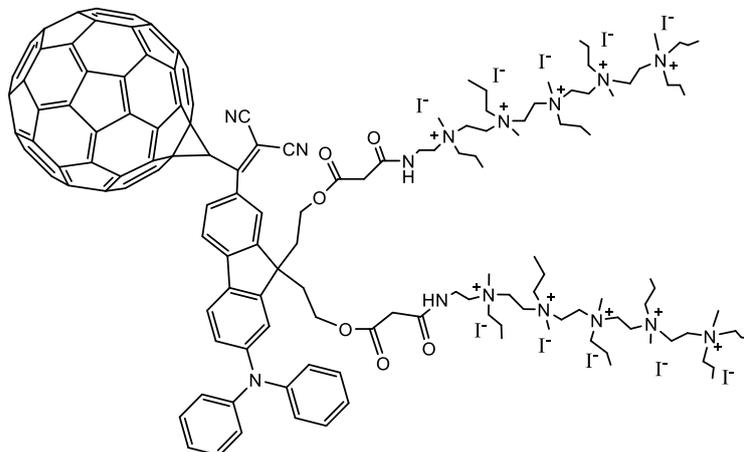
Por otra parte, también se han estudiado moléculas no derivadas del anillo tetrapirrólico, como captadoras de luz y dadoras de energía. En tal sentido, se estudió la capacidad dadora del cromóforo difenilaminofluoreno formando un sistema aceptor-dador con el C_{60} .^{230,231} Esta antena tiene la capacidad de desplazar el espectro de absorción de la estructura, a mayores longitudes de onda, incrementando la absorción entre 450-550 nm. Además, los investigadores comprobaron que no sólo puede actuar como dador de energía, sino que también, este cromóforo en presencia de grupos atractores de electrones, puede generar procesos fotoinducidos de transferencia electrónica. Primeramente, reportaron la

síntesis y el estudio de las propiedades fotodinámicas de la díada mostrada en el Esquema 25. Este sistema mostró una importante eficiencia en el tratamiento de células HeLa, mediante terapia fotodinámica.²¹⁸



Esquema 25. Estructura representativa de un sistema dador-aceptor eficiente en PDT.

Posteriormente, Yin *et al.* utilizaron este cromóforo para sintetizar y estudiar una díada similar a la anterior, pero con diez cargas positivas en su estructura (Esquema 26). En primera instancia, los investigadores evaluaron la capacidad de este sistema para PDT.²³² Comprobaron que la presencia de la antena captadora de luz, potencia la acción fotodinámica con respecto al C₆₀ decacatiónico individual, cuando se excita con luz blanca de mayor longitud de onda en comparación a la excitación con luz ultravioleta de onda larga (UVA).



Esquema 26. Estructura representativa de una díada decacatiónica evaluada en PDT.

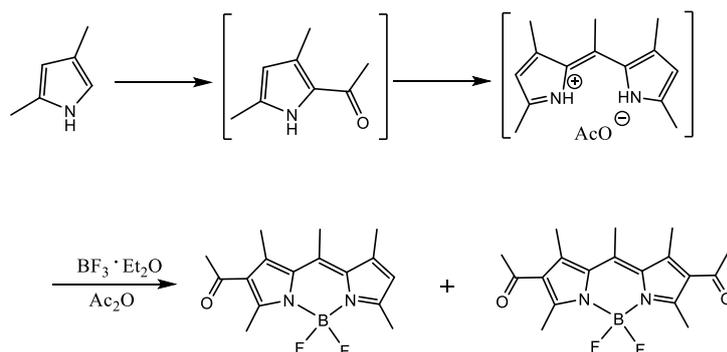
Luego estudiaron esta misma estructura en la PDI de diferentes clases de células microbianas patógenas (*S. aureus*, *E. coli*, y *C. albicans*).⁸⁸ Nuevamente observaron la potenciación de la inactivación, generada por el efecto antena, y comprobaron que la misma puede generar ROS por los dos mecanismos fotoquímicos (tipo I y tipo II).

Estos estudios prometedores abren la posibilidad de explorar y evaluar nuevos diseños de díadas fotosensibilizadoras, con la finalidad de mejorar la eficiencia del C₆₀ como fotosensibilizador. De esta manera, pueden investigarse nuevos cromóforos que actúen eficientemente como antenas dadoras, tanto de luz como de electrones. En este sentido, los colorantes derivados de boro dipirrometenos (4-4-difluoro-4-borata-3a-azonia-4a-aza-s-indacenos, BODIPYs) presentan propiedades y características, que los convierten en estructuras interesantes para tal fin.

1.6. BODIPYs como antenas captadoras de luz

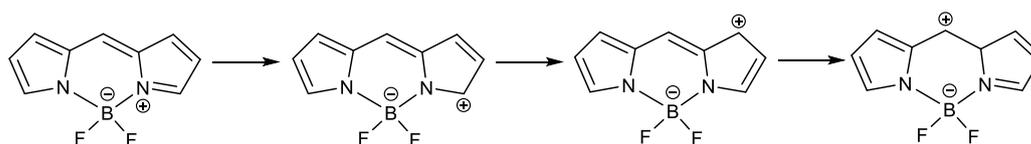
1.6.1. Propiedades generales de BODIPYs

Los BODIPYs se describieron por primera vez por Treibs y Kreuzer,²³³ como resultado inesperado de la reacción entre 2,4-dimetilpirrol y eterato de trifluoruro de boro (BF₃·Et₂O), en presencia de anhídrido acético, con el fin de α-acetilar el anillo pirrólico, como se muestra en el Esquema 27.



Esquema 27. Reacción llevada a cabo por Treibs y Kreuzer.

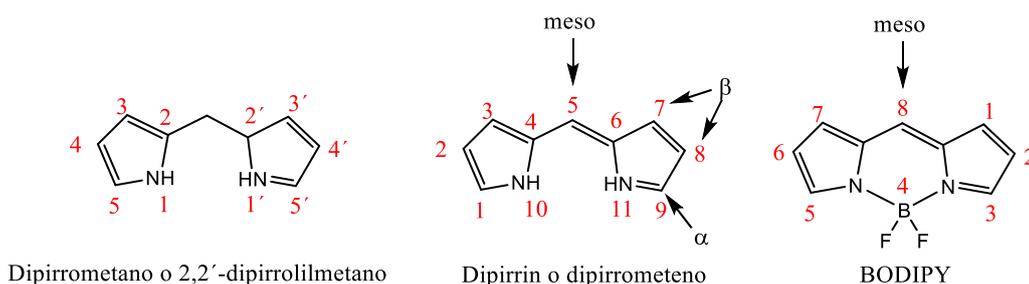
Los mismos investigadores propusieron las formas resonantes principales de la estructura (Esquema 28).



Esquema 28. Estructuras resonantes del BODIPY.

Estos 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.

El sistema de numeración IUPAC para el grupo BODIPY es diferente del utilizado para los dipirrometenos. Además, por analogía con las porfirinas (se suele llamar a los BODIPYS como “hermanas menores de la porfirinas”), en el BODIPY las posiciones 3 y 5 se llaman α, las 1,2,6 y 7 se denominan β y la 8 *meso* (Esquema 29).²³⁴



Esquema 29. Sistema de numeración IUPAC para el BODIPY.

Al dipirrometeno precursor es posible sintetizarlo y aislarlo, sin embargo es un compuesto muy inestable y se descompone por encima de -30 °C. El esqueleto básico de BODIPY recién pudo sintetizarse y aislarse en el año 2009.^{235,236} El mismo, presenta una gran reactividad debido a la ausencia de grupos sustituyentes en su estructura, reaccionando fácilmente con una gran cantidad de electrófilos.

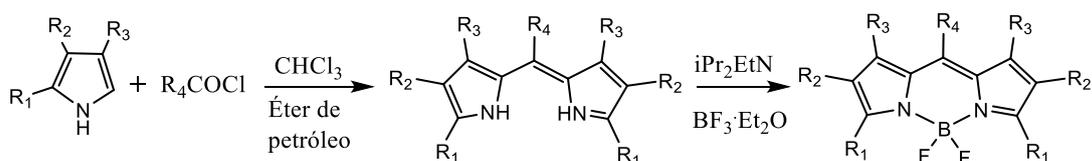
El estudio y las aplicaciones de estos colorantes se incrementaron exponencialmente desde principios de los '90, debido a sus importantes y atractivas propiedades.²³⁷ Sus altos rendimientos cuánticos de fluorescencia, alta estabilidad química y fotoquímica (tanto en solución como en estado sólido), su eficiente emisión láser en disolución y sobre todo su versatilidad química, permitieron incrementar exponencialmente las investigaciones sobre estos compuestos. Este estudio creciente está orientado a un gran número de aplicaciones, tales como: láseres de colorantes,²³⁸ marcadores fluorescentes en moléculas de interés biológico,^{239,240} sondas de imagen,^{241,242} sensores de cationes metálicos y aniones,^{243,244} sensores de pH y de potenciales redox,^{239,245} interruptores fluorescentes,²⁴⁶ celdas solares,²⁴⁷ dispositivos electroluminiscentes²⁴⁸ y terapia fotodinámica (PDT).²⁴⁹ En relación a esta última aplicación, retomaremos su descripción posteriormente.

1.6.2. Síntesis de BODIPYs

La mayor parte de los colorantes BODIPYs son relativamente fáciles de sintetizar partiendo de los pirroles comerciales. Para esto, se utilizan tres vías sintéticas generales:

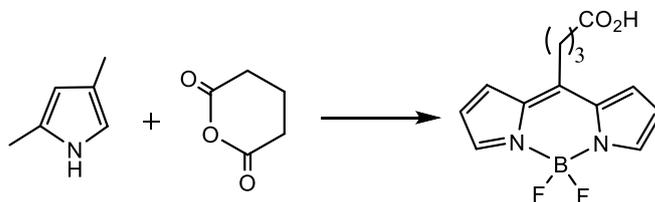
i) A partir de pirroles y cloruros de ácido o anhídridos

La manera más directa de preparar BODIPYs simétricos sustituidos, es la condensación entre cloruros de ácido y α -H pirroles. Los hidroccloruros de dipirrometeno intermediarios pueden aislarse, pero es conveniente hacerlos reaccionar *in situ* con $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ en presencia de una base, para formar el compuesto deseado (Esquema 30).²⁵⁰



Esquema 30. Síntesis de BODIPYs a partir de pirroles y cloruros de ácido.

En esta reacción también pueden usarse otros derivados de ácidos carboxílicos, como los anhídridos de ácido (Esquema 31). En este caso, se obtienen BODIPYs con un grupo carboxilo en posición *meso*.²⁵¹

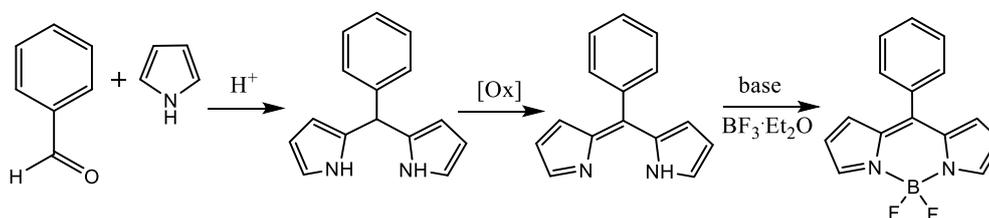


Esquema 31. Síntesis de BODIPYs a partir de pirroles y anhídridos de ácido.

ii) A partir de pirroles y aldehídos

La condensación, en medio ácido, de aldehídos aromáticos con pirroles genera un intermedio dipirrometano, el cual se utiliza inmediatamente debido a su alta inestabilidad. Así, se realiza una oxidación que conduce a la formación de dipirrometenos. Como oxidantes se utiliza por lo general, DDQ (2,3-diciano-5,6-dicloro-1,4-benzquinona), y para condiciones más suaves, *p*-cloranilo (tetracloro-1,4-benzoquinona). Luego se adiciona una base (generalmente trietilamina, Et_3N) y $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, para obtener los BODIPYs deseados (Esquema 32). A partir de esta estrategia sintética se han sintetizado, mayoritariamente, BODIPYs simétricos sustituidos en la posición 8.^{252,253} Además, esta síntesis suele iniciarse a partir de pirroles comerciales ya sustituidos, lo que permite generar BODIPYs

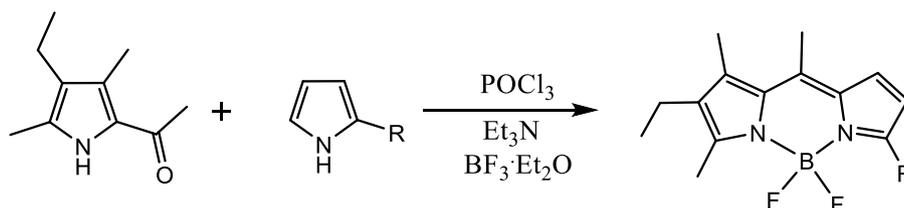
con sustituciones en otras posiciones, que abren la posibilidad para diversas rutas sintéticas.²⁵⁴



Esquema 32. Síntesis de BODIPYs a partir de pirroles y aldehídos.

iii) Síntesis de BODIPYs asimétricos

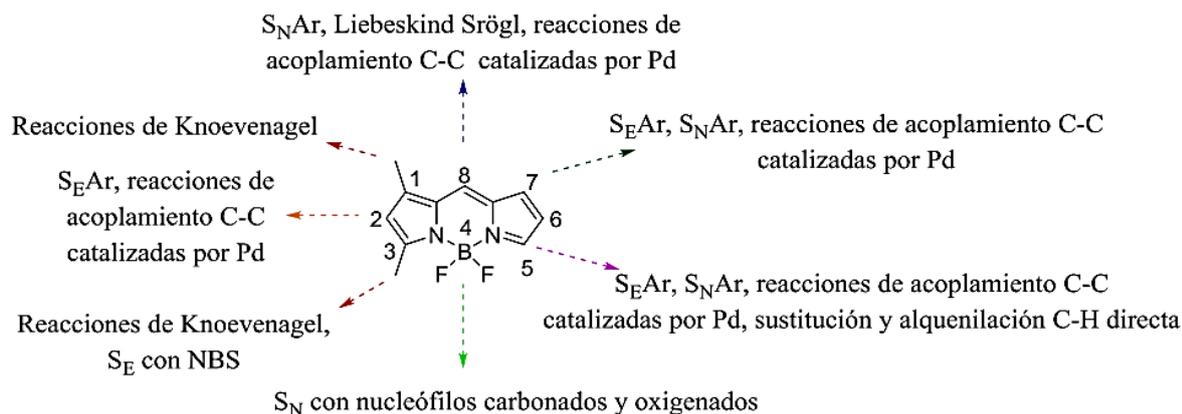
La condensación en medio ácido de un 2-formilpirrol o cetopirrol con un α -H-pirrol produce un dipirrometeno asimétrico con la posición *meso* libre (Esquema 33).²⁵⁵ Este procedimiento se conoce comúnmente como acoplamiento de MacDonald, por analogía a una reacción similar para porfirinas desarrollada por el químico canadiense.²⁵⁶ Los catalizadores ácidos que se utilizan generalmente en esta condensación son el ácido bromhídrico y oxiclورو de fósforo.²⁵⁷



Esquema 33. Síntesis de BODIPYs asimétricos.

1.6.3. Funcionalización del BODIPY

Como se enunció previamente, una de las causas principales del crecimiento exponencial en los estudios de estos colorantes, es la gran reactividad y versatilidad química que presentan. Mediante reacciones no tan complejas, se pueden generar un gran número de derivatizaciones del núcleo BODIPY. Así, distintos grupos funcionales pueden ser incorporados al núcleo, permitiendo generar nuevos compuestos con diversas propiedades orientadas hacia un amplio espectro de aplicaciones.²⁵⁸⁻²⁶⁰ En el Esquema 34, se muestran las principales vías sintéticas que pueden utilizarse para derivatizar al BODIPY:



Esquema 34. Vías de síntesis y derivatización del BODIPY.

Los núcleos aromáticos son ricos en electrones y experimentan fácilmente distintas reacciones de sustitución electrofílica aromática. De esta manera, pueden llevarse a cabo reacciones de nitración,²⁶¹ halogenación,²⁶²⁻²⁶⁴ formilación²⁶⁵ y sulfonación.²⁶⁶ 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.^{267,268}

Para llevar a cabo la funcionalización del BODIPY en las posiciones 1, 3, 5 y 7, suele partirse inicialmente de compuestos halogenados. Estos son intermediarios versátiles para posteriores reacciones de sustitución con diferentes tipos de reactivos nucleófilos (S_NAr).^{269,270} Además, estos derivados halogenados experimentan también reacciones de acoplamiento C-C catalizadas por paladio (Sonogashira, Suzuki, Stille, Heck, entre otras).^{271,272} Por otro lado, la sustitución de los átomos de flúor por nucleófilos carbonados y oxigenados han resultado ser un método versátil para la introducción de diferentes funcionalidades en estos colorantes.^{273,274} Las posiciones 2 y 6 del núcleo del BODIPY son susceptibles de experimentar reacciones de sustitución directa de hidrógeno por grupos alqueno.²⁷⁵ Análogamente, BODIPYs sin sustituyentes en las posiciones 3 y 5, pueden incorporar en un sólo paso diferentes sustituyentes, a través de reacciones de sustitución nucleofílica en condiciones oxidativas.²⁷⁶ Estas funcionalizaciones directas también pueden llevarse a cabo a través de reacciones de acoplamiento empleando metales de transición.²⁷⁷ Además, debido a la acidez de los grupos metilo en posiciones 1, 3, 5 y 7 del esqueleto del colorante, éstos pueden experimentar reacciones de condensación con aldehídos aromáticos a través de reacciones de Knoevenagel.^{278,279} Esta ruta sintética permite obtener los correspondientes monos, di, tri y tetraestirilBODIPYs, extendiendo así

la conjugación del sistema. Esto último permite modificar los espectros de absorción y emisión, desplazándolos a mayores longitudes de onda, lo que resulta muy útil para diversas aplicaciones.²⁸⁰

1.6.4. Características espectroscópicas de BODIPYs

Los compuestos de la familia de los BODIPYs presentan bandas de absorción y emisión en la zona visible del espectro, con altos coeficientes de absorción molar, presentando valores que oscilan entre 40000 y 110000 $M^{-1}cm^{-1}$. Además, tienen altos rendimientos cuánticos de fluorescencia, en algunos casos cercanos a la unidad y un tiempo de vida de fluorescencia entre 1 y 10 ns. Estos espectros son relativamente insensibles al cambio de polaridad y pH del medio.^{237,250}

El espectro de absorción de los BODIPYs típicos, como BODIPY1 (Figura 6), muestra una banda principal entre 500 y 525 nm, correspondiente a la transición al primer estado excitado (S_0-S_1), con un hombro en torno a 480 nm, asociado a la estructura vibracional. A veces, también se observa una ancha pero débil banda alrededor de 375 nm, atribuida a la transición S_0-S_2 ($\pi-\pi^*$). El proceso de emisión de fluorescencia es la imagen especular del de absorción, poniendo de manifiesto que las conformaciones de los estados fundamentales (S_0) y excitado (S_1) son muy similares.

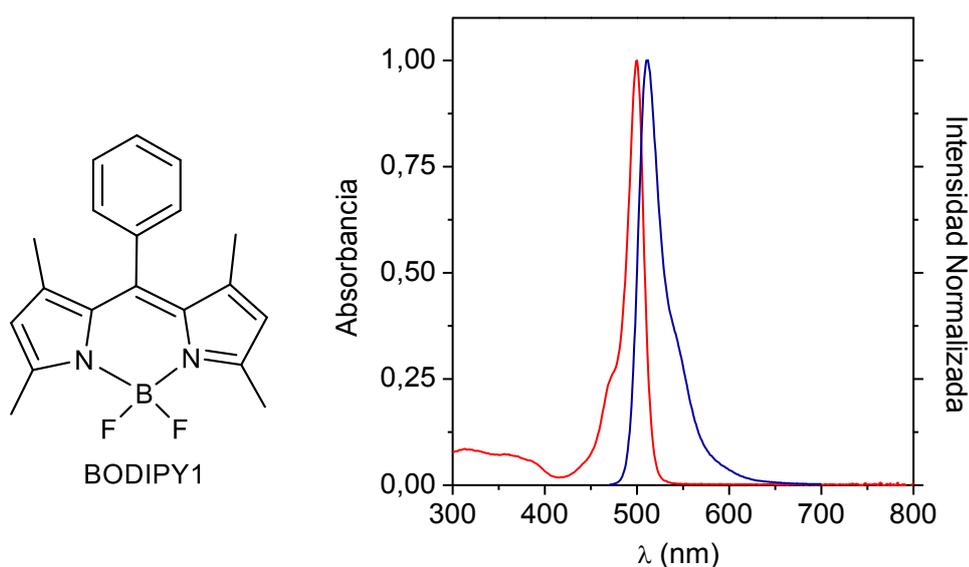


Figura 6. Espectros de absorción (línea roja) y emisión (línea azul) del BODIPY1 en DMF.

Los BODIPYs no suelen presentar procesos de fosforescencia, debido a que la excitación de estos cromóforos genera una escasa concentración de estados triplete por ISC.²⁸¹ Estas características espectroscópicas pueden ser moduladas modificando el número, posición y estructura de los sustituyentes que se incorporen a su núcleo. Por ejemplo, las bandas de absorción pueden desplazarse más hacia la región infrarroja del espectro, mediante la derivatización del núcleo BODIPY.^{282,283} Además, el comportamiento emisivo de los fluoróforos es afectado en gran medida por interacciones estéricas entre sus componentes estructurales, y por movimientos rotacionales de los grupos unidos al núcleo del BODIPY.²⁸⁴

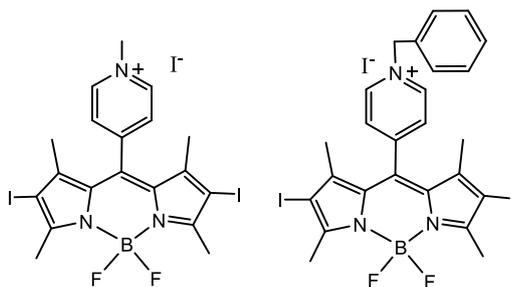
1.6.5. BODIPYs como fotosensibilizadores

Debido a las características descritas previamente, los BODIPYs y sus derivados han sido estudiados principalmente como sondas para imágenes de fluorescencia. Sin embargo, en la última década, también han sido propuestos e investigados como fotosensibilizadores para PDT. Los altos coeficientes de extinción, buena fotoestabilidad, la alta relación de toxicidad luz/oscuridad, la versatilidad química, entre otros, hacen que estos cromóforos puedan ser propuestos para tal aplicación. Sin embargo, estos compuestos también presentan importantes desventajas al respecto. Una de ellas se debe a su alta hidrofobicidad, lo que induce la formación de agregados en soluciones acuosas. No obstante, esto puede optimizarse a través de modificaciones estructurales que permitan obtener una adecuada relación entre solubilidad y penetración celular. Otra desventaja, quizás la más relevante, es la ocasionada por el escaso ISC desde el estado singlete excitado al estado triplete. La energía absorbida por la excitación de BODIPYs, es canalizada principalmente para el proceso de emisión de fluorescencia. De esta manera, se dificulta la producción de ROS (principalmente $O_2(^1\Delta_g)$) desde los estados tripletes del FS, disminuyendo la actividad fotodinámica. De todos modos, es posible limitar la emisión de fluorescencia y a la vez, potenciar el ISC hacia los estados tripletes, mediante la introducción de átomos pesados en la molécula, y así mejorar la generación de ROS.^{285,286}

Para este propósito, se han introducido átomos de halógenos en el núcleo de BODIPYs, fundamentalmente átomos de yodo y bromo. Mediante esta metodología, la cual permite generar el efecto de átomo pesado internamente, se han sintetizado y estudiado un importante número de BODIPYs halogenados, para ser aplicados como FS en el tratamiento fotodinámico de células tumorales.^{281,287,288} Además, para optimizar aún más la

acción fotodinámica, se han derivatizado los fotosensibilizadores con el objetivo de ampliar la conjugación, y desplazar la absorción hacia la zona espectral denominada como “ventana terapéutica” (650-900 nm).^{249,289}

En estudios recientes, se han evaluado por primera vez, BODIPYs catiónicos halogenados como estructuras fotosensibilizantes para PDI de microorganismos. Caruso *et al.* sintetizaron dos nuevos BODIPYs (Esquema 35) y observaron, una relevante acción fotodinámica para la PDI *in vitro* de microorganismos.^{290,291}



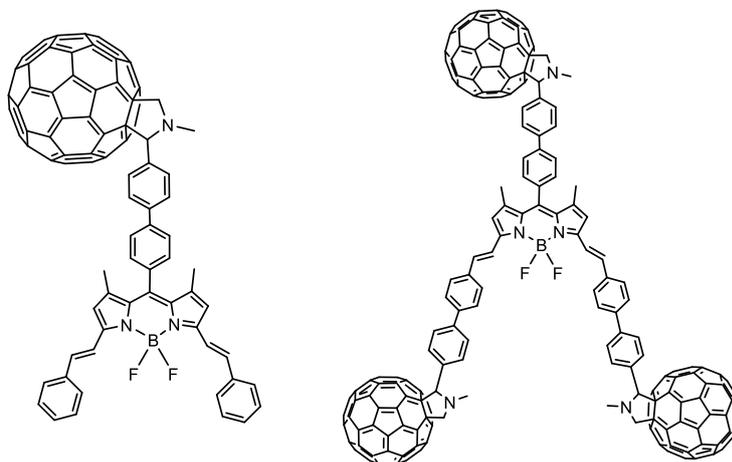
Esquema 35. Primeros BODIPYs evaluados en PDI de microorganismos.

A pesar de la mejora en la actividad fotodinámica de los BODIPYs a partir de la unión covalente de átomos de halógenos, algunos estudios indican que la presencia de estos aumenta la citotoxicidad en la oscuridad, lo que genera un inconveniente a tener en cuenta.^{292,293} Además, la inhibición de la emisión, dificulta la posibilidad de orientar la utilidad de estos compuestos hacia una funcionalidad dual. Es decir, utilizándolos como fluoróforos para técnicas de imagen y señalización celular, y también, como fotosensibilizadores en la inactivación fotodinámica.²⁹⁴ En este sentido, se han investigado diferentes BODIPYs sintetizados sin la incorporación de átomos pesados, que además de resultar prometedores para aplicaciones de imagen en células, han actuado eficientemente como fotosensibilizadores en PDT *in vitro*.²⁹⁵⁻²⁹⁷

1.6.6. Díadas de BODIPY-C₆₀

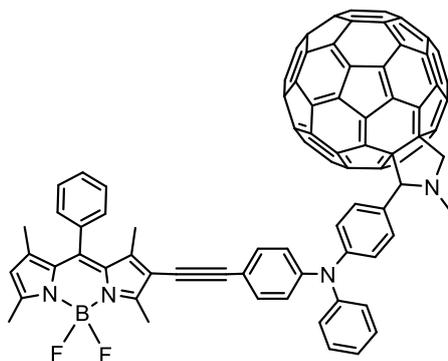
Debido a los altos coeficientes de absorción molar y rendimientos cuánticos de fluorescencia, los BODIPYs pueden actuar como excelentes antenas captadoras de luz, para la generación de procesos PET y PeT. Por otro lado, el C₆₀ es un gran aceptor de electrones y presenta un ISC cercano a la unidad, pero sus absorciones de luz en el espectro visible son débiles. Por lo tanto, la unión covalente de BODIPYs con derivados del C₆₀, permite generar sistemas dador-aceptor, que puedan generar procesos de PET y PeT, importantes para un amplio espectro de aplicaciones.

La primeras díadas BODIPY- C_{60} sintetizadas son las mostradas en el Esquema 36.²⁹⁸ Éstas muestran una fuerte absorción de la luz roja, y alta eficiencia de formación de estados excitados triplete de larga vida. Se estudiaron como fotosensibilizadores libres de átomos pesados para la fotooxidación de 1,5-dihidroxi-naftaleno través de $O_2(^1\Delta_g)$. Los autores comprobaron que estas díadas sólo generan procesos de PET.



Esquema 36. Primeros sistemas BODIPY- C_{60} sintetizados y estudiados.

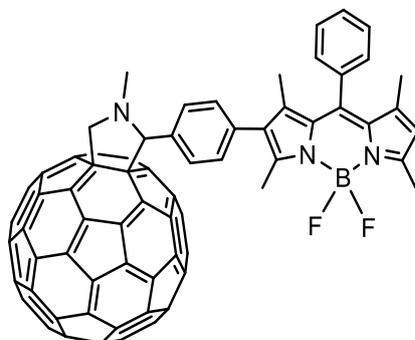
Más adelante, los mismos investigadores sintetizaron otra díada (Esquema 37) para estudiarla con una finalidad similar a la anterior.²⁹⁹ Un BODIPY unido mediante un puente etino a trifenilamina, se utilizó como antena para la captación de luz en la región del infrarrojo. El C_{60} se usó como receptor de energía singlete, y para facilitar el ISC.



Esquema 37. Díada BODIPY- C_{60} con procesos PET y PeT.

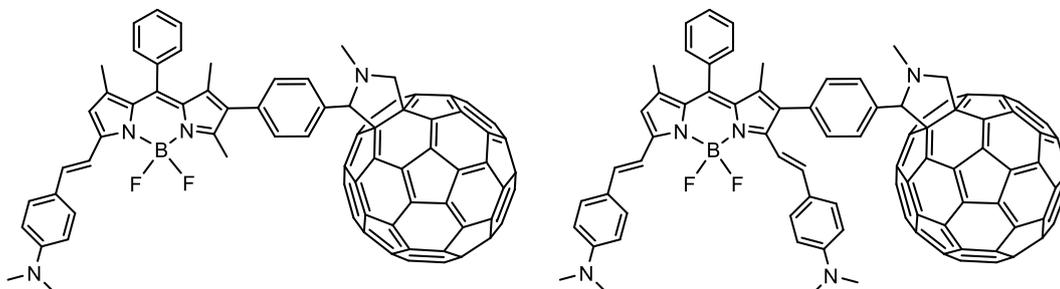
Esta estructura también se propuso como FS libre de átomo pesado, para generar el proceso de aniquilación triplete-triplete (TTA). A diferencia de las estructuras anteriores, este sistema presentó PeT desde la antena hacia el C_{60} , favorecido por la conjugación del grupo trifenilamina, que actúa como un fuerte dador de electrones.

Por otro lado, Huang *et al.* sintetizaron una nueva díada de BODIPY- C_{60} , que presentó una fuerte absorción de luz visible, y eficiente generación de estados excitados triplete, lo que permitió producir ROS eficientemente.³⁰⁰ Los investigadores estudiaron este sistema en fotocatalisis, y comprobaron que puede actuar como un fotocatalizador eficiente para algunas reacciones orgánicas (Esquema 38).



Esquema 38. Díadas BDP- C_{60} evaluadas como fotocatalizadores.

Posteriormente, sintetizaron y estudiaron otros sistemas con características similares a las anteriores, pero con la incorporación de grupos aminos libres en sus estructuras.³⁰¹ Éstos pueden actuar como grupos dadores de electrones en procesos de PeT (Esquema 39).

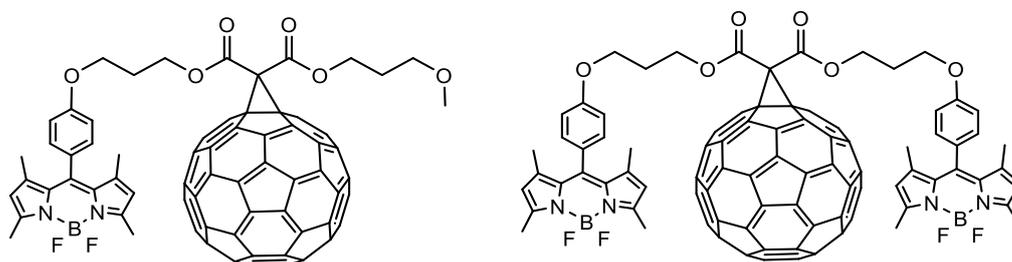


Esquema 39. Díadas BODIPY- C_{60} con grupos aminos libres facilitadores de PeT.

Analizaron los procesos PET y PeT del BODIPY hacia el C_{60} , y comprobaron cómo estos pueden modularse en medio ácido y básico. Observaron que, mediante la protonación de las aminos libres, la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ se incrementa considerablemente. Los autores justifican este comportamiento considerando que al protonarse las aminos en medio ácido se impide el PeT hacia el C_{60} , inhibiéndose la generación del estado de separación de cargas y aumentado el proceso de transferencia energética, el cual induce el incremento en la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ por tipo II.

Esta posibilidad de modular los procesos fotoinducidos, puede resultar de gran utilidad para estudios de mecanismos para la activación de la producción de $O_2(^1\Delta_g)$, mediante estímulos externos al cromóforo, como por ejemplo, la variación de pH.³⁰² Los mecanismos y desarrollos al respecto pueden ser útiles para distintas aplicaciones, como PDT, dispositivos moleculares, entre otros.

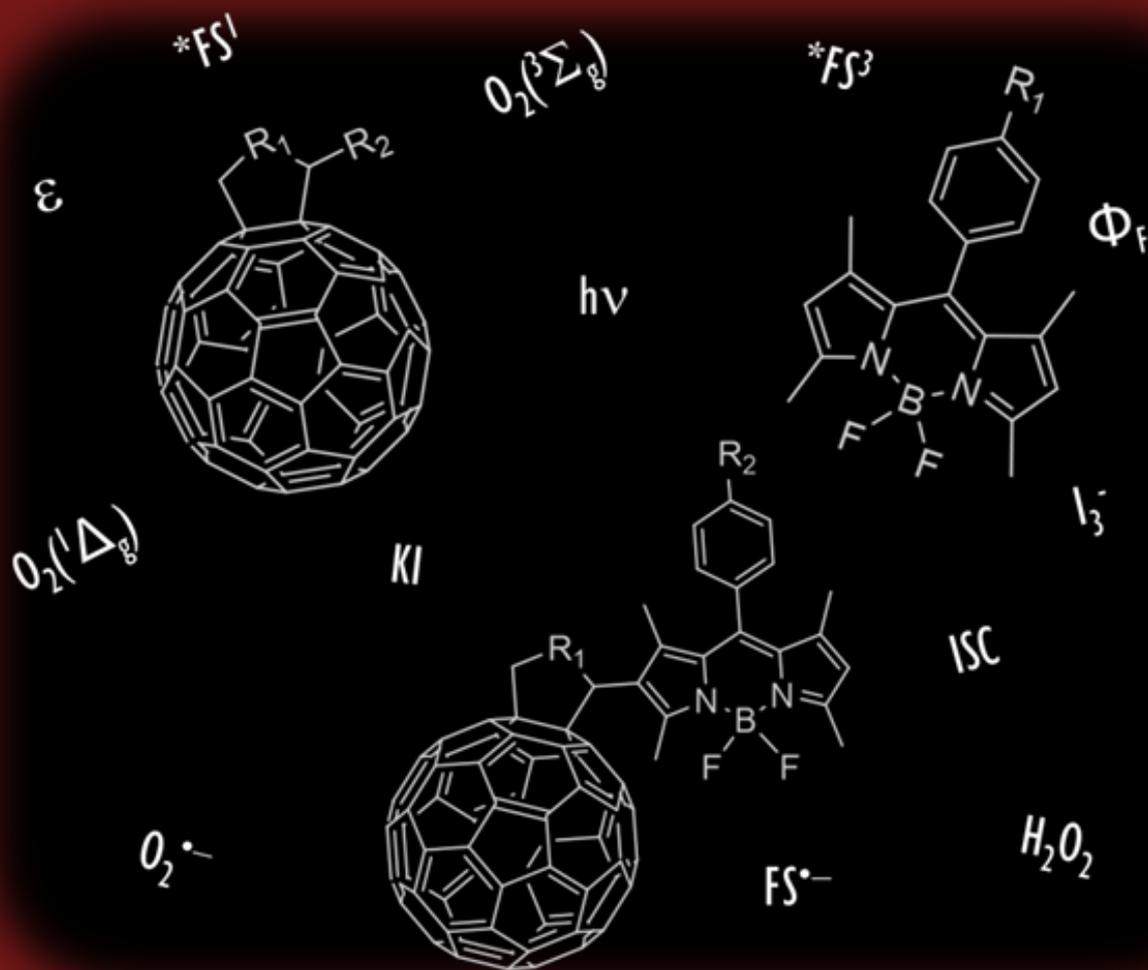
Recientemente se diseñaron y sintetizaron nuevas díadas BODIPY- C_{60} uniendo covalentemente antenas de BODIPYs al C_{60} por adición de Bingel (Esquema 40).³⁰³ Los estudios fotodinámicos mostraron que estas estructuras generan $O_2(^1\Delta_g)$ con mayor eficiencia que el fotosensibilizador convencional denominado azul de metileno.



Esquema 40. Díadas de BODIPY- C_{60} sintetizadas mediante cicloadición de Bingel.

Además de las estructuras presentadas aquí, en los últimos años han sido sintetizados y estudiados otros sistemas de díadas BODIPY- C_{60} .^{304,305} En todos los estudios, se puede observar que la unión covalente del BODIPY, como antena captadora de luz, y el C_{60} , como aceptor de energía y convertidor de spin por ISC, permite diseñar sistemas útiles y eficientes para la generación de procesos PET. De esta manera, se puede optimizar e incrementar la generación de los estados tripletes excitados en un FS, necesarios para la eficiente producción de $O_2(^1\Delta_g)$. Además, algunos de estos sistemas, han mostrado capacidad para generar estados de separación de carga cuando son irradiados con luz.³⁰⁶ Estos procesos PeT pueden resultar útiles para la generación de otras ROS vía mecanismo tipo I.

Como se describió, las investigaciones de estas estructuras se han orientado, principalmente, hacia aplicaciones que tienen que ver con la generación de dispositivos fotovoltaicos, reacciones fotooxidativas, fotocatalisis, aniquilación T-T, entre otros. No obstante, también puede resultar interesante, estudiar estas díadas como FS en PDI, en la búsqueda de posibles alternativas para la optimización y mejoramiento de la capacidad fotodinámica de los derivados del C_{60} .



CAPÍTULO II

OBJETIVOS

CAPÍTULO II

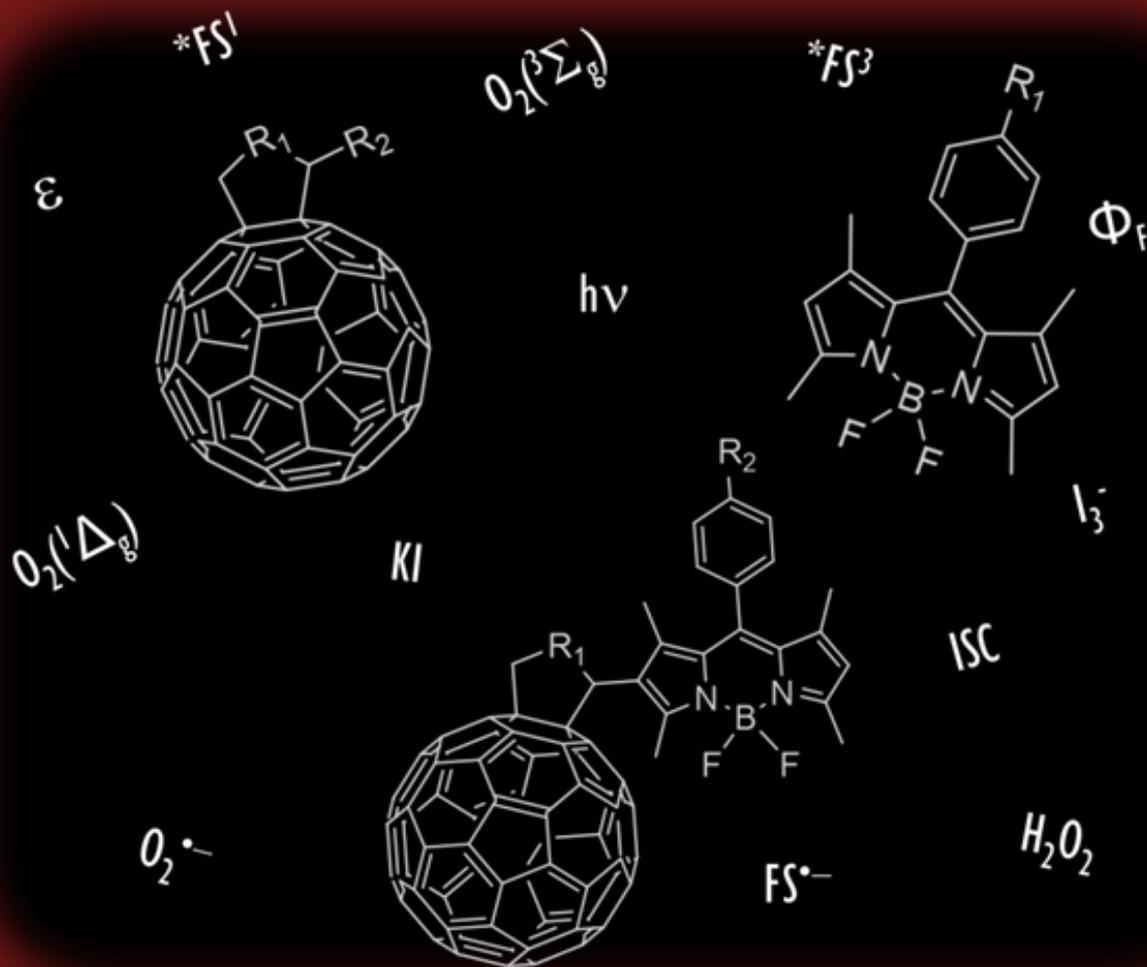
2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Sintetizar y estudiar las propiedades fisicoquímicas de derivados de fullereno C₆₀ con aplicaciones potenciales como fotosensibilizadores selectivos para la fotoinactivación de células microbianas.

2.2. Objetivos específicos

- a. Sintetizar y caracterizar derivados de fulleropirrolidinas sustituidos por grupos aminos.
- b. Evaluar las propiedades espectroscópicas de absorción UV-visible y de fluorescencia de las moléculas sintetizadas.
- c. Estudiar las propiedades fotodinámicas de los derivados del C₆₀ en diferentes medios mediante la descomposición de sustratos.
- d. Determinar la actividad fotoinactivante de los agentes fotosensibilizadores en bacterias.
- e. Evaluar la influencia del aumento de la carga positiva en la eficiencia del fotosensibilizador.
- f. Estudiar los mecanismos de acción fotodinámica *in vitro* de fullerenos catiónicos.
- g. Sintetizar y caracterizar derivados del BODIPY.
- h. Evaluar sus propiedades espectroscópicas y fotodinámicas en diferentes medios y en presencia de KI.
- i. Determinar la capacidad fotoinactivante de los BODIPYs en bacterias.
- j. Sintetizar estructuras moleculares dador-aceptor combinando un derivado del BODIPY con fullereno C₆₀.
- k. Evaluar las propiedades espectroscópicas y fotodinámicas de las díadas en diferentes medios.
- l. Determinar la PDI de los nuevos agentes fotosensibilizadores en bacterias



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Equipamiento

Los espectros UV-visible y de fluorescencia se registraron en un espectrofotómetro *Shimadzu UV-2401PC* (Shima Corporation, Tokyo, Japón) y en un fluorómetro *Spex FluoroMax* (Horiba Jobin Yvon Inc., Edison, NJ, Estados Unidos), respectivamente.

Los espectros de especies transitorias resueltos en el tiempo se obtuvieron con la técnica de láser flash fotólisis. Dicho equipo cuenta con un láser Nd-Yag, Spectron Lasser System como fuente de excitación, con una ancho de pulso en el intervalo de los nanosegundos y una lámpara de Xenón de 150 W de potencia como haz analizador. El sistema de detección se compone de un monocromador PTI y un fotomultiplicador extendido al rojo (Hamamatsu R666). La señal es adquirida y promediada por un osciloscopio digital (Hewlett Packard 54504A) y luego transferida a una PC vía una interface paralela HPIB donde es analizada y almacenada.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H NMR) se obtuvieron en un espectrómetro multinuclear FT-NMR Bruker Avance DPX400 a 400 MHz (Rheinstetten, Alemania). Los espectros de masa (MS) fueron adquiridos en un Bruker MicroQTOFII (Bruker Daltonics, MA, Estados Unidos), equipado con una fuente ESI.

Para la cromatografía de capa fina en sílica gel (TLC, thin-layer chromatography), se utilizaron placas de 250 μm de Analtech (Newark, Estados Unidos), mientras que, en las cromatografías en columna flash se empleó sílica gel (230-400 mesh, Aldrich). La sonicación se ejecutó en un equipo Branson 1210 (Danbury, Connecticut, Estados Unidos).

En los ensayos biológicos se utilizó caldo tripticasa soya (CTS), agar-agar de Britania (Buenos Aires, Argentina), cajas de Petri (10 cm de diámetro) descartables y policubetas de poliestireno de 96 pocillos. Los medios de cultivos se esterilizaron en autoclave (Allamerican, Model 25x-2, Manitowoc, Estados Unidos) a 20 psi y $\sim 115\text{-}121$ °C durante 20 min. Las suspensiones celulares se cultivaron en una estufa de cultivo F.A.L. (Argentina). La absorción de los cultivos bacterianos se determinó a 660 nm en un espectrofotómetro Barnstead Turner SP-830 (Dubuque, IA, Estados Unidos).

Todos los compuestos químicos se usaron sin purificación adicional. *N*-metilglicina, 4-(3-*N,N*-dimetilamino)propoxilbenzaldehído, fullereno C_{60} , 9,10-dimetilantraceno (DMA), difenilisobenzofurano (DPBF), L-triptófano (Trp), azul de nitro-

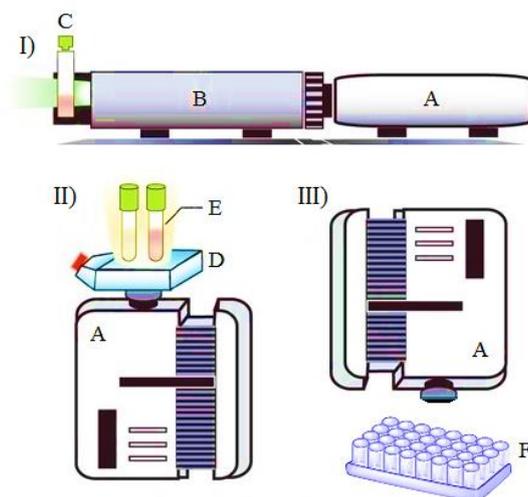
tetrazolio (NBT), trietilamina (TEA), bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT) secado bajo vacío, se adquirieron de *Aldrich*, el sulfato de dimetilo proveniente de *Merck*.

Los solventes dimetilformamida (DMF), acetato de etilo, trietilamina (TEA), tolueno (previamente destilado), se adquirieron de *Sintorgan*. Los solventes utilizados para estudios espectroscópicos fueron calidad HPLC, y para síntesis grado GR. El tolueno utilizado en la síntesis de los derivados del C₆₀ se destiló sobre sodio metálico empleando acetofenona como indicador y se conservó en tamices moleculares previamente activados.

El agua ultra pura se obtuvo de un equipo *Labconco* (Kansas, MO, Estados Unidos) modelo 90901-01.

3.2. Sistemas de irradiación

En la irradiación de sistemas homogéneos y microheterogéneos para estudios fotodinámicos se utilizó un equipo Cole-Parmer illuminator 41720-series (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) equipado con una lámpara halógena de 150 W. Para la irradiación de sustratos con luz monocromática se empleó un monocromador (Photon Technology Instruments, Birmingham, NJ, Estados Unidos) como muestra el dispositivo I (Esquema 41). La intensidad de la luz en el sitio de tratamiento se determinó con un equipo *Radiometer Laser Mate-Q Coherent* (Santa Clara, CA, USA) y fue de 0,45 mW cm⁻² para $\lambda=450\pm 5$ nm, 0,60 mW cm⁻² para $\lambda=470\pm 5$ nm y 0,65 mW cm⁻² para $\lambda=500\pm 5$ nm.



Esquema 41. Diferentes sistemas de irradiación. I) Fotooxidación de DMA, DPBF, NBT y Trp. II) Inactivación de células de *S. aureus* y *E.coli*. III) Inactivación de *S. aureus* y *E.coli*. A: proyector, B: monocromador, C: celda de cuarzo, D: filtro de agua y E: suspensión de microorganismos, F: policubetas.

Para la irradiación de los sistemas biológicos se utilizó una proyector Novamat 130 AF (Braun Photo Technik, Nürnberg, Alemania) equipado con una lámpara de halógeno de 150 W (Esquema 41). Se seleccionó mediante filtros ópticos, un intervalo de longitudes de onda entre 350-800 nm. La intensidad de la luz en el sitio de tratamiento se determinó con un equipo *Radiometer Laser Mate-Q Coherent* (Santa Clara, CA, USA) y fue de 90 mWcm^{-2} .

También se irradiaron los sistemas biológicos, utilizando filtros ópticos (*GG455 cutoff filter*) para seleccionar un rango de longitud de onda entre 455-800 nm. La intensidad de la luz en el sitio de tratamiento fue de 60 mW cm^{-2} .

Para los estudios *in vitro* llevados a cabo en tubos de ensayo, se empleó una cubeta de agua de 2,5 cm de ancho que actuó como filtro para absorber el calor de las lámparas (Esquema 41. **Error! No se encuentra el origen de la referencia.II**). La misma estuvo presente en los experimentos con microorganismos desarrollados en policubetas (Esquema 41.III).

3.3 Reactivos y solventes

Los reactivos químicos fullereno C_{60} , *N*-metilglicina, 4-(*N,N*-dimetilamino)benzaldehído, 4-[(3-*N,N*-dimetilamino)propoxil]benzaldehído, 4-(4-metilpiperazino)benzaldehído, 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ), sulfato de dimetilo, yoduro de metilo, carbonato de sodio (Na_2CO_3), azida de sodio (NaN_3), D-manitol, Diazobiciclo[2.2.2]octano (DABCO), L-triptófano, 9,10-dimetilantraceno (DMA), azul de nitrotetrazolio (NBT), yoduro de potasio (KI), nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) 9,10-dimetilantraceno (DMA), difenilisobenzofurano (DPBF), L-triptófano (Trp), trietilamina (TEA), 2,4-dimetilpirrol, boro trifluoruro-dietilo eterato ($BF_3 \cdot EtO_2$), cloruro de fosforilo ($POCl_3$), formaldehído provenientes de Aldrich (Milwaukee, WI, Estados Unidos) se usaron sin purificación adicional. El surfactante bis(2-etilhexil)sulfosuccinato de sodio (AOT, Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) se secó bajo presión reducida. 2,2'-(antraceno-9,10diil) bis (metilmalonato de tetrasodio) (ABMM) se sintetizó mediante la metodología descrita anteriormente.¹²⁰

Los siguientes solventes (Sintorgan) se utilizaron sin destilar: diclorometano (DCM), 1,2-dicloroetano (DCE), trietilamina (TEA), *N,N*-dimetilformamida (DMF), acetato de etilo, ciclohexano, *n*-heptano, éter etílico, cloroformo, óxido de deuterio (D_2O), 1,2-dicloroetano (DCE) y *o*-diclorobenceno (*o*-DCB). El tolueno (Aldrich) utilizado en

síntesis se destiló sobre sodio metálico empleando acetofenona (Aldrich) como indicador y se conservó en tamices moleculares (Aldrich, poro 4Å) previamente activados. El agua ultra pura se obtuvo de un equipo Labconco (Kansas, MO, E.E.U.U.) modelo 90901-01. Se utilizaron solventes de calidad HPLC para estudios espectroscópicos y de grado GR para la síntesis de los diferentes compuestos.

3.4. Síntesis

3.4.1. Síntesis de derivados del fullereno C₆₀

3.4.1.1. *N*-metil-2-[4'-(3-*N,N*-dimetilamino)propoxifenil]fulleropirrolidina (MPC₆₀)

Una solución de C₆₀ (51 mg, 0,071 mmol), 4-3-(dimetilamino)propoxilbenzaldehído (25 mg, 0,120 mmol) y *N*-metilglicina (23 mg, 0,260 mmol) en 55 ml de tolueno anhidro, recién destilado, se agitó a reflujo en atmósfera de argón por 6 h. Luego, el solvente se removió bajo presión reducida y el producto se purificó por cromatografía *flash* (sílica gel, tolueno/acetato de etilo de 100:0 a 50:50 con 1% de trietilamina) permitiendo obtener 29 mg (43%) de MPC₆₀.

TLC (sílica gel, tolueno/acetato de etilo/trietilamina, 1:1:0,01) R_f = 0,2. ¹HNMR (CDCl₃, TMS) δ (ppm) – 1,97 (m, 2H, -CH₂-), 2,28 (s, 6H, *N*-(CH₃)₂), 2,50 (t, 2H, *N*-CH₂-, J=7,0 Hz), 2,79 (s, 3H, *N*-CH₃ anillo de pirrolidina), 4,02 (t, 2H, O-CH₂-, J=6,1 Hz), 4,24 (d, 1H, anillo de pirrolidina, J=9,4 Hz), 4,88 (s, 1H, anillo de pirrolidina); 4,97 (d, 1H, anillo de pirrolidina, J=9,4 Hz), 6,95 (d, 2H, Ar, J=8,0 Hz), 7,70 (d, 2H, Ar, J=8,0 Hz). ESI-MS [m/z] 955,1810 [M+H]⁺ (954,1732 calculado para C₇₄H₂₂N₂O).

3.4.1.2. *N,N*-Dimetil-2-[4'-(3-*N,N,N*-trimetilamino)propoxifenil]fulleropirrolidinio (DPC₆₀²⁺)

El producto *N*-metil-2-[4'-(3-*N,N*-dimetilamino)propoxifenil]fulleropirrolidina (10 mg, 0,01 mmol) se trató con un exceso de sulfato de dimetilo (200 μL, 2,11 mmol) en 2 ml de *N,N*-dimetilformamida (DMF), durante 40 h a 90 °C en agitación y atmósfera de argón. Luego el solvente se removió bajo presión reducida, y la mezcla se colocó en eppendorf añadiéndose éter etílico, lo que permitió precipitar el fullereno C₆₀ catiónico. El producto se lavó con Na₂CO₃ 5% y posteriormente con agua para obtener 96% de DPC₆₀²⁺.

¹HNMR (CS₂/acetona-*d*₆, TMS) δ [ppm]: 2,40 (m, 2H, -CH₂-), 3,28 (s, 9H, N⁺-(CH₃)₃), 3,32 (t, 2H, *N*-CH₂-, J = 6,9 Hz), 3,88 (s, 6H, N⁺-(CH₃)₂ anillo de pirrolidina), 4,00 (t, 2H, O-CH₂-, J=6,0 Hz), 4,30 (d, 1H, anillo de pirrolidina, J = 9,5 Hz), 4,94 (s, 1H, anillo de pirrolidina); 5,02 (d, 1H, anillo de pirrolidina, J = 9,5 Hz), 6,92 (d, 2H, Ar, J = 8,0

Hz), 7,69 (señal ancha, 2H, Ar). ESI-MS [m/z] 985,2280 [M+H]⁺ (984,2202 calculada para C₇₆H₂₈N₂O)

3.4.1.3. *N*-metil-2-[4'-(4-metilpiperazino)]fulleropirrolidina (MMC₆₀)

Una solución de C₆₀ (99 mg, 0,138 mmol), 4-(4-metilpiperazino)benzaldehído (28 mg, 0,138 mmol) y *N*-metilglicina (12 mg, 0,138 mmol) en 75 ml de tolueno anhidro, recién destilado, se agitó a reflujo en atmósfera de argón por 6 h. Luego, el solvente se removió bajo presión reducida y el producto se purificó por cromatografía *flash* (sílica gel, tolueno/acetato de etilo de 100:0 a 50:50 con 1% de trietilamina) permitiendo obtener 48 mg (37%) de MMC₆₀.

TLC (sílica gel, tolueno/acetato de etilo/trietilamina, 1:1:0,01) R_f = 0,16. ¹HNMR (CDCl₃, TMS) δ (ppm) 2,37 (s, 3H, *N*-CH₃), 2,79 (s, 3H, *N*-CH₃ anillo de pirrolidina), 2,58 (t, 4H, 2-CH₂-anillo de piperizina, J=5,0 Hz), 3,43 (t, 4H, 2-CH₂-anillo de piperizina, J=5,0 Hz), 4,23 (d, 1H, anillo de pirrolidina, J= 9,5 Hz), 4,86 (s, 1H, anillo de pirrolidina), 4,97 (d, 1H, anillo de pirrolidina, J= 9,5 Hz), 6,92 (d, 2H, Ar, J=8,8 Hz), 7,76 (d, 2H, Ar, J=8,8 Hz). APPI-MS [m/z] 952,1814 [M+H]⁺ (951,1735 calculado para C₇₄H₂₁N₃).

3.4.1.4. *N,N*-Dimetil-2-[4'-(1-*N*-metil,4-*N,N*-dimetilpiperazino)]fulleropirrolidinio (DMC₆₀³⁺)

El producto MMC₆₀ (20 mg, 0,01 mmol) se trató con 2 ml de sulfato de dimetilo, durante 40 h a 90 °C en agitación y atmósfera de argón. Luego el solvente se removió bajo presión reducida, y la mezcla se colocó en eppendorf añadiéndose éter etílico, lo que permitió precipitar el fullereno C₆₀ catiónico. El producto se lavó con Na₂CO₃ (5% p/v) y posteriormente con agua para obtener 96% de DMC₆₀³⁺.

¹HNMR (DMSO-d₆, TMS) δ (ppm) Las señales del anillo de piperizina no se pudieron asignar debido a la señal intensa del agua: 3,1-3,6; 4,14 (s, 6H, N⁺(CH₃)₂), 4,30 (d, 1H, anillo de pirrolidina, J= 9,5 Hz), 4,90 (s, 1H, anillo de pirrolidina), 5,04 (d, 1H, anillo de pirrolidina, J= 9,5 Hz), 7,11 (d, 2H, Ar, J=9,0 Hz), 7,78 (d, 2H, Ar, J=9,0 Hz). APPI-MS [m/z] 997,2518 [M+H]⁺ (996,2440 calculada para C₇₇H₃₀N₃)

3.4.1.5. *N*-metil-fulleropirrolidina (MAC₆₀) y *N,N*-Dimetil-fulleropirrolidinio (MAC₆₀⁺)

Estos derivados del C₆₀ se sintetizaron siguiendo la metodología reportada en bibliografía.^{156,179}

3.4.2. Síntesis de derivados del BODIPYs

3.4.2.1. 1,3,5,7-tetrametil-8-[4-(*N,N*-dimetilamino)fenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-sindaceno (BDP1)

Una mezcla de 6 mmol (620 ml) de 2,4-dimetilpirrol, 3 mmol (450 mg) de 4-(*N,N*-dimetilamino)benzaldehído y 50 ml de TFA en 150 ml de CH₂Cl₂ se agitaron bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, durante la noche o hasta que el análisis por TLC mostró un relevante consumo del aldehído. En este momento, se agregaron 50 ml de CH₂Cl₂, conteniendo 3 mmol (681 mg) de DDQ, y se agitó por 20 min. Luego, se añadieron un gran exceso de Et₃N (9 ml) y BF₃·EtO (9 ml). La mezcla se agitó durante 12 h, y posteriormente, la capa orgánica conteniendo el producto impuro se lavó con agua. La solución orgánica se secó con Na₂SO₄, y el solvente se removió bajo presión reducida. El producto se purificó por cromatografía *flash* (silica gel) usando CH₂Cl₂ como eluyente, lo que permitió obtener BDP1 con un rendimiento del 25%.

TLC (CH₂Cl₂) R_f = 0,6. ¹HNMR (CDCl₃, TMS) δ [ppm] 1,48 (s, 6H), 2,55 (s, 6H), 3,04 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 5,97 (s, 2H, pirrol), 6,82 (d, 2H, J=8,7 Hz, Ar), 7,08 (d, 2H, J=8,7 Hz, Ar). APPI-MS [m/z] 368, 2110 (M+H)⁺ (367,2031 calculado para C₂₁H₂₄BF₂N₃).

3.4.2.2. 1,3,5,7-tetrametil-8-[4-(*N,N,N*-trimetilamino)fenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (BDP2)

Una mezcla de BDP1 (20 mg, 0,052 mmol) and 200 µl de ioduro de metilo en 2 ml de DMF, se agitaron por 72 h a 40°C. El solvente se removió bajo presión reducida, obteniéndose 1,3,5,7-tetrametil-8-[4-(*N,N,N*-dimetilamino)fenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno con un rendimiento de 95%.

¹HNMR (DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 1,53 (s, 6H), 2,46 (s, 6H), 3,66 (s, 9H, -N(CH₃)₃), 6,21 (s, 2H, pirrol), 7,71 (d, 2H, J=8,8 Hz, Ar), 8,14 (d, 2H, J=8,8 Hz, Ar). APPI-MS [m/z] 383,2344 (M+H)⁺ (382,2261 calculado para C₂₂H₂₇BF₂N₃).

3.4.2.3. 8-[4-(3-(*N,N*-dimetilamino)propoxil)fenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (BDP3)

Una solución de 4-[3-(*N,N*-dimetilamino)propoxil] benzaldehído (2 ml, 10 mmol) y pirrol (15,0 ml, 216 mmol) se trató siguiendo la metodología descripta previamente. Después del tratamiento, se obtuvieron 1,7673 g (55%) de dipirrometano puro. Una solución de dipirrometano (829 mg, 2,57 mmol) y DDQ (1,063g, 4,68 mmol) en 130 ml de diclorometano se agitaron por 3 h a temperatura ambiente. Luego, TEA (12 ml, 86,03 mmol) y BF₃·Et₂O (12 ml, 97,23 mmol) fueron añadidos. La mezcla se agitó durante 12 h a

temperatura ambiente, y posteriormente se lavó dos veces con agua. El solvente se removió bajo presión reducida. Mediante la purificación con columna de cromatografía flash (silica gel, CH₂Cl₂/TEA 1%) se obtuvo un 6% de BDP3 puro.

TLC (CH₂Cl₂/TEA 1%), R_f = 0,74. ¹HNMR (CDCl₃, TMS) δ [ppm] 2,25-2,30 (m, 2H), 2,33 (s, 6H, -N(CH₃)₃), 2,69 (t, 2H, J=6,0 Hz), 4,11 (t, 2H, J=6,1 Hz), 6,55 (dd, 2H, J=1,7, 4,2 Hz, pirrol), 6,97 (d, 2H, J=4,2 Hz, pirrol), 7,04 (d, 2H, J=8,3 Hz, Ar), 7,53 (d, 2H, J=8,3 Hz, Ar), 7,92 (s, 2H, pirrol). APPI-MS [m/z] 370,1902 (M+H)⁺ (369,1824 calculado para C₂₀H₂₂BF₂N₃O).

3.4.2.4. 8-[4-(3-(*N,N,N*-trimetilamino)propoxil)fenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (BDP4)

Una mezcla de BDP3 (10 mg, 0,03 mmol) y yoduro de metilo (2 ml, 21,10 mmol) en 2 ml de DMF se agitó por 72 h a 40 °C. Los solventes se removieron bajo presión reducida, obteniéndose 8-[3-(*N,N,N*-trimetilamino)propoxyl]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno con un 95% de rendimiento.

¹HNMR (DMSO-*d*₆, TMS) δ [ppm] 2,16-2,20 (m, 2H), 2,48 (t, 2H, J=6,2 Hz), 3,05 (s, 9H, -N(CH₃)₃), 4,17 (t, 2H, J=6,0 Hz), 6,69 (dd, 2H, J=1,8, 4,2 Hz, pirrol), 7,02 (d, 2H, J=4,2 Hz, pirrol), 7,17 (d, 2H, J=8,3 Hz, Ar), 7,66 (d, 2H, J=8,3 Hz, Ar), 8,09 (s, 2H, pirrol). APPI-MS [m/z] 385,2180 (M+H)⁺ (384,2102 calculado para C₂₁H₂₅BF₂N₃O).

3.4.2.5. 1,3,5,7-tetrametil-2-formil-8-[4-(*N,N*-dimetilamino)fenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (BDP5)

Una mezcla de cloruro de fosforilo (POCl₃, 5 ml) y DMF (5 ml) se agitó por 5 min en baño de hielo y atmósfera de argón. Luego se llevó a temperatura ambiente y se agitó otros 30 min. Posteriormente se agregó el BDP1 (0,35 mmol) desde una solución preparada en 50 ml de dicloroetano (DCE). Se agitó a 50°C por 2 h. Luego la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, y se vertió lentamente en una solución saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO₃, 200 ml) en baño de hielo. A continuación se llevó a temperatura ambiente, se agitó durante 30 minutos, se lavó dos veces con agua (150 ml) y se extrajo con ampolla la capa orgánica. El solvente se evaporó bajo presión reducida. El producto crudo se purificó mediante una columna de cromatografía flash (silica gel, EtOAc /tolueno, 1:4), obteniéndose BDP2a puro con un 85 % de rendimiento.

TLC (EtOAc /tolueno, 1:4), R_f = 0,3. λ_{max} (DMF): 493 nm. ¹HNMR (CDCl₃, TMS) δ (ppm) 10,05 (s, 1H, CHO), 7,07 (d, 2H, Ar, J=8,3 Hz), 6,81 (d, 2H, Ar, J=8,3 Hz), 6,15

(s, 1H, pirrol), 3,06 (s, 6H, $N-(CH_3)_2$), 2,83 (s, 3H), 2,62 (s, 3H), 1,79 (s, 3H), 1,56 (s, 3H). APPI-MS [m/z] 396, 2059 (M+H)⁺ (395,1980 calculado para $C_{22}H_{24}BF_2N_3O$).

3.4.3. Síntesis de díadas BODIPY- C_{60}

3.4.3.1. BDP- C_{60}

Una solución de BDP2a (50 mg, 0,12 mmol), C_{60} (91 mg, 0,12 mmol), y *N*-metilglicina (11 mg, 0,12 mmol) en 60 ml de tolueno anhidro, se agitó a reflujo en atmósfera de argón por 10 h. Luego, el solvente se removió bajo presión reducida y el producto se purificó por cromatografía *flash* (sílica gel, tolueno/ciclohexano de 100:20 a 100:0) permitiendo obtener BDP- C_{60} puro con un rendimiento de 34%.

TLC (sílica gel, tolueno) $R_f = 0,62$. ¹HNMR ($CDCl_3$, TMS) δ (ppm) 1,57 (s, 3H), 1,73 (s, 3H), 2,69 (s, 3H), 2,74 (s, 3H, NCH_3 , anillo de pirrolidina), 2,81 (s, 3H), 3,04 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 4,12 (d, 2H, anillo de pirrolidina, $J=9,5$ Hz), 4,92 (s, 1H, anillo de pirrolidina), 5,06 (d, 1H, anillo de pirrolidina, $J=9,5$ Hz), 6,00 (s, 1H, pirrol), 6,84 (d, 2H, Ar, $J=8,5$ Hz), 7,15 (d, 2H, Ar, $J=8,5$ Hz). APPI-MS [m/z] 1143,2532 (M+H)⁺ (1142,2453 calculado para $C_{84}H_{29}BF_2N_4$).

3.4.3.2. BDP- C_{60}^{2+}

Una mezcla de BDP- C_{60} (30 mg, 0,076 mmol) y yoduro de metilo (500 μ l, 5,2 mmol) en 2 ml de DMF se agitó por 72 h a temperatura ambiente. Los solventes se removieron bajo presión reducida, obteniéndose BDP- C_{60}^{2+} con un 95% de rendimiento.

¹HNMR ($DMSO-d_6/CS_2$, TMS) δ (ppm) 7,15 (d, 2H, Ar, $J=8,2$ Hz), 7,06 (d, 2H, Ar, $J=8,2$ Hz), 6,11 (s, 1H, pirrol), 5,19 (d, 1H, anillo de pirrolidina, $J=6,0$ Hz), 5,14 (s, 1H, anillo de pirrolidina), 4,41 (d, 2H, anillo de pirrolidina, $J=6,0$ Hz), 3,7 (s, 9H), 3,25 (s, 6H), 2,90 (s, 3H), 2,63 (s, 3H), 1,90 (s, 3H), 1,80 (s, 3H). APPI-MS [m/z] 1175,3146 (M+H)⁺ (1174,3068 calculado para $C_{86}H_{37}BF_2N_4$). APPI-MS [m/z] 1173,3001 (M+H)⁺ (1172,2923 calculado para $C_{86}H_{35}BF_2N_4$).

3.5. Estudios espectroscópicos

Los estudios espectroscópicos se realizaron a 25,0 °C, usando una celda de cuarzo de paso óptico de 1 cm. Los espectros de absorción para los derivados del C_{60} se tomaron en dos solventes homogéneos de polaridad diferente (DMF y tolueno), y en un medio micelar de tolueno/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$).

El rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) se calculó por comparación del área obtenida debajo del espectro de emisión de cada fullereno en DMF, con el área correspondiente al fullereno C₆₀, el cual fue utilizado como estándar de fluorescencia, según la Ecuación 1.³⁰⁷

$$\Phi_F^{PS} = \frac{A^{Ref}}{A^{PS}} \frac{I^{PS}}{I^{Ref}} \left(\frac{\eta_2}{\eta_1} \right)^2 \Phi_F^{Ref} \quad (1)$$

Donde Φ_F representa el rendimiento cuántico de fluorescencia, A corresponde a la absorbancia medida ($A < 0,05$) a la longitud de onda de excitación ($\lambda_{ex} = 450$ nm), I es el área debajo del espectro de emisión para el derivado del C₆₀ en estudio y del fullereno C₆₀ de referencia, en un 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. El valor de Φ_F para el C₆₀ usado como referencia en DMF se obtuvo por comparación con el espectro de fluorescencia del mismo en tolueno ($\Phi_F = 2,3 \times 10^{-4}$) y teniendo en cuenta los valores de los índices de refracción para cada uno de los solventes utilizados (η (tolueno) = 1,496; η (DMF) = 1,431).^{188,307}

Los espectros de absorción de BDP2 y BDP4 se tomaron en solventes homogéneos de distinta polaridad (*n*-heptano, tolueno, DMF y agua) y en un medio micelar de *n*-heptano/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$). Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) se calcularon por comparación del área bajo el espectro de emisión corregido de cada uno, con respecto al área de la fluoresceína como referencia ($\Phi_F = 0,90$), en DMF (Ecuación 1). También se investigó la desactivación del estado singlete excitado de BDP2 y BDP4 en presencia de KI, utilizando la ecuación de Stern-Volmer (Ecuación 2).

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (2)$$

Donde I_0 e I son las intensidades de fluorescencia de BODIPY en ausencia y en presencia del inhibidor, k_q representa la constante bimolecular de desactivación, τ_q es el tiempo de vida del estado excitado singlete del BODIPY en ausencia de KI, [Q] es la concentración de KI y K_{SV} es la constante de *quenching* de Stern-Volmer.

Los espectros de absorción de las díadas BDP-C₆₀ y BDP-C₆₀²⁺ se tomaron en dos solventes homogéneos de polaridad diferente (DMF y tolueno), y tolueno/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$). Los espectros de emisión se registraron en DMF y tolueno excitando a $\lambda_{exc} = 480$ nm. Los Φ_F de los BODIPYs constitutivos de las díadas se determinaron utilizando BDP2 como referencia, con su Φ_F obtenido previamente. Para calcular el Φ_F en

distintos medios, se tuvieron en cuenta los valores de los índices de refracción para cada uno de los solventes utilizados (η (tolueno) = 1,496; η (DMF) = 1,431).^{188,307} Para BDP-C₆₀ se realizaron estudios espectroscópicos de absorción y emisión en DMF conteniendo distintas concentraciones de TFA.

3.6. Absorción de especies transitorias resuelta en el tiempo

Los espectros de absorción de transientes de BDP2 y BDP4 se determinaron por láser flash fotólisis en solución de DMF saturada con argón y en presencia de diferentes concentraciones de KI. Como fuente de excitación se utilizó un láser de 532 nm para BDP3 y de 355 nm para BDP4. Los experimentos se realizaron en celdas de cuarzo rectangulares con geometría de ángulo recto.

Para BDP-C₆₀ y BDP-C₆₀²⁺ se estudiaron los espectros de especies transitorias en tolueno y DMF saturados en argón, excitando la muestra con el láser de 532 nm. El espectro de absorción para BDP-C₆₀ se determinó también en DMF con ácido trifluoracético (TFA, 1% v/v).

3.7. Cálculos computacionales

Cálculos para BDP-C₆₀ y BDP-C₆₀²⁺ se realizaron utilizando Teoría Funcional de Densidad (DFT, por sus siglas en inglés *Density functional theory*) mediante el software Gaussian 09. Las optimizaciones geométricas del estado fundamental y excitado se calcularon usando la base funcional CAM-B3LYP y 6-31+G(d).

3.8. Estudios electroquímicos

La caracterización voltamétrica de los procesos redox se realizó con un potenciostato-galvanostato Autolab (Electrochemical Instruments, Países Bajos) utilizando un electrodo de trabajo de Pt y un contraelectrodo de Pt en una célula convencional de tres electrodos. Se llevaron a cabo estudios electroquímicos para BDP1, MAC₆₀ y BDP-C₆₀ en disolución desoxigenada de *o*-diclorobenceno (*o*-DCB) (burbujeo de nitrógeno) con tetrafluoroborato de tetra-*n*-butilamonio 0,1 M (TBABF₄) como electrolito de soporte. Se utilizó un electrodo de cuasi-referencia de alambre de plata. El electrodo de trabajo de Pt se limpió entre los experimentos por pulido con una pasta de alúmina de 0,3 mm, seguido de enjuagues con disolvente. Después de cada experimento voltamétrico, se añadió ferroceno

como un estándar interno, y el eje potencial se calibró contra el potencial formal para el electrodo saturado de calomelano (SCE, por sus siglas en inglés *Saturated calomel electrode*).

3.9. Estudios en medios homogéneos. Fotólisis en estado estacionario

3.9.1. Fotooxidación de 1,3-difenilisobenzofurano

Soluciones de 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF, 20 μM) y fotosensibilizador ($A=0,1$) en 2 ml de tolueno o DMF se irradiaron con luz monocromática. Las cinéticas de fotooxidación de DPBF se estudiaron siguiendo la disminución de la absorbancia a $\lambda_{\text{max}}=415$ nm.

Las constantes de velocidad observadas (k_{obs}) se obtuvieron por el ajuste lineal de $\ln(A_0/A)$ vs tiempo. Para la reacción de DPBF con $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ en estado estacionario, la velocidad de desaparición del sustrato es expresada mediante la Ecuación 3:



$$\frac{\delta[\text{DPBF}]}{\delta t} = -k_r [\text{DPBF}][\text{O}_2(^1\Delta_g)] = -k_{\text{obs}} [\text{DPBF}] \quad (4)$$

Integrando (4), se obtiene:

$$\ln \frac{[\text{DPBF}]_0}{[\text{DPBF}]_t} = k_{\text{obs}} t \quad (5)$$

Donde $[\text{DPBF}]_0$ y $[\text{DPBF}]_t$ representan las concentraciones de DPBF a tiempo de reacción cero y a un tiempo t determinado de reacción respectivamente, si se trabaja en condiciones tales que se cumple la Ley de Lambert-Berr. Reemplazando las concentraciones de DPBF inicial y a un tiempo de reacción determinado por las correspondientes absorbancias a 415 nm se obtiene:

$$\ln \frac{A_0}{A_t} = k_{\text{obs}} t \quad (6)$$

El avance de la reacción puede graficarse en forma lineal, de forma tal que el primer miembro es la variable dependiente y el tiempo t es la variable independiente. La pendiente del gráfico permite determinar el valor de k_{obs} .

Los valores Φ_{Δ} para cada fotosensibilizador en medio homogéneo se obtuvieron por comparación directa de las pendientes en la región lineal del gráfico entre una referencia y cada fotosensibilizador.³⁰⁸ Se utilizó como referencia C_{60} ($\Phi_{\Delta} = 1$).^{191,192} Condiciones experimentales idénticas se emplearon para analizar la fotooxidación de DPBF en

presencia de un determinado fotosensibilizador y la referencia. Así mediante la Ecuación 7, se determinó el Φ_{Δ} de cada fotosensibilizador.

$$\Phi_{\Delta}^{PS} = \frac{\Phi_{\Delta}^{C_{60}} k_{obs}^{PS}}{k_{obs}^{C_{60}}} \quad (7)$$

Los fotosensibilizadores MPC₆₀, DPC₆₀²⁺, MMC₆₀ y DMC₃⁺ se irradiaron con luz monocromática a $\lambda_{irr}=480 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ en DMF. Los BODIPYS y díadas se irradiaron con luz monocromática a $\lambda_{irr}=500 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ en tolueno y DMF.

Además, la fotooxidación de DPBF sensibilizada por BDP2 y BDP4 se evaluó en presencia de KI a diferentes concentraciones (10 y 50 mM) en DMF/ H₂O 5%. Por otro lado, la fotooxidación de DPBF sensibilizada por BDP-C₆₀ y BDP-C₆₀⁺ se estudió en DMF/TFA (1% v/v).

3.9.2. Fotooxidación de 9,10-dimetilantraceno

Soluciones de 9,10-dimetilantraceno (DMA, 20 μM) y fotosensibilizador (MPC₆₀, DPC₆₀²⁺, A=0,1 en 450 nm) en 2 ml de DMF, se irradiaron con luz monocromática, $\lambda_{irr}=450 \text{ nm}$. Las cinéticas de fotooxidación de DPBF se estudiaron siguiendo la disminución de la absorbancia a $\lambda_{max}= 378 \text{ nm}$. Los valores Φ_{Δ} para cada fotosensibilizador se obtuvieron utilizando la metodología descrita previamente para la fotooxidación DPBF. La fotodescomposición de DMA fotosensibilizada por MPC₆₀, DPC₆₀²⁺ también se estudió en micelas inversas de tolueno/AOT(0,1M)/agua (W₀=10).

3.9.3. Fotooxidación de 2,2'-(antraceno-9,10-diil)bis(metilmalonato) de sodio

Soluciones de 2,2'-(antraceno-9,10-diil)bis(metilmalonato) de sodio (ABMM, 35 μM) y los fotosensibilizadores (A=0,1) MPC₆₀ y DPC₆₀²⁺, en 2 ml de agua/DMF (1:1), se irradiaron con luz monocromática, $\lambda_{irr}=450 \pm 5 \text{ nm}$. La cinética de fotooxidación de ABMM se estudió siguiendo la disminución de la absorbancia a $\lambda_{max}=379 \text{ nm}$. En estas condiciones experimentales, la reacción sigue una cinética de *pseudo* primer orden al igual que el DMA. Las constantes de velocidad observadas (k_{obs}) se obtuvieron luego de ajustar linealmente un gráfico de $\ln(A_0/A)$ vs tiempo de irradiación (s).

3.9.4. Fotooxidación de azul de nitrotetrazolio

Soluciones de azul de nitrotetrazolio (NBT, 0,2 mM), nicotinamida adenina dinucleótido (NADH, 0,5 mM) y los fotosensibilizadores disueltos en 2 ml de DMF-H₂O

1%, se irradiaron con luz blanca y monocromática (absorbancia del FS~0,1). Los fotosensibilizadores MPC₆₀, DPC₆₀²⁺, MMC₆₀ y DMC₃⁺ se irradiaron con luz visible. Los BODIPYS y díadas se irradiaron con luz monocromática a $\lambda_{irr}=500 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$. Las cinéticas de fotooxidación de NBT se estudiaron siguiendo la aparición del producto diformazán (DF) que absorbe a $\lambda_{m\acute{a}x}=560 \text{ nm}$. Experimentos control se realizaron con el fotosensibilizador junto con NBT o NADH y en ausencia del fotosensibilizador, irradiando solo con los sustratos.

3.9.5. Fotooxidación de L-triptófano

Soluciones de Trp (~20 μM) y fotosensibilizador en DMF (2 ml) se irradiaron con luz monocromática. Las cinéticas de fotooxidación de Trp se estudiaron siguiendo la disminución de su fluorescencia a $\lambda_{m\acute{a}x}=350 \text{ nm}$. Los espectros de fluorescencia de cada muestra en presencia del aminoácido se obtuvieron excitando a $\lambda_{exc}=290 \text{ nm}$.

Para la reacción de Trp con $^1\text{O}_2$ en estado estacionario, la velocidad de desaparición del sustrato es expresada mediante la siguiente ecuación:



$$\frac{d[\text{Trp}]}{dt} = -k_r [^1\text{O}_2][\text{Trp}] = -k_{obs}[\text{Trp}] \quad (9)$$

Integrando (8) se obtiene

$$\ln \frac{[\text{Trp}]_0}{[\text{Trp}]_t} = k_{obs} t \quad (10)$$

Donde $[\text{Trp}]_0$ y $[\text{Trp}]_t$ representan las concentraciones de Trp a tiempo de reacción cero y a un determinado tiempo de reacción t. Reemplazando estas concentraciones de Trp por las correspondientes intensidades de fluorescencia a una λ de 350 nm se obtiene:

$$\ln \frac{I_0}{I_t} = k_{obs} t \quad (11)$$

El avance de la reacción puede graficarse en forma lineal, de modo tal que el término de la izquierda es la variable dependiente, el tiempo (t) la variable independiente y el valor de k_{obs} se obtiene de la pendiente del gráfico.

Los fotosensibilizadores MPC₆₀, DPC₆₀²⁺, MMC₆₀ y DMC₆₀³⁺ se irradiaron con luz monocromática a $\lambda_{irr}=450 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ en DMF.

La fotooxidación de Trp fotosensibilizada por BDP2 y BDP4 se estudió irradiando con luz monocromática a $\lambda_{irr}=500 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ en DMF. También se estudió en presencia de

KI (50 mM), DABCO (50 mM) y D-manitol (50 mM) en DMF/ H₂O 5%. Los tres sustratos se agregaron desde una solución acuosa 1M. Estos estudios se realizaron con el fin de evaluar los posibles mecanismos de acción fotodinámica de ambos BODIPYs en medio homogéneo.

La fotooxidación de Trp fotosensibilizada por BDP-C₆₀ y por BDP-C₆₀²⁺ también se evaluó en presencia de DABCO y D-manitol con la metodología descrita en el párrafo precedente.

3.9.6. Generación de especies de iodo por BODIPYs

Los espectros UV-Vis de BDP2 y BDP4 (1 μM) y 10 mM de KI en DMF se registraron antes y después de la irradiación con luz visible a diferentes tiempos (5, 10, 15 y 30 min). Como control positivo se utilizó una solución de Lugol (sol. acuosa de I₂ + KI). También, se realizó el control irradiado de KI en ausencia de BODIPY. Además la misma experiencia se hizo en atmósfera de argón.

3.10. Estudios en medios microheterogéneos

3.10.1. Estudios en micelas inversas de AOT

Se preparó una solución stock 0,1 M de AOT por pesada y posterior dilución con *n*-heptano o tolueno según el caso. La adición de agua a la solución se realizó empleando una microjeringa previamente calibrada. La cantidad de agua presente en el sistema se expresó como la relación molar entre la concentración de agua y de AOT presentes en la micela inversa ($W_0=[H_2O]/[AOT]$). En todos los experimentos se utilizó un valor de $W_0=10$ y las mezclas se sometieron a ultrasonido durante aproximadamente 10 segundos para obtener soluciones micelares transparentes.^{309,310}

La descomposición de DMA fotosensibilizada por MPC₆₀ y DPC₆₀²⁺ se evaluó en tolueno/AOT (0,1M)/agua ($W_0=10$).

La fotooxidación de DPBF fotosensibilizada por BDP2 y BDP4 se estudió en *n*-heptano/AOT(0,1M)/agua ($W_0=10$). Por otro lado, la fotooxidación de DPBF fotosensibilizada por las díadas BDP-C₆₀ y BDP-C₆₀⁺ se estudió en tolueno/AOT(0,1M)/agua ($W_0=10$). Los valores de Φ_Δ se calcularon utilizando fullereno C₆₀ como referencia, debido a que dicho compuesto se disuelve principalmente en el solvente externo (tolueno).

3.11. Estudios con microorganismos

Uno de los microorganismos utilizado en este estudio fue la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 25923 (Esquema 33). Esta bacteria se cultivó en una estufa con agitador rotatorio (100 rpm) a 37 °C en caldo Tripticasa Soya (CTS, Britania, Buenos Aires, Argentina) durante 24 h (Figura 7). Alícuotas (60 µl) de este cultivo se transfirieron asépticamente a 4 ml de medio fresco y se incubaron con agitación a 37 °C hasta llegar a la mitad de la fase exponencial (densidad óptica de ~0,3 a $\lambda=660$ nm). Las células se centrifugaron (3000 rpm durante 15 min) y se volvieron a suspender en una cantidad igual de buffer fosfato salino 10 mM (PBS, pH=7,0) (1,5 mM KH_2PO_4 y 8,0 mM Na_2HPO_4). A continuación, se diluyeron las células 1/1000 en PBS, lo que corresponde a $\sim 10^6$ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml o se suspendieron en PBS sin diluir lo que corresponde a $\sim 10^9$ UFC/ml.



Figura 7. Cepa de *S. aureus* ATCC 25923. A) Cultivo en CTS después de un crecimiento durante toda la noche (*Overnight*, ON). B) Colonias típicas en ATS.

Por otro lado, se realizaron estudios con la bacteria *E. coli* EC7 (Figura 8). Este microorganismo se aisló de una muestra de material urogenital clínico y se identificó por el método tradicional³¹¹ 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.³¹² Para los ensayos realizados *in vitro*, la cepa de *E. coli* se cultivó aeróbicamente a 37 °C en CTS durante toda la noche. En este caso, alícuotas (40 µl) de este cultivo se transfirieron asépticamente a 4 ml de medio fresco y se incubaron a 37 °C hasta la mitad de la fase logarítmica (absorbancia 0,6 a $\lambda=660$ nm). Las células en la fase exponencial de crecimiento se recogieron por centrifugación de los caldos de cultivo (3000 rpm durante 15 min) y se volvieron a suspender en 4 ml de PBS. A continuación, se diluyeron las células 1/1000 en PBS, lo que corresponde a $\sim 10^6$ UFC/ml o se suspendieron en PBS sin diluir lo que corresponde a $\sim 10^9$ UFC/ml.



Figura 8. Cepa de *E. coli* EC7. A) Cultivo en CTS después de un crecimiento durante toda la noche (*Overnight*, ON). B) Colonias típicas en ATS.

Los experimentos llevados a cabo tanto con *S. aureus* y *E. coli* se realizaron empleando dos metodologías diferentes. Por un lado se utilizaron 2 ml de las suspensiones de células en tubos de cultivo de la marca Pyrex (13x100 mm). Por otro lado, los ensayos se llevaron a cabo transfiriendo 200 μ l de suspensión celular a placas de 96 pocillos. Las suspensiones de las bacterias antes mencionadas se diluyeron en serie con PBS y cada dilución se sembró mediante dos técnicas distintas. Por un lado, mediante el uso de la técnica de extensión en placa por triplicado o mediante la siembra de la microgota (20 μ l) por sextuplicado.³¹³ Se monitorearon las bacterias viables y el número de UFC/ml se determinó en placas de agar Tripticasa Soya (ATS) después de \sim 24 h de incubación a 37°C.

3.12. PDI de bacterias

3.12.1. Inactivación fotodinámica de *S. aureus* y *E. coli* con derivados del fullereno C₆₀. Metodología I

Suspensiones celulares de *S. aureus* (2 ml, \sim 10⁶ UFC/ml) en PBS se incubaron con los fotosensibilizadores MPC₆₀, DPC₆₀²⁺, MMC₆₀ y DMC₆₀³⁺ (0,5 μ M) durante 30 min en la oscuridad a 37°C y con agitación constante (100 rpm). Luego, los cultivos se expusieron durante diferentes intervalos de tiempo (5, 15 y 30 min) a la luz visible. Por otro lado, los estudios con la bacteria *E. coli* (2 ml, \sim 10⁶ UFC/ml en PBS) se llevaron a cabo con DPC₆₀²⁺ y DMC₆₀³⁺ en concentración 1 μ M. Todas las suspensiones celulares (control de irradiación, oscuridad y las tratadas) se diluyeron en forma consecutiva con PBS. Cada dilución se sembró por triplicado en placas de ATS.

3.12.2. Inactivación fotodinámica de *S. aureus* y *E. coli* con derivados del fullereno C₆₀. Metodología II

Suspensiones celulares de *S. aureus* (1 ml, $\sim 10^8$ UFC/ml) en PBS se incubaron con los fotosensibilizadores MPC₆₀, DPC₆₀²⁺, MMC₆₀ y DMC₆₀³⁺ (0,5 μ M) durante 30 min en la oscuridad a 37°C y con agitación constante (100 rpm). Alícuotas de 200 μ l se transfirieron a cada *well* de una placa de 96 pocillos. Luego, los cultivos se expusieron durante diferentes intervalos de tiempo (5, 15 y 30 min) a la luz visible. Los estudios con la bacteria *E. coli* (2 ml, $\sim 10^8$ UFC/ml en PBS) se llevaron a cabo con DPC₆₀²⁺ y DMC₆₀³⁺ en concentración 1 μ M. El cultivo se incubó con la molécula durante 30 min en la oscuridad a 37°C y luego se irradió durante 5, 15 y 30 min con luz visible. Todas las suspensiones celulares (control de irradiación, oscuridad y las tratadas) se diluyeron en forma seriada con PBS. Cada dilución se sembró con la técnica de la microgota (20 μ l) en placas de ATS por sextuplicado.

3.12.3. Inactivación fotodinámica de *S. aureus* y *E. coli* con BODIPYs

Suspensiones celulares de *S. aureus* (1 ml, $\sim 10^7$ UFC/ml) en PBS se incubaron con BDP2 y BDP4 (1 μ M) durante 30 min en la oscuridad a 37°C y con agitación constante (100 rpm). Alícuotas de 200 μ l se transfirieron a una placa de 96 pocillos. Luego, los cultivos se expusieron durante diferentes intervalos de tiempo (5, 15 y 30 min) a la luz visible en ausencia y presencia de KI (50 mM).

Los estudios con la bacteria *E. coli* (2 ml, $\sim 10^7$ UFC/ml en PBS) se llevaron a cabo con BDP2 y BDP4 en concentración 5 μ M. El cultivo se incubó con la molécula durante 30 min en la oscuridad a 37°C y luego se irradió durante 5, 15 y 30 min con luz visible en ausencia y presencia de KI (50 mM). Todas las suspensiones celulares (control de irradiación, oscuridad y las tratadas) se diluyeron en forma seriada con PBS. Cada dilución se sembró con la técnica de la microgota (20 μ l) en placas de ATS por sextuplicado.

3.12.4. Inactivación fotodinámica de *S. aureus* con díadas BODIPY-C₆₀

Suspensiones celulares de *S. aureus* (1 ml, $\sim 10^8$ UFC/ml) en PBS se incubaron con MAC₆₀, MAC₆₀⁺, BDP-C₆₀ y BDP-C₆₀²⁺ (5 μ M) durante 30 min en la oscuridad a 37°C y con agitación constante (100 rpm). Alícuotas de 200 μ l se transfirieron a una placa de 96 pocillos. Luego, los cultivos se expusieron durante diferentes intervalos de tiempo (5, 15 y 30 min) a la luz visible (350-800 nm). La misma experiencia se realizó con MAC₆₀⁺ y

BDP-C₆₀²⁺ irradiando 45 min en un rango de longitud de onda entre 455-800 nm utilizando filtros ópticos (GG455 *cutoff filter*)

Todas las suspensiones celulares (control de irradiación, oscuridad y las tratadas) se diluyeron en forma seriada con PBS. Cada dilución se sembró con la técnica de la microgota (20 µl) en placas de ATS por sextuplicado.

3.13. Mecanismos de acción fotodinámica *in vitro*

3.13.1. Mecanismo de acción fotodinámica de DPC₆₀²⁺, DMC₆₀³⁺ y BDP-C₆₀²⁺ en bacteria

Suspensiones celulares de *S. aureus* y *E. coli* (2 ml, ~10⁸ UFC/ml) en PBS se trataron en diferentes condiciones. Estudios en condiciones anóxicas, se llevaron a cabo mediante el desplazamiento del oxígeno con argón durante 15 min antes de la irradiación, y se mantuvo tal atmósfera durante el tiempo de iluminación. Por otro lado, suspensiones bacterianas en PBS se estudiaron en presencia de azida de sodio, DABCO y D-manitol, que se agregaron al medio a partir de soluciones *stocks* (1M) preparadas en agua. Los microorganismos en las condiciones antes descritas, se incubaron durante 30 min a 37 °C en la oscuridad con el fotosensibilizador correspondiente. Luego, los cultivos se irradiaron con luz visible a un tiempo determinado. Para los ensayos de fotoinactivación en D₂O, las células se centrifugaron (3000 rpm durante 15 min), se re-suspendieron en 2 ml de una solución de PBS en D₂O y se incubaron 30 min con el nuevo medio para permitirle a la bacteria adaptarse al mismo. A continuación, la suspensión se incubó con la cantidad correspondiente del fotosensibilizador. En todos los casos, suspensiones celulares de control irradiadas y en la oscuridad y las tratadas, se diluyeron en forma consecutiva con PBS y cada dilución se sembró por triplicado en placas de ATS.

Para DPC₆₀²⁺ se estudió el mecanismo de acción fotodinámica irradiando 15 min con luz visible y con una concentración de 0,5 µM para *S. aureus*. En el caso de DMC₆₀³⁺ se utilizó una concentración de 0,5 µM para *S. aureus* y 1 µM para *E. coli*.

Para BDP-C₆₀²⁺ se estudió el mecanismo de acción de la díada para la bacteria *S. aureus* con 5 µM de concentración y 30 min de irradiación con luz visible.

3.13.2. Efecto del NADH en la PDI

Suspensiones bacterianas de *S. aureus* (2ml, ~10⁸ UFC/ml) se estudiaron en presencia de diferentes concentraciones de NADH (10, 25 y 50 mM), que se agregó al

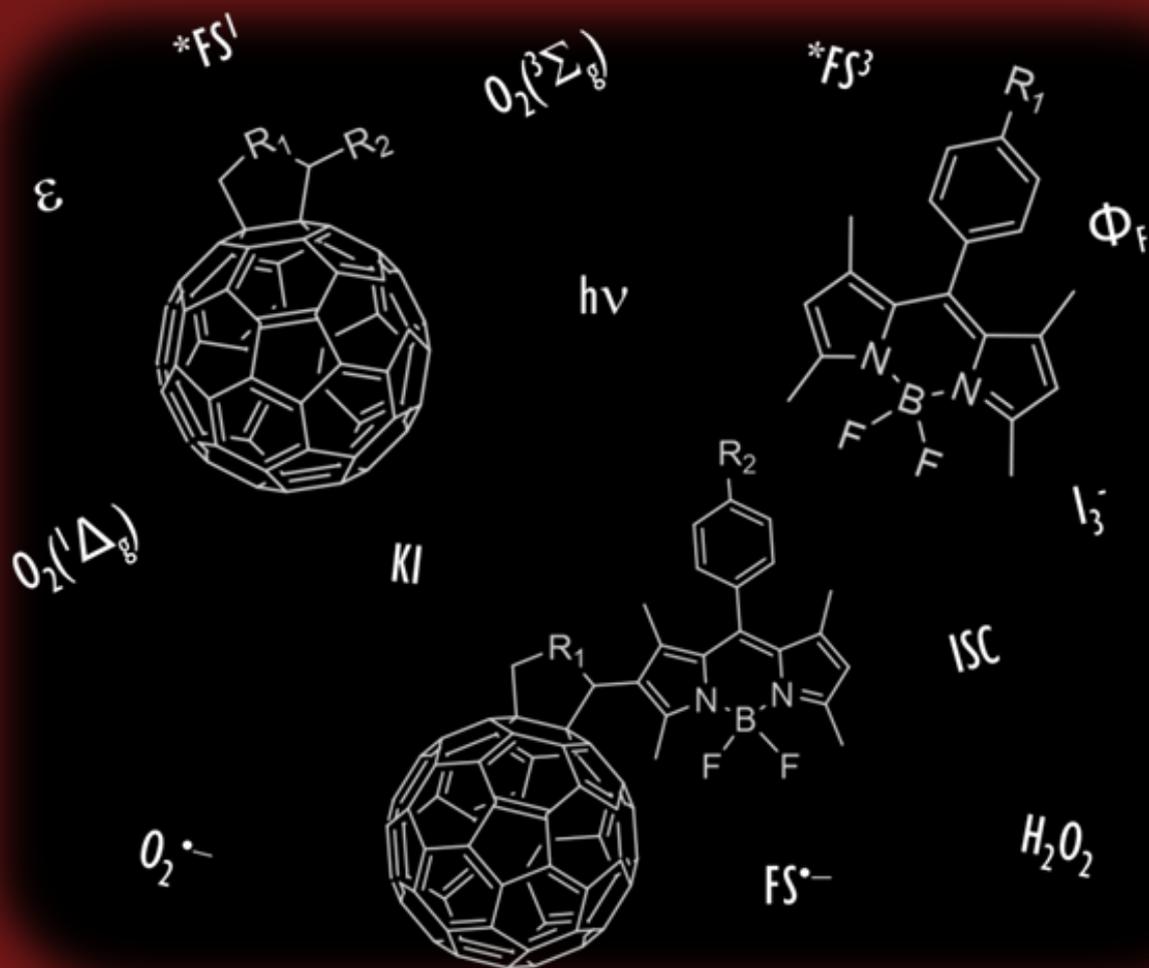
medio a partir de una solución *stock* de 1M preparada en agua. Los microorganismos se incubaron durante 30 min a 37 °C en la oscuridad con 0,5 µM DPC₆₀²⁺ en agitación. Luego, los cultivos se irradiaron con luz visible durante 15 min en policubetas.

3.13.3. Efecto del KI en la PDI

Suspensiones bacterianas de *S. aureus* y *E. coli* (2ml, ~10⁸ UFC/ml) se estudiaron en presencia de KI, el cual se agregó al cultivo a partir de soluciones *stocks* 1 M preparadas en agua. Los microorganismos se incubaron durante 30 min a 37 °C en la oscuridad con el fotosensibilizador en agitación. Luego, los cultivos se irradiaron con luz visible durante 15 min en policubetas. Para DPC₆₀²⁺ se evaluó con 0,5 µM en *S. aureus* a diferentes concentraciones de KI (10, 25 y 50 mM). Para DMC₆₀³⁺ se estudió con 0,5 µM en *S. aureus* y 1 µM en *E. coli* a 50 mM de KI.

3.14. Experimentos control y análisis estadísticos

Los experimentos de control se realizaron en presencia y ausencia de los fotosensibilizadores en la oscuridad, y en la ausencia de estos con células irradiadas. La cantidad de DMF utilizada en cada experimento no resultó tóxica para las células de *S. aureus* ni para las de *E. coli*. Tres o seis valores se obtuvieron por cada condición en función de la metodología empleada, y cada experimento se repitió tres veces por separado. Se utilizó la prueba *t* pareada para establecer la importancia de las diferencias entre los grupos. Tales diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). Los datos se representan como la media ± desviación estándar de cada grupo.



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Derivados del fullereno C₆₀ como fotosensibilizadores



CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Síntesis de derivados del fullereno C₆₀ (MPC₆₀ y DPC₆₀²⁺)

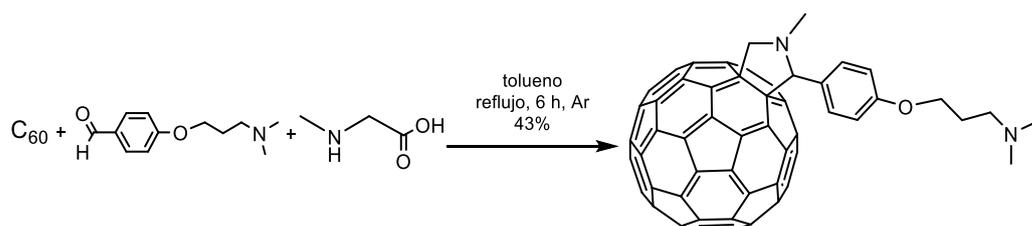
Para facilitar la administración del fotosensibilizador en el medio biológico, es necesaria la apropiada funcionalización del fullereno C₆₀ altamente hidrofóbico. Distintas vías sintéticas se desarrollaron para aumentar la solubilidad de fullerenos en agua, como la incorporación al C₆₀ de unidades de oligo(etilenglicol),^{170,314} restos de aminoácidos,³¹⁵ y grupos funcionales iónicos.³¹⁶ Estas modificaciones químicas aumentan fácilmente la hidrofilia de los compuestos sintetizados. Además, estas vías sintéticas permiten generar FS que presentan un considerable carácter anfifílico. La síntesis de compuestos anfifílicos permite aumentar la solubilidad en el medio biológico, y además incrementar la asociación y penetración del fotosensibilizador en la membrana celular lipofílica.³¹⁷

Otra estrategia que puede utilizarse para disminuir la agregación de los fullerenos en el medio biológico, es aumentar el número de sustituyentes hidrófilos unidos al C₆₀. Sin embargo, esta alternativa puede dar lugar a la formación de regioisómeros dificultando la síntesis y caracterización adecuada del producto deseado.¹⁵⁶ Otra desventaja, aún más importante, se trata del considerable cambio que puede generarse en la configuración de los orbitales moleculares del C₆₀ luego de su polisustitución. Esta modificación puede ocasionar una disminución en la eficiencia del ISC con la consecuente reducción del rendimiento de producción de ROS.³¹⁷

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el diseño de un nuevo agente fotosensibilizador derivado del fullereno C₆₀ se llevó a cabo para la aplicación en la inactivación de microorganismos mediante PDI. La síntesis se realizó a partir de la cicloadición 1,3-dipolar de iluros de azometino a C₆₀.¹⁵³ Esta vía sintética permite obtener derivados de fulleropirrolidinas, que luego, por medio de una metilación exhaustiva adquieren cargas positivas. Mediante este procedimiento se incorporan sustituyentes al fullereno, que permiten variar las propiedades físico-químicas, aumentar la solubilidad en el medio fisiológico, e incorporar funcionalidad a los fullerenos catiónicos formados, para mejorar su efectividad como fotosensibilizadores en la inactivación de bacterias.¹⁵⁸

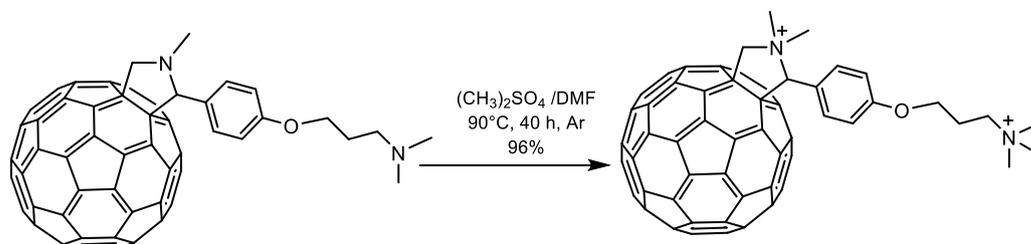
Inicialmente se generó el derivado del C₆₀ neutro (MPC₆₀), mediante la cicloadición 1,3-dipolar. La reacción se llevó a cabo en tolueno anhídrido, a partir de 4-3-(dimetilamino)propoxilbenzaldehído, *N*-metilglicina y fullereno C₆₀ (Esquema 42). La

mezcla de reacción se agitó a reflujo 6 h en atmósfera de Ar. Los productos se purificaron por cromatografía en columna *flash* con sílica gel. Primeramente se utilizó tolueno como eluyente, con el fin de extraer el C₆₀ que quedó sin reaccionar, y luego, para extraer el producto MPC₆₀, una mezcla levemente básica de tolueno/acetato de etilo/TEA. La presencia de TEA (~1%) previene la interacción de las aminas terciarias básicas del producto con la sílica, la cual tiene propiedades débilmente ácidas. El rendimiento obtenido fue de 43% de *N*-metil-2-[4'-(3-*N,N*-dimetilamino)propoxifenil]fulleropirrolidina (MPC₆₀)



Esquema 42. Síntesis de MPC₆₀.

Para obtener el derivado dicatiónico (DPC₆₀²⁺), se realizó una metilación exhaustiva del MPC₆₀ en DMF, con un exceso de sulfato de dimetilo como agente metilante (Esquema 43). La reacción se llevó a cabo durante 40 h, en agitación y atmósfera de argón a 90°C, como se muestra en el esquema a continuación.



Esquema 43. Síntesis de DPC₆₀²⁺.

Luego el producto se precipitó por el agregado de éter etílico y lavado con una solución de Na₂CO₃ para neutralizar restos ácidos. Después de un último lavado con agua, se obtuvo el DPC₆₀²⁺ con un 96% de rendimiento.

Como puede observarse, la estructura de DPC₆₀²⁺ está formada por la esfera hidrofóbica de carbono que contiene dos grupos catiónicos generando un relevante carácter anfifílico. La principal diferencia entre ambos fullerenos es la presencia de dos cargas catiónicas intrínsecas en DPC₆₀²⁺ en contraste con MPC₆₀, que está sustituido por un amina

terciaria alifática. Este grupo en la periferia de la estructura puede adquirir cargas positivas, dependiendo del pH del medio en el que se encuentre.

Por otro lado, la separación entre el centro catiónico y el fullereno mediante un puente alifático propoxi, hace que la influencia de la carga sobre la densidad electrónica del C_{60} sea mínima. Esto puede ayudar a la retención de las importantes propiedades fotofísicas del fullereno. Además, esta cadena proporciona una mayor movilidad de la carga, lo que podría facilitar la interacción con las membranas biológicas.

4.2. Estudios espectroscópicos

4.2.1. Espectroscopia de absorción UV-visible

Los espectros de absorción de los compuestos MPC_{60} y DPC_{60}^{2+} se registraron en medios homogéneos de diferente polaridad como DMF y tolueno, y en un sistema micelar inverso formado por tolueno/AOT(0,1M) /agua ($W_0=10$) (Figura 9). Los espectros de estas estructuras tienen las características típicas encontradas para la mayoría de los C_{60} monosustituídos.¹⁵³ La monofuncionalización del núcleo de fullereno influye en la estructura electrónica y conduce a un cambio de la simetría I_h del fullereno C_{60} , que adopta una simetría efectiva de C_{2v} .¹⁸⁸ De manera similar al C_{60} , los espectros electrónicos de los derivados del fullereno están dominados por absorciones $\pi-\pi^*$ moderadamente fuertes en la región UV. En la región visible, estos fullerenos muestran un rango amplio pero de baja intensidad de absorción, con un pico agudo característico a 430 nm y una banda de baja intensidad a 707 nm para MPC_{60} y 708 nm para DPC_{60}^{2+} .¹⁸⁴

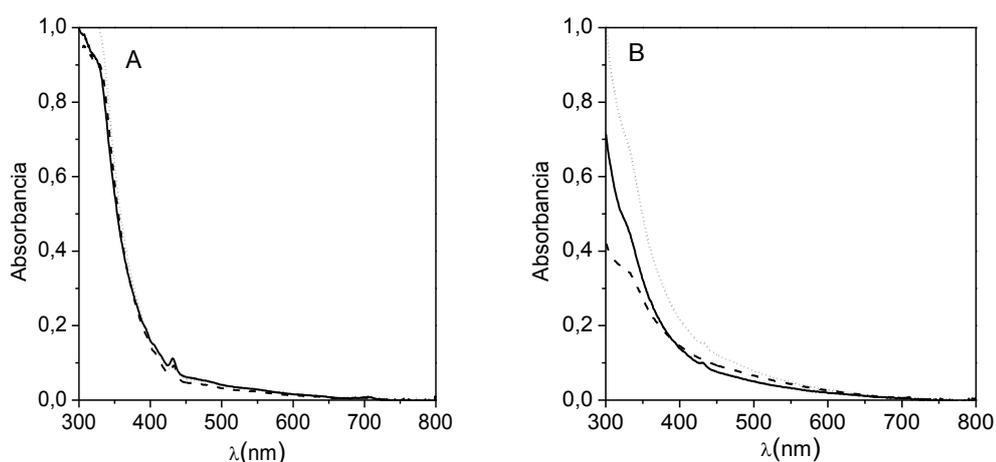


Figura 9. Espectros de absorción UV-visible de A) MPC_{60} y B) DPC_{60}^{2+} en DMF (línea continua), tolueno (línea discontinua) y tolueno/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$) (línea de puntos).

Los espectros de absorción de MPC₆₀ muestran que este derivado presenta una solubilización principalmente como monómero en los dos solventes homogéneos. Además se observan similares características espectrales en tolueno y en tolueno/AOT(0,1M) /agua (W₀=10) indicando que este fullereno en el medio micelar se localiza principalmente en el solvente externo, interactuando débilmente con la interface micelar (Figura 9A).

Por otro lado, para DPC₆₀²⁺ se observa una baja intensidad y un ensanchamiento de las bandas de absorción en tolueno, probablemente debido a la agregación del fullereno dicatiónico en este medio orgánico. Un mayor monomerización del fullereno dicatiónico puede observarse en el medio más polar de DMF. A diferencia del compuesto neutro, la intensidad del espectro aumentó en tolueno/AOT/agua, lo que indica que este sistema micelar biomimético ayuda a la solubilización del fullereno catiónico como monómero, mediante la interacción de este derivado con la interface micelar de carácter aniónica (Figura 9B).

Un comportamiento similar puede observarse en los estudios espectroscópicos para el DTC₆₀²⁺, cuya síntesis se mostró previamente en el Esquema 17. El espectro de este compuesto en DMF es similar al obtenido para DPC₆₀²⁺, aumentando también el grado de monomerización cuando el compuesto se encuentra en un medio micelar inverso. En este caso se trata de una micela inversa constituida por benceno/bencil-*N*-hexadecil-dimetilamonio (BHDC) (0,1 M) /agua (W₀=10).¹⁵⁸

4.2.2. Espectroscopía de fluorescencia

Los espectros de emisión de fluorescencia en estado estacionario de MPC₆₀ y DPC₆₀²⁺ se compararon con el del fullereno C₆₀ en DMF, excitando las muestras a 450 nm (Figura 10). Los espectros mostraron bandas centrada a 717 nm y 716 nm para MPC₆₀ y DPC₆₀²⁺, respectivamente. En la Tabla 2 se muestran las características espectroscópicas de los fullerenos. Estas bandas de emisión son características para otros derivados similares¹⁸⁷. El espectro de fluorescencia de estos derivados es una perfecta imagen especular del espectro de absorción correspondiente.¹⁸⁷ Teniendo en cuenta este espectro, la banda de emisión puede asignarse a la correspondiente transición 0*→0. A partir de la intersección de los espectros de absorción y fluorescencia, se calcularon desplazamientos de Stokes de ~10 nm para ambos fullerenos. Este pequeño corrimiento indica que en estas moléculas la energía de absorción es similar a la energía de relajación del estado singlete

excitado de más baja energía (S_1), lo que está de acuerdo con la estructura altamente simétrica y rígida de los fullerenos y sus derivados.¹⁸³

A partir de la energía de las transiciones electrónicas 0-0, se calcularon los niveles de energía del estado excitado singlete de los fullerenos (E_s), dando en ambos casos un valor de 1,74 eV. Este valor es similar a los reportados anteriormente para este tipo de derivados de fullereno.¹⁸⁷

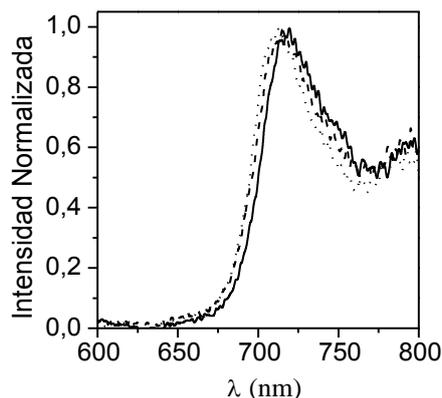


Figura 10. Espectros de emisión de fluorescencia de C_{60} (línea de puntos), MPC_{60} (línea continua) y DPC_{60}^{2+} (línea discontinua) en DMF, $\lambda_{exc}=450$ nm.

Los valores de Φ_F para estos fotosensibilizadores se calcularon por comparación con C_{60} como referencia. En la Tabla 2 se muestran los parámetros espectroscópicos de emisión obtenidos para los derivados del fullereno sintetizados, en comparación con el C_{60} .

Tabla 2. Características espectroscópicas de los fullerenos y rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) en DMF.

Parámetros	C_{60}	MPC_{60}	DPC_{60}^{2+}
λ_{max}^{Abs} (nm)	335/405/700	431/705	431/705
ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	59.400 ^a /3400 ^b	3980 ^c	3920 ^c
λ_{max}^{em} (nm)	712	715	716
Φ_F	$(2,3\pm 0,2)\times 10^{-4}$	$(5,2\pm 0,3)\times 10^{-4}$	$(2,8\pm 0,2)\times 10^{-4}$

^a $\lambda^{Abs} = 335$ nm, ^b $\lambda^{Abs} = 405$ nm, ^c $\lambda^{Abs} = 431$ nm

En general, los derivados de fullereno C₆₀ presentan una baja emisión de fluorescencia y estos valores concuerdan con los reportados previamente para fullerenos similares.^{185,186} La baja emisión que presentan estos compuestos resulta importante para los procesos de fotosensibilización, porque implica que el estado excitado singlete del C₆₀ se desactiva principalmente por el entrecruzamiento de sistema al estado triplete del mismo, estado desde donde se desencadenan las reacciones fotoquímicas de producción de especies reactivas de oxígeno.^{183,188} A pesar de este beneficio, la irrelevante emisión presenta también una desventaja, ya que obstaculiza la cuantificación y detección del agente fotosensibilizador localizado en un microentorno celular. Así, se dificulta estudiar la interacción del fotosensibilizador con diferentes orgánulos intracelulares y determinar el sitio celular de acción. Sin embargo, existen algunos estudios que mediante diversas estrategias lograron detectar el FS en el microentorno celular. Scrivens *et al.* demostraron la incorporación de los fullerenos a cultivos de tejidos de queratinocitos humanos en cultivo de tejidos mediante la preparación de un C₆₀ radiomarcado.³¹⁸ Otro investigadores utilizaron la técnica por tinción de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos que reconocen los fullerenos, para mostrar que un derivado de ácido dicarboxílico se localiza en las mitocondrias y otras membranas intracelulares.³¹⁹ Un artículo reciente describe el uso de la microscopía electrónica de transmisión por filtración de energía y de la técnica de tomografía de electrones, para visualizar la captación celular de nanopartículas de C₆₀ agrupadas en racimos.³²⁰

4.3. Actividad fotodinámica

Uno de los primeros ensayos a realizar con los agentes fotosintetizados es evaluar sus actividades fotodinámicas en presencia de sustratos fotooxidables.³²¹ Esto permite analizar la eficiencia fotodinámica de los fotosensibilizadores y estimar efectos potenciales en sistemas biológicos que son indicativos para la inactivación celular.

Primeramente se estudiaron dos sustratos: DMA y DPBF. Estos compuestos son utilizados para determinar los efectos oxidativos producidos por la presencia de O₂(¹Δ_g), y pueden ser empleados para determinar el rendimiento cuántico de la producción de O₂(¹Δ_g).

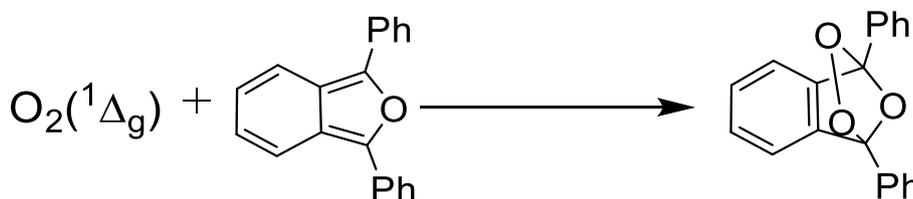
Luego se utilizó la fotooxidación de NBT para la determinación de radical anión superóxido (O₂^{•-}) generado por el mecanismo fotooxidativo tipo I. Por último, se empleó L-triptófano, un aminoácido que se encuentra presente en las proteínas y, además, puede

ser una estructura celular susceptible a la PDI. Este sustrato, en presencia de un fotosensibilizador puede descomponerse por ambos mecanismos fotooxidativos (tipo I y II).^{322,323}

4.3.1. Producción de $O_2(^1\Delta_g)$

4.1.3.1.1. Fotooxidación de DPBF

La descomposición de DPBF fotosensibilizada por los derivados de fullereno se estudió en DMF. Las soluciones se irradiaron en condiciones aeróbicas.¹⁷² En general, es asumido que DPBF se descompone sólo por el $O_2(^1\Delta_g)$ generado por el fotoproceso tipo II, mediante una reacción de cicloadición 4+2 para producir 1,2-dibenzoilbenceno, como se representa en la Esquema 44.^{321,324}



Esquema 44. Reacción de DPBF con $O_2(^1\Delta_g)$

Esta descomposición puede analizarse siguiendo la disminución de la banda de absorción del DPBF a 415 nm (Figura 11A). Además, es conocido que DPBF desactiva el $O_2(^1\Delta_g)$ casi exclusivamente por reacción química, siendo despreciable la desactivación física.³²¹

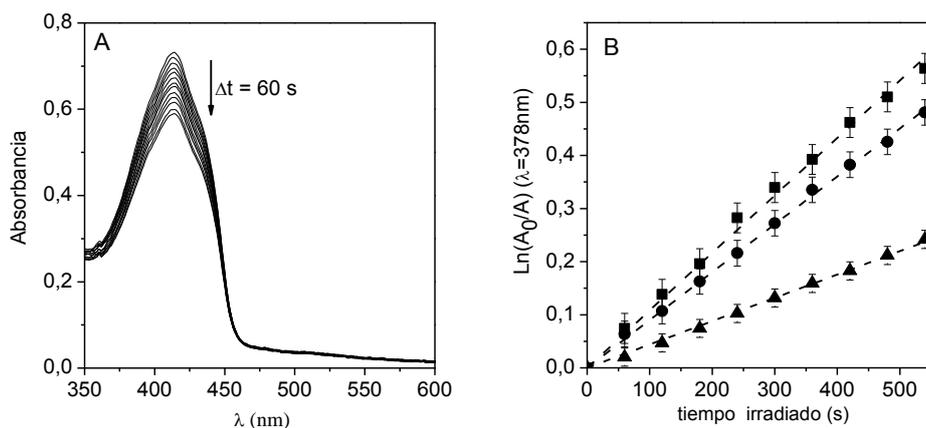


Figura 11. A) Descomposición de DPBF sensibilizada por MPC₆₀ en DMF, irradiado con luz monocromática ($\lambda=480$ nm) B) Gráfico de primer orden para la fotooxidación de DPBF (20 mM) fotosensibilizada por C₆₀, (■), MPC₆₀ (●) y DPC₆₀²⁺ (▲) en DMF.

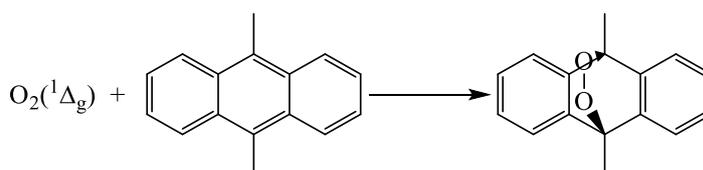
La Figura 11B muestra los gráficos semilogarítmicos que describen el progreso de la reacción de descomposición de DPBF sensibilizada por los derivados del fullereno C₆₀.

A partir de las pendientes de estos gráficos se obtuvieron las constantes de velocidad observadas (Tabla 3, k_{obs}^{DPBF}). Los valores de Φ_{Δ} se calcularon comparando las pendientes de los derivados de *N*-metilpirrolidinofullerenos con la correspondiente a la referencia, C₆₀ ($\Phi_{\Delta}=1$).¹⁸⁸ Los valores obtenidos para MPC₆₀ y DPC₆₀²⁺ son de $\Phi_{\Delta}=0,82\pm0,01$ y $\Phi_{\Delta}=0,42\pm0,01$, respectivamente, lo que demuestra que ambos compuestos fotodescomponen eficientemente el sustrato.

Un resultado similar a MPC₆₀ de producción de O₂(¹Δ_g) se encontró previamente con el derivado no cargado, *N*-metil-2-(4'-acetamidofenil) fulleropirrolidina, en DMF/agua (10%).¹⁵⁸ Sin embargo, en el mismo estudio, se encontró una muy baja producción de O₂(¹Δ_g) ($\Phi_{\Delta}\sim0,07$) para el derivado dicatiónico DTC₆₀²⁺, debido probablemente a la monomerización incompleta de tal fullereno dicatiónico en el medio de reacción.

4.3.1.1.2. Fotooxidación de DMA

La producción de O₂(¹Δ_g) por los fullerenos también se estudió en presencia del sustrato 9,10-dimetilantraceno (DMA). Esta molécula reacciona específicamente con el O₂(¹Δ_g), dando lugar a la formación de endoperóxido en su estructura, formado a expensas de la oxidación de los dobles enlaces en el anillo central. Este sustrato, de manera similar a DPBF, desactiva al O₂(¹Δ_g) exclusivamente por una reacción química (Esquema 45).^{317,321} Por lo tanto, DMA puede emplearse para evaluar la habilidad de los fotosensibilizadores para producir O₂(¹Δ_g).



Esquema 45. Reacción de DMA con O₂(¹Δ_g).

La fotooxidación de DMA fotosensibilizada por MPC₆₀ y DPC₆₀²⁺ se analizó en DMF y en medio micelar tolueno/AOT (0,1M)/agua (W₀=10), irradiando la solución en condiciones aeróbicas. En la oscuridad, no se observaron cambios en los espectros de absorción del DMA en presencia de los fotosensibilizadores. Sin embargo, cuando la solución con el fotosensibilizador se irradió con luz monocromática ($\lambda=450$ nm), la fotooxidación pudo seguirse espectroscópicamente por la desaparición de una de las

bandas características del DMA a una longitud máxima de 378 nm (Figura 12). En todos los casos estudiados, la fotooxidación sigue una cinética de pseudo primer orden a dicha longitud de onda con respecto a la concentración de DMA.

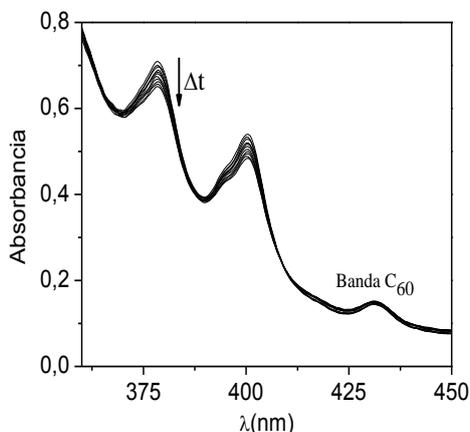


Figura 12. Descomposición de DMA sensibilizada por MPC₆₀ en DMF, irradiado con luz monocromática ($\lambda_{\text{irr}}=450$ nm)

En la Figura 13, se muestran las gráficas semilogarítmicas típicas que describen el progreso de la reacción para DMA fotosensibilizada por los fullerenos en DMF. A partir de las pendientes de estos gráficos se obtuvieron las constantes de velocidad observadas ($k_{\text{obs}}^{\text{DMA}}$, Tabla 3), irradiando el sistema a 450 nm.

El Φ_{Δ} se calculó comparando la pendiente de los fulleropirrolidinas con la correspondiente pendiente obtenida para el compuesto de referencia, C₆₀, en DMF.¹⁸⁸ Los resultados se muestran en la Tabla 3. Como puede observarse, las especies no cargadas, C₆₀ y MPC₆₀ fotodescomponen DMA con k_{obs} comparables, indicando que MPC₆₀ produce O₂(¹Δ_g) con una eficiencia relevante en este medio. Se calculó un valor de $\Phi_{\Delta}=0,76\pm0,01$ para MPC₆₀ en este medio homogéneo. Es conocido que la derivatización del núcleo de fullereno produce una disminución en la actividad fotodinámica, y que tal efecto no es significativamente dependiente del tipo de sustituyente.¹⁹¹

El derivado dicatiónico DPC₆₀²⁺ produce O₂(¹Δ_g) con un rendimiento cuántico de $\Phi_{\Delta}=0,44\pm0,01$. Esta disminución de Φ_{Δ} en relación al compuesto no cargado MPC₆₀, puede deberse probablemente a la mayor agregación del fullereno catiónico en DMF.

Es importante resaltar la similitud de los valores de los Φ_{Δ} obtenidos con los dos sustratos específicos, DPBF y DMA, para reaccionar con el O₂(¹Δ_g). Al igual que lo encontrado en la fotodegradación de DPBF, el Φ_{Δ} de DPC₆₀²⁺ (Esquema 17) en DMF es

considerablemente menor que el fullereno neutro MPC₆₀, debido a la agregación del compuesto catiónico en el solvente orgánico.

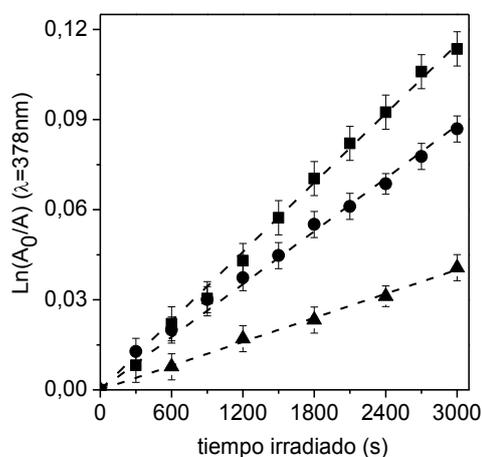


Figura 13. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de DMA (35 μM) fotosensibilizada por C₆₀, (■), MPC₆₀ (●) y DPC₆₀²⁺ (▲) en DMF.

La producción de O₂(¹Δ_g) a partir de los fullerenos también se analizó en medio micelar. Las micelas inversas son sistemas dinámicos constituidos por moléculas anfífilas (surfactantes), cuyos grupos polares se ubican hacia el interior permitiendo la solubilidad en solventes lipofílicos. La solubilización de sustratos en soluciones micelares juega un rol importante tanto en procesos biológicos como industriales.³²³ En estos sistemas, el soluto puede localizarse en diferentes microentornos: el solvente orgánico externo, el centro acuoso o la interfaz micelar.

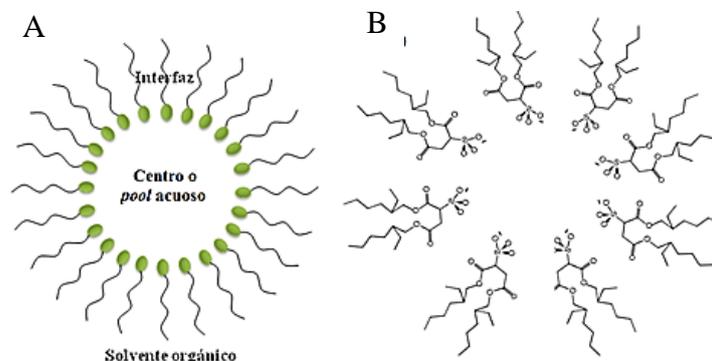
Estos sistemas microheterogéneos se emplean frecuentemente como un modelo simplificado de membranas y para imitar el agua localizada en diferentes compartimentos subcelulares.¹⁵⁸ También han sido utilizados como medios biomiméticos simples para evaluar el comportamiento de sustratos de origen biológico, proteínas y enzimas.^{323,325}

Entre los surfactantes capaces de formar micelas inversas, el AOT es uno de los más usados debido a que, en solventes no polares, tienen la habilidad de solubilizar grandes cantidades de agua (Esquema 46).

Compuestos solubles e insolubles en agua pueden disolverse simultáneamente en las micelas inversas debido a la presencia de éstos microentornos biomiméticos de diferente polaridad.

La fotooxidación de DMA por medio de los fullerenos se analizó en micelas inversas de tolueno/AOT (0,1 M)/agua (W₀=10) en condiciones aeróbicas (Figura 14). Debido al

carácter no polar del DMA, puede asumirse que este sustrato está principalmente disuelto en la fase orgánica (tolueno) del sistema micelar.³²⁶ En este microentorno, el sustrato reacciona con el $O_2(^1\Delta_g)$ producido.



Esquema 46. A) Representación esquemática de una micela inversa. B) Micela inversa de tolueno/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$).

En Tabla 3, se muestran los valores de k_{obs} para la fotooxidación de DMA en micelas. El derivado del C_{60} neutro resultó ser el generador de $O_2(^1\Delta_g)$ más eficiente, mientras que el derivado dicatiónico también produce $O_2(^1\Delta_g)$, pero en menor medida. Se encontró una alta generación de $O_2(^1\Delta_g)$ para MPC_{60} y DPC_{60}^{2+} . Estos fullerenos pueden interactuar con las micelas de AOT a través de sus sustituyentes polares. Además, debido al elevado carácter lipofílico de la esfera de fullereno, se espera que los derivados anfifílicos se localicen en la interfase micelar con la esfera de C_{60} situada en el disolvente no polar. La localización de C_{60} en la pseudofase de tolueno disminuye la formación de ROS por mecanismo tipo I, favoreciendo la fotosensibilización de $O_2(^1\Delta_g)$ desde el estado triplete del fullereno. Por otro lado, al comparar estos resultados con los obtenidos en el medio homogéneo de DMF, se observa que las velocidades de fotodescomposición de DMA son menores en el medio micelar. Un comportamiento similar se observó anteriormente en micelas inversas de AOT utilizando porfirinas como fotosensibilizadores.¹²⁰ En estos sistemas, el $O_2(^1\Delta_g)$ se reparte entre los pseudofases internas y externas de la micela de AOT. Además, la velocidad de reacción de la fotooxidación con DMA puede ser menor en el pseudofase de tolueno que en un disolvente más polar, tal como DMF.³²⁶

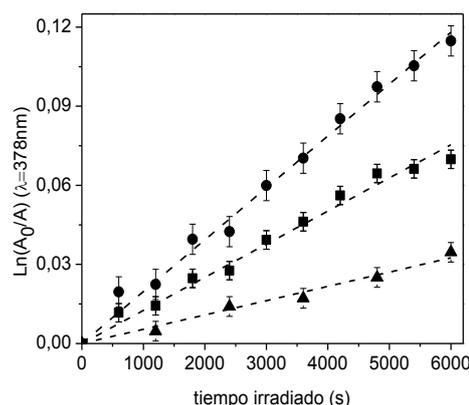
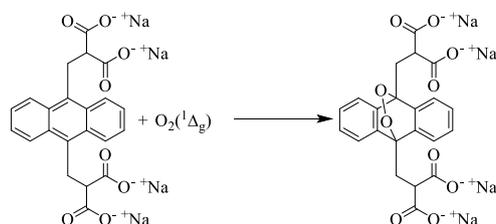


Figura 14. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de DMA (35 μM) fotosensibilizada por C_{60} , (■), MPC_{60} (●) y DPC_{60}^{2+} (▲) en micelas inversas de tolueno/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$).

4.3.1.1.3. Fotooxidación de ABMM

Para detectar la capacidad de FS para producir $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ en medio acuoso, se utilizó un derivado del antraceno (ABMM) soluble en solventes polares, que forma el producto 9,10-endoperóxido (ABMM- O_2) (Esquema 47).¹²⁰ Por lo tanto, se siguió espectroscópicamente la disminución de la absorbancia de ABMM, el cual es un sustrato que desactiva a $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ por reacción química exclusivamente.³²⁷ Todas las medidas se llevaron a cabo en condiciones aeróbicas.



Esquema 47. Reacción de ABMM con $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.

La fotooxidación de este sustrato medida por ambos fullerenos no se detectó en agua después de 10 min de irradiación. Estos fullerenos pueden formar agregados en este medio, produciendo una disminución considerable en la formación de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.¹⁵⁸ Sin embargo, se detectó fotodescomposición de ABMM en una solución de DMF/agua (1:1) por fotosensibilización de ambos fullerenos. La fotooxidación sigue una cinética de *pseudo* primer orden a una longitud de onda escogida de 378 nm con respecto a la concentración de ABMM. A partir de los gráficos logarítmicos característicos (Figura 15), que describen el progreso de la reacción del sustrato, se calcularon los valores de k_{obs} para cada fotosensibilizador (Tabla 3).

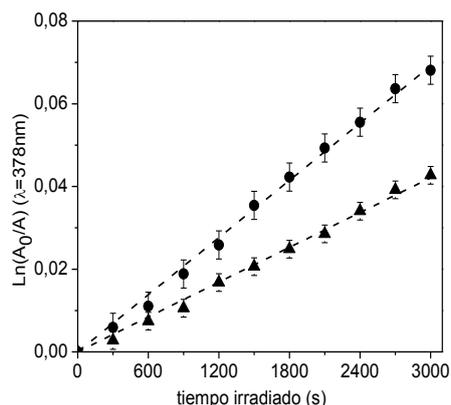


Figura 15. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de ABMM (35 μ M) fotosensibilizada por MPC₆₀ (●) y DPC₆₀²⁺ (▲) en DMF/agua (1:1).

Un valor más bajo de k_{obs}^{ABMM} fue encontrado para DPC₆₀²⁺ que en el caso de MPC₆₀. Esto puede deberse a que la estructura aniónica de ABMM interacciona fuertemente con los fotosensibilizadores catiónicos interfiriendo en la generación de O₂(¹ Δ_g).¹²⁰

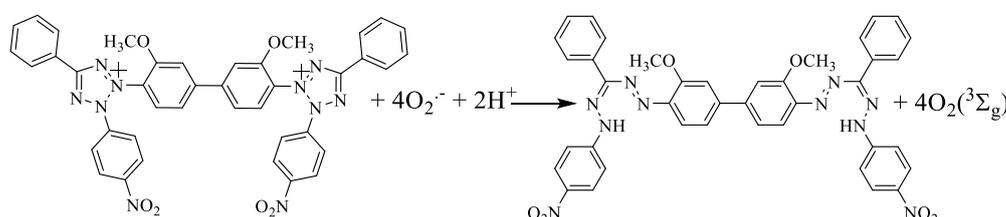
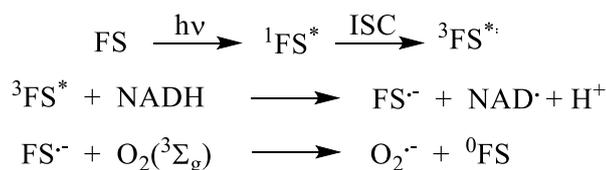
Tabla 3. Parámetros cinéticos (k_{obs}) y rendimientos cuánticos (Φ_Δ) de producción de O₂(¹ Δ_g) de los derivados de fullereno en diferentes medios

Parámetros	Medio	C ₆₀	MPC ₆₀	DPC ₆₀ ²⁺
k_{obs}^{DMA} (s ⁻¹)	DMF	(3,83±0,06)x10 ⁻⁵	(2,94±0,05)x10 ⁻⁵	(1,69±0,04)x10 ⁻⁵
Φ_Δ (DMA)	DMF	1 ^b	0,76±0,04	0,44±0,03
k_{obs}^{DMA} (s ⁻¹)	AOT ^a	(1,26±0,07)x 10 ⁻⁵	(1,97±0,08)x10 ⁻⁵	(0,54±0,03)x10 ⁻⁵
k_{obs}^{ABMM} (s ⁻¹)	DMF/agua ^c	-	(2,30±0,06)x10 ⁻⁵	(1,40±0,05)x10 ⁻⁵
k_{obs}^{DPBF} (s ⁻¹)	DMF	(1,08±0,03)x10 ⁻³	(0,90±0,02)x10 ⁻³	(0,45±0,02)x10 ⁻³
Φ_Δ (DPBF)	DMF	1 ^b	0,83±0,04	0,42±0,03
k_{obs}^{Trp} (s ⁻¹)	DMF	-	(1,12±0,01) x10 ⁻⁴	(0,79±0,01) x10 ⁻⁴

^a tolueno/AOT (0,1M)/agua (W₀=10), ^b de ref. 188 ^c 1:1.

4.3.2. Determinación de $O_2^{\cdot-}$

Para este estudio se empleó un derivado de las sales de tetrazolio, NBT. Este sustrato se utilizó para la determinación de $O_2^{\cdot-}$ debido a que tal radical reacciona con NBT para producir DF, el cual presenta una banda de absorción centrada a ~ 560 nm en DMF/ H₂O 1% (Esquema 48). De esta manera, la producción de $O_2^{\cdot-}$ puede determinarse a partir de los cambios en el espectro de absorción (Figura 16A).³²⁸



Esquema 48. Formación del DF a partir de la reacción entre ${}^3\text{FS}^*$ y NADH, y entre el $O_2^{\cdot-}$ y NBT.

Los fotosensibilizadores MPC₆₀ y DPC₆₀²⁺ se irradiaron en DMF en condiciones aeróbicas en presencia de NBT y el reductor NADH. Ambos fotosensibilizadores muestran un comportamiento muy similar frente a la producción de $O_2^{\cdot-}$, siendo un poco mayor la producción del derivado no cargado MPC₆₀ (Figura 16B).

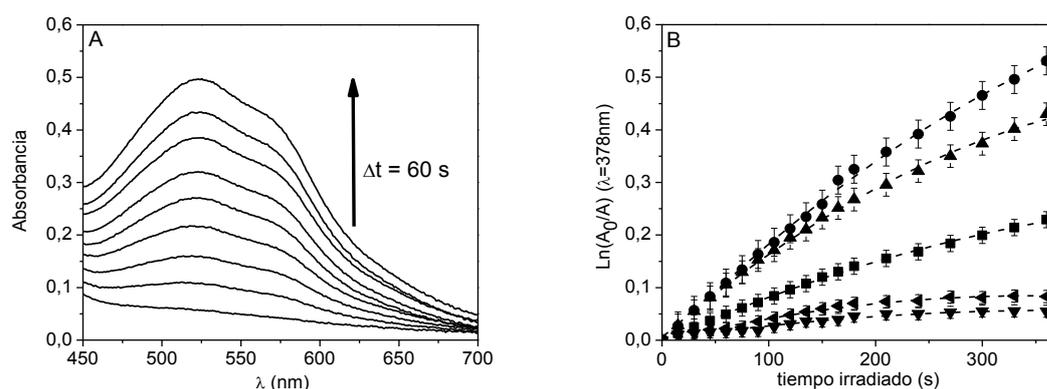


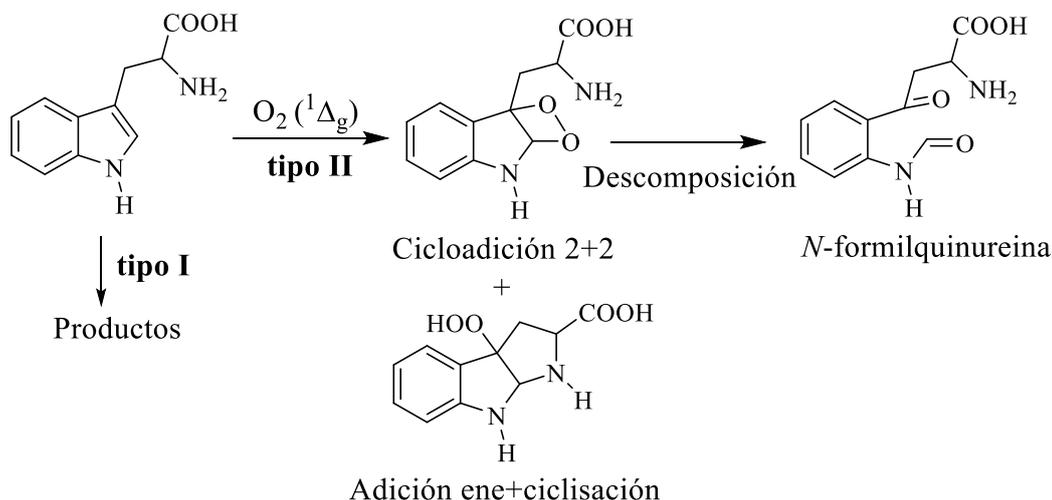
Figura 16. A) Aumento de la absorbancia a medida que transcurre el tiempo de irradiación debido a la aparición del producto diformazan. MPC₆₀ + NBT + NADH en DMF. B) Detección de $O_2^{\cdot-}$ mediante la reacción con NBT (2 mM) a diferentes tiempos de irradiación con luz visible. NBT + NADH(■); NBT + MPC₆₀ (◄); NBT + DPC₆₀²⁺ (▼); NBT + NADH + MPC₆₀ (●) NBT + NADH+ DPC₆₀²⁺ (▲) en DMF.

Además, experimentos control se realizaron en ausencia de NBT, NADH o del fotosensibilizador. En los dos primeros casos no hubo producción de $O_2^{\bullet-}$, mientras que cuando el fotosensibilizador está ausente en el medio de reacción, pero están presentes NBT y NADH, se genera una cantidad mínima de este radical (Figura 16B).

Estos resultados nos indican que existe un aporte significativo del mecanismo tipo I a la acción fotodinámica de ambos fotosensibilizadores en el medio homogéneo DMF. En un trabajo previo, se detectó la formación de $O_2^{\bullet-}$ por parte de un derivado del fullereno C_{60} dicatiónico en presencia de NBT y NADH. El estudio se llevó a cabo en micelas inversas formadas por BHDC, una molécula anfifílica catiónica. El sistema micelar estaba compuesto por benceno/BHDC (0,1 M)/agua ($W_0=10$). La solución se irradió con luz visible durante diferentes períodos de tiempo.¹³⁷ Estos resultados ponen en evidencia que los derivados del C_{60} , son fotosensibilizadores eficientes para la producción de $O_2^{\bullet-}$, una de las ROS implicada en el mecanismo de acción fotodinámico tipo I.¹⁹⁶

4.3.3. Fotooxidación de L-triptófano

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 49).^{329,330}



Esquema 49. Reacción de L-triptófano con el oxígeno molecular singlete.

El efecto fotodinámico se analizó a partir de la fotodescomposición del aminoácido Trp en DMF, siguiendo la disminución de la emisión de fluorescencia a ~ 340 nm (Figura 17A). La descomposición sigue una cinética de pseudo primer orden con respecto a la

concentración de Trp, como se muestra en la Figura 17B, para [Trp]=20 μ M. A partir de estos gráficos, se calcularon los valores de k_{obs}^{Trp} para la descomposición de Trp sensibilizada por los fullerenos.

Ambos fotosensibilizadores descomponen eficientemente el Trp. Los valores de k_{obs} que se obtuvieron para MPC₆₀ y DPC₆₀²⁺ se presentan en la Tabla 3. El menor valor obtenido para el fullereno dicatiónico es coherente con los resultados mostrados anteriormente, cuando se estudiaron los sustratos específicos de O₂(¹ Δ_g) (DMA y DPBF), y NBT para O₂^{•-}. Como ya se describió, el menor valor de k_{obs} para DPC₆₀²⁺ puede explicarse considerando que el mismo se encuentra más agregado en el solvente orgánico que su respectivo fullereno sin carga.

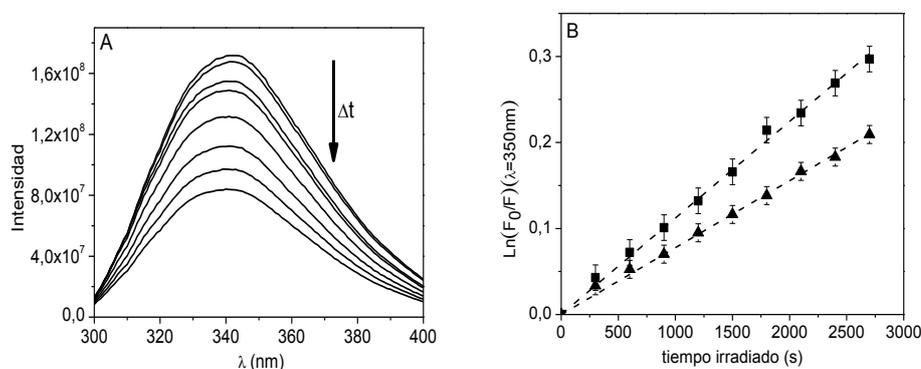


Figura 17. A) Fotodescomposición de Trp sensibilizada por MPC₆₀ en DMF, irradiado con luz monocromática ($\lambda=450$ nm). B) Gráficos de primer orden para la fotooxidación de Trp (20 μ M) sensibilizada por MPC₆₀ (●) y DPC₆₀²⁺ (▲) en DMF.

Debido a que la fotooxidaciones de DMA y Trp, se estudiaron en las mismas condiciones experimentales y, si se considera que la fotodescomposición de Trp ocurre exclusivamente por O₂(¹ Δ_g), se puede calcular la constante de velocidad de reacción para el Trp (k_r^{Trp}). A partir de la ecuaciones 4 y 9, se puede escribir al ecuación 12:

$$\frac{k_{obs}^{DMA}}{k_{obs}^{Trp}} = \frac{k_r^{DMA} [O_2(^1\Delta_g)]}{k_r^{Trp} [O_2(^1\Delta_g)]} \quad (12)$$

Simplificando y despejando el término k_r^{Trp} se obtiene:

$$k_r^{Trp} = \frac{k_{obs}^{Trp} k_r^{DMA}}{k_{obs}^{DMA}} \quad (13)$$

Teniendo en cuenta que $k_r^{DMA}=5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$,³³¹ se obtienen valores de k_r^{Trp} de $1,9 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $2,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para MPC₆₀ y DPC₆₀²⁺, respectivamente. Estos valores son superiores al encontrado para la fotooxidación de Trp mediada por O₂(¹Δ_g) en HCONH₂/D₂O (90:10, $k_r^{Trp}=8,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) o en metanol/H₂O (50:50, $k_r^{Trp}=7,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).³³² Por lo tanto, es posible que una contribución del mecanismo tipo I esté también interviniendo en la descomposición de Trp inducida por estos derivados de fullereno.

Por otro lado, es importante resaltar, que la misma experiencia se realizó en el medio micelar de AOT descrito anteriormente. Sin embargo, en este caso no se observó una fotodegradación considerable del Trp cuando se irradió en presencia del fotosensibilizador, con luz monocromática ($\lambda_{irr}=450$), la misma cantidad de tiempo que en el medio homogéneo. En las micelas inversas de AOT, el Trp es exclusivamente solubilizado en la zona polar de la interfaz. Debido al carácter lipofílico que presenta la esfera carbonada en los derivados del fullereno C₆₀, es probable que estos compuestos se localicen en la interfaz micelar, con la parte hidrofóbica orientada hacia el solvente no polar (tolueno). Como se dijo anteriormente, el O₂(¹Δ_g) que se produce a partir del estado triplete excitado del fullereno C₆₀ se encuentra repartido en los sistemas microheterogéneos, entre el solvente orgánico y la interfaz micelar. Este reparto del O₂(¹Δ_g) y su tiempo de vida más corto en el medio acuoso $4.62 \mu\text{s}$ y ($\tau^1(\text{DMF}) / \tau^1(\text{H}_2\text{O}) \sim 6$),³³³ pueden producir la relevante disminución en la velocidad de reacción con respecto al medio homogéneo.

Luego de evaluadas las propiedades fotodinámica de ambos fotosensibilizadores utilizando distintos sustratos fotooxidables, podemos concluir que ambas moléculas producen eficientemente ROS en los medios estudiados. Además se observó que la producción de ROS es dependiente del medio donde se localiza el FS y disminuye considerablemente cuando el mismo se encuentra parcialmente agregado. Por otro lado, en los medios biológicos, el microentorno celular donde el fotosensibilizador se localiza y la presencia de variados sustratos, pueden producir modificaciones en las propiedades observadas en solución.

4.4. Inactivación fotodinámica *in vitro* de *S. aureus*

Los fotosensibilizadores MPC₆₀ y DPC₆₀²⁺ se evaluaron como agentes fotodinámicos *in vitro* utilizando la bacteria Gram positiva *S. aureus*, a dos densidades celulares diferentes.

En primer lugar, se analizó la toxicidad celular inducida por estos fullerenos en ausencia de luz a diferentes concentraciones de fotosensibilizador. Cuando los cultivos que contenían 10^6 UFC/ml se trataron con $5 \mu\text{M}$ de MPC_{60} por 30 min en la oscuridad, no se detectó toxicidad. Sin embargo, el compuesto DPC_{60}^{2+} resultó ser citotóxico bajo las mismas condiciones experimentales. En estudios previos, dos isómeros de C_{60} -bis(*N,N*-dimetilpirrolidinio) fueron usados para estudiar el efecto bacteriostático de derivados de fullerenos en bacterias.³³⁴ La inactivación fue atribuida a la inhibición del metabolismo energético. Por lo tanto, altas concentraciones de fullerenos catiónicos pueden inhibir la actividad de la cadena respiratoria resultando tóxicos en la oscuridad.

Finalmente, no se encontró toxicidad en la oscuridad cuando se trataron los cultivos celulares (10^6 UFC/ml y 10^8 UFC/ml) con ambos fullerenos a $0,5 \mu\text{M}$, y por lo tanto se seleccionó tal concentración para los estudios fotodinámicos *in vitro*.

Suspensiones de células de *S. aureus* ($\sim 10^6$ UFC/ml y $\sim 10^8$ UFC/ml) en PBS se trataron con $0,5 \mu\text{M}$ de fotosensibilizador durante 30 min a 37°C en la oscuridad y luego los cultivos se irradiaron con luz visible. Las Figuras 18 y 19 muestran las curvas de supervivencia de las células bacterianas después de diferentes tiempos de irradiación (5, 15 y 30 min). Los experimentos de control mostraron que la viabilidad de *S. aureus* no se vio afectada por la iluminación en ausencia de fotosensibilizador, ni tampoco por incubación en la oscuridad con $0,5 \mu\text{M}$ de cada fullereno, lo que indica que la mortalidad celular resultante después de la irradiación de los cultivos tratados, es debido al efecto de fotosensibilización del agente producido por la luz visible.

Para ambas densidades celulares, puede observarse que la viabilidad de las células de *S. aureus* después de la irradiación es dependiente tanto del derivado del fullereno utilizado en el tratamiento como también del nivel de exposición a la luz.

Primeramente, se irradiaron cultivos de 10^6 UFC/ml en tubos de cultivo (13x100 mm) con luz visible (Figura 18). Una fotoinactivación similar se obtuvo para ambos fullerenos a tiempos cortos de irradiación. Cuando se prolongó el tiempo de irradiación hasta 30 min, se alcanzó una mayor actividad fotosensibilizante para DPC_{60}^{2+} . Este fullereno dicatiónico generó una disminución de 4,20 log de la supervivencia celular, generando un 99,99% de inactivación, mientras que el fullereno no cargado mostró un efecto de inactivación de 2,13 log.

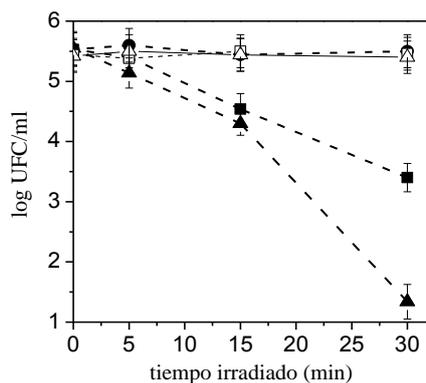


Figura 18. Curvas de supervivencia de células de *S. aureus* (2 ml, $\sim 10^6$ UFC/ml) incubadas con 0,5 μ M de MPC₆₀ (■) y DPC₆₀²⁺ (▲) por 30 min a 37 °C en la oscuridad y expuestas a luz visible por diferentes tiempos de irradiación en tubos de cultivo (13x100 mm). Cultivos de control: células tratadas con 0.5 μ M MPC₆₀ (□) and DPC₆₀²⁺ (△) en la oscuridad; células no tratadas con fotosensibilizador e irradiadas (●).

Posteriormente se evaluó la actividad fotodinámica de ambos fullerenos irradiando suspensiones de *S. aureus* partiendo de $\sim 10^8$ UFC/ml en una policubeta de 96 pocillos (Figura 19). A esta densidad celular, la actividad fotocitotóxica mediada por ambos fullerenos fue similar a los 15 min de irradiación, produciendo una disminución de 4 log de la supervivencia, que significa una muerte celular del 99,99%. Después de 30 min de irradiación, el fullereno dicatiónico exhibe un decrecimiento de la supervivencia celular de 4,8 log. Este resultado representa un valor mayor a 99,998% de inactivación celular. En las mismas condiciones, MPC₆₀ evidenció una inactivación de 4,2 log. Puede observarse que para ambos fotosensibilizadores se produjo una disminución en la susceptibilidad celular creciente con el tiempo de irradiación. En la primera parte de la curva de supervivencia (<15 min), la población de bacterias más susceptibles fue fotoinactivada con mayor eficacia y rapidez. Sin embargo, después de este tiempo, las células restantes se vieron menos afectadas por la acción fotodinámica y, por lo tanto, resultaron más difíciles de erradicar. Además, la mayor fotoinactivación de *S. aureus* inducida por DPC₆₀²⁺ en comparación a la generada por MPC₆₀, indica que la presencia de cargas positivas intrínsecas en el fullereno catiónico produce una mayor interacción con las células que su homólogo con los grupos aminos terciarios.

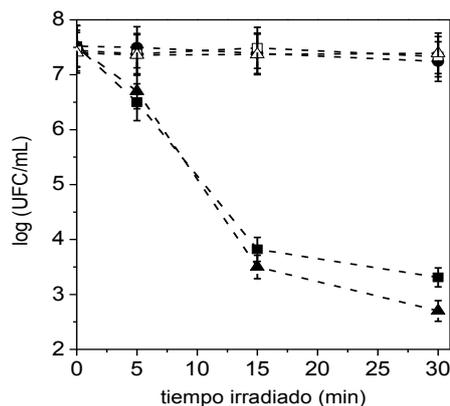


Figura 19. Curvas de supervivencia de células de *S. aureus* (2 ml, $\sim 10^8$ UFC / ml) incubadas con 0,5 μ M de MPC₆₀ (■) y DPC₆₀²⁺ (▲) por 30 min a 37 °C en la oscuridad y expuestas a luz visible por diferentes tiempos de irradiación en policubetas de 96 pocillos. Cultivos de control: células tratadas con 0,5 μ M MPC₆₀ (□) y DPC₆₀²⁺ (△) en la oscuridad; células no tratadas con fotosensibilizador e irradiadas (●).

Esta mayor eficiencia fotodinámica de DPC₆₀²⁺, más acentuada en la primera experiencia, se explica considerando que los fotosensibilizadores con grupos catiónicos son agentes antimicrobianos más eficaces. Se conoce, que las células bacterianas poseen una carga electrostática global negativa en su superficie externa, haciendo que los agentes catiónicos se unan electrostáticamente, con mayor eficacia a las capas externas de la superficie celular, generando mayor daño celular.^{156,159}

Las comparaciones con otros fotosensibilizadores reportados resultan difíciles, debido a las distintas condiciones experimentales en los que se llevan a cabo los estudios. Diversos fullerenos catiónicos han resultado eficientes para fotoinactivar *S. aureus*, produciendo en general, disminuciones en la supervivencia celular de 4-6 log.³³⁵

Por otro lado, la eficacia de DPC₆₀²⁺ puede ser comparada favorablemente con algunos compuestos que son bien aceptados en la literatura. Cuando se comparan en condiciones experimentales similares, las concentraciones que se necesitan de fotosensibilizador para producir una inactivación de 3 log (99,9%), que es una inactivación aceptada como una intervención antimicrobiana efectiva equivalente a los desinfectantes,¹⁵⁹ observamos que, por ejemplo, el azul de metileno, que es uno de los pocos FS aprobados para el uso clínico en odontología³³⁶ exige 20 μ M para lograr un decaimiento de 3 log (99,9%),²⁰² mientras que el azul de toluidina, otro FS conocido, necesita 10 μ M.²⁰⁴

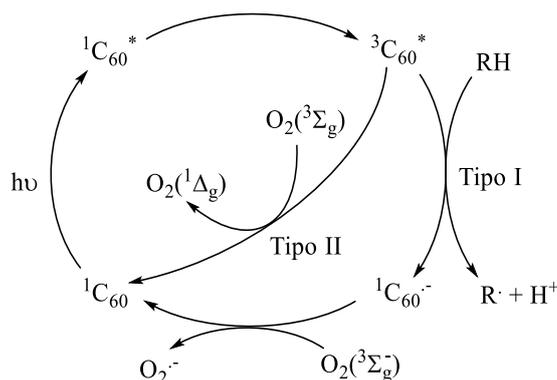
Con el fin de obtener información acerca de la eficiencia de los derivados del fullerenos C₆₀ para inactivar una bacteria Gram negativa, se realizaron experimentos de PDI empleando el microorganismo *E. coli*. De esta manera, suspensiones celulares de esta bacteria se trataron con MPC₆₀ y DPC₆₀²⁺ de la misma forma que se empleó para *S. aureus*. Primeramente se evaluó la toxicidad en la oscuridad con 1 μM de cada fotosensibilizador, para cultivos con 10⁶ UFC/ml. Ambos FS no resultaron tóxicos en la oscuridad, por lo que se prosiguió a realizar los estudios fotodinámicos con esta concentración. En este caso se observó una menor inactivación fotodinámica en comparación con la observada para *S. aureus*. Cuando se irradió MPC₆₀ por 30 minutos, no se observó disminución de la supervivencia celular. Para DPC₆₀²⁺, se produce una disminución de la viabilidad celular un poco menor a 1 log.

La menor inactivación para *E. coli* a igual concentración de FS, puede explicarse teniendo en cuenta las diferencias estructurales en la membrana celular que presentan las bacterias Gram negativas y Gram positivas, (Sección 1.2.). Como se describió anteriormente, la membrana externa de las bacterias Gram negativas presenta una barrera de permeabilidad efectiva entre la célula y el medio circundante, que tiende a restringir la unión y la penetración de muchos fotosensibilizadores.

4. 5. Mecanismo de acción fotodinámico *in vitro* de DPC₆₀²⁺

Con el fin de obtener información acerca de la contribuciones de los mecanismos de fotorreacción (Tipo I y Tipo II, Esquema 50) involucrados en la inactivación de *S. aureus* fotosensibilizada por DPC₆₀²⁺, se realizaron una serie de experimentos en diferentes condiciones, tales como una atmósfera de argón, suspensiones celulares en D₂O y la adición del ion de azida, DABCO y D-manitol. En todos los ensayos se empleó una concentración de 0,5 μM de FS y el tiempo de irradiación de los cultivos fue de 15 min. Durante este tiempo de iluminación se produce una reducción de ~3,5 log para el fullereno dicatiónico, lo que permite ver una disminución o un aumento en la inactivación al cambiar las condiciones del experimento.

También se estudió la PDI del fullereno dicatiónico en presencia de NADH y anión yoduro. Se conoce que ambos sustratos tienen la capacidad de actuar como reductores dando electrones, que pueden ser aceptados por el C₆₀.^{189,317} De esta manera, se busca estudiar posibles mecanismos de potenciación de la PDI mediante la generación de radicales por mecanismo Tipo I.



Esquema 50. Mecanismos fotodinámicos de derivados del C₆₀.

4.5.1. PDI en una atmósfera anóxica

Suspensiones celulares de *S. aureus* tratadas con DPC₆₀²⁺ se irradiaron en una atmósfera de argón. Este experimento se utilizó para evaluar la importancia del oxígeno en la inactivación fotodinámica y para determinar la capacidad que posee el fullereno de actuar en condiciones anóxicas. Las suspensiones tratadas con el fotosensibilizador bajo estas condiciones y mantenidas en la oscuridad por 30 min, no vieron afectadas la capacidad de duplicación bacteriana (Figura 20, columna 5), lo que comprueba que el argón no resulta tóxico para este tipo de células. Por otro lado, se observó que la pérdida de viabilidad es altamente dependiente del oxígeno atmosférico, ya que no hubo inactivación apreciable en ausencia del mismo (Figura 20, columna 6).

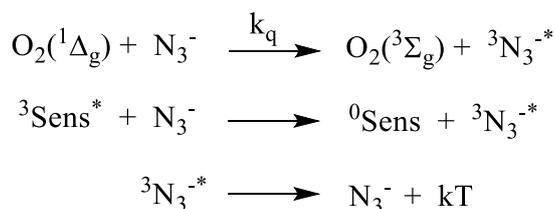
Los resultados muestran que el efecto fotocitotóxico inducido por DPC₆₀²⁺ es insignificante en condiciones anóxicas. La presencia del oxígeno molecular es esencial para la generación de O₂(¹Δ_g) a través del mecanismo de fotosensibilización Tipo II. Este implica una reacción de transferencia de energía desde el fotosensibilizador en su estado triplete al oxígeno en su estado fundamental. Además, el oxígeno juega un papel importante en el mecanismo del Tipo I. En esta reacción fotoquímica, los fotosensibilizadores excitados por la luz reaccionan con un sustrato adecuado a través de una transferencia de electrones o de protones, para producir radicales libres. Estos reaccionan instantáneamente con el oxígeno dando lugar a una mezcla compleja de ROS capaz de oxidar a una gran variedad de biomoléculas. El oxígeno también es necesario para la formación de O₂^{·-} que se produce a partir de la formación del radical anión del fullereno C₆₀ (C₆₀^{·-}). Por lo tanto, este experimento no es determinante para establecer el proceso de fotorreacción involucrado en la inactivación fotodinámica de *S. aureus*.

4.5.2. PDI de suspensiones celulares de D₂O

La fotoinactivación se llevó a cabo en una solución de PBS preparada con D₂O. Este medio aumenta el tiempo de vida del O₂(¹Δ_g) (en D₂O τ₀=68 μs y en H₂O τ₀=4,2 μs),³³² por lo tanto las reacciones que involucren tal especie se potencian en D₂O. Las suspensiones tratadas con el fotosensibilizador en D₂O y mantenidas en la oscuridad durante 30 min no vieron afectada su viabilidad (Figura 20, columna 7). La irradiación de *S. aureus* en D₂O tratada con DPC₆₀²⁺ produjo una reducción en la viabilidad celular mayor en ~1 log a la encontrada en suspensiones celulares de PBS en agua (Figura 20, columna 8). Estos resultados, indican que existe una contribución del mecanismo de fotosensibilización Tipo II a través de O₂(¹Δ_g) en la inactivación de *S. aureus*.

4.5.3. Efecto del ión azida en la PDI

El ión azida es soluble en agua y desactiva al O₂(¹Δ_g) por desactivación física. Sin embargo, también desactiva a otros compuestos en su estado excitado triplete a través de una transferencia de energía (Esquema 51).⁹¹



Esquema 51. Desactivación del O₂(¹Δ_g) y del estado excitado triplete del fotosensibilizador por el ion azida.

Suspensiones celulares de *S. aureus* se trataron con DPC₆₀⁺ (0,5 μM) en presencia de azida (50 mM). El agregado de NaN₃ no resultó tóxico para los cultivos incubados 30 min en la oscuridad (Figura 20, columna 9). Sin embargo, en las suspensiones irradiadas la sobrevivencia celular resultó ser muy dependiente de la presencia de azida sódica, produciendo una importante reducción (~2 log) en la inactivación de la bacteria fotosensibilizada por DPC₆₀²⁺ (Figura 20, columna 10). Por lo tanto, el ión azida desactiva especies fototóxicas, produciendo un importante efecto protector sobre *S. aureus*.

El efecto de la azida se evaluó en iguales condiciones pero en atmósfera de argón. En ausencia de oxígeno se observó una disminución de la supervivencia celular de aproximadamente 2 log (Figura 20, columna 11). Previamente, la adición de azida en

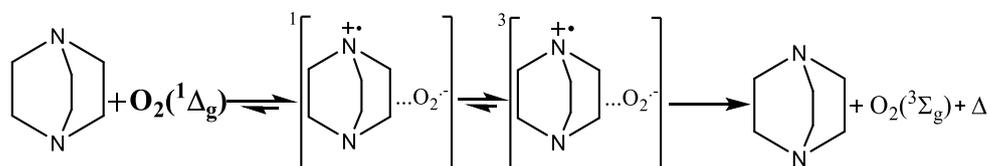
ausencia de oxígeno se utilizó para investigar los mecanismos fotoquímicos en la PDI mediada por un fullereno decatiónico.⁸⁸ También se encontró una disminución similar de la supervivencia celular en condiciones anóxicas. Los investigadores proponen que el fullereno en su estado excitado triplete, puede aceptar un electrón del anión azida, lo que permite formar el anión radical del C₆₀ y radicales azida, como se muestra a continuación:



Los radicales azida altamente reactivos pueden ser los responsables de la PDI observada en condiciones anóxicas. Esta actividad fotodinámica en ausencia de oxígeno y presencia del anión azida también se encontró en el tratamiento de *S. aureus* y *E. coli* mediado por azul de metileno.³³⁷

4.5.4. Efecto del DABCO en la PDI

Suspensiones celulares de *S. aureus* se trataron con 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (50 mM). Este compuesto también desactiva al O₂(¹Δ_g) por desactivación física (Esquema 52).³³⁸ Se utilizó como sustrato complementario para confirmar la presencia del mecanismo de fotorreacción Tipo II.

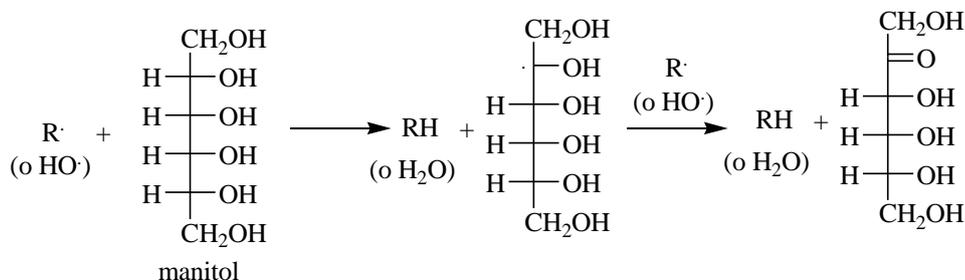


Esquema 52. Desactivación del O₂(¹Δ_g) por el DABCO

El agregado de DABCO no resultó tóxico para los cultivos incubados 30 min en la oscuridad e irradiados (Figura 20, columna 12). Cuando se irradiaron los cultivos celulares en presencia del sustrato y DPC₆₀²⁺ se observó una inhibición casi total de la PDI en presencia de DABCO (Figura 20, columna 13), lo que confirma una contribución importante del mecanismo Tipo II de producción de O₂(¹Δ_g) en la PDI de *S. aureus* por DPC₆₀²⁺.

4.5.5. Efecto del D-manitol en la PDI

Suspensiones celulares de *S. aureus* se trataron con DPC_{60}^{2+} en presencia de D-manitol (50 mM). Este compuesto actúa como un atrapador de radicales (Esquema 53). Por lo tanto, se empleó para verificar la presencia del mecanismo de fotorreacción Tipo I.



Esquema 53. Desactivación de radicales libres por D-manitol.

La adición de D-manitol no resultó tóxica en las células tratadas con DPC_{60}^{2+} en la oscuridad. Además, tampoco se encontró toxicidad para las células irradiadas en presencia de D-manitol y sin fotosensibilizador (Figura 20, columna 14).

Luego de 15 min de iluminación de las células bacterianas incubadas con manitol y DPC_{60}^{2+} se observó un importante efecto fotoprotector (Figura 20, columna 15). Se encontró una reducción de ~1 log en la fotoinactivación de las células en presencia de D-manitol. Esta disminución en la actividad fotodinámica del fotosensibilizador indica que hay un aporte del mecanismo Tipo I.

Analizando los resultados obtenidos podemos concluir que la acción fotodinámica de DPC_{60}^{2+} puede estar mediada por contribuciones de ambos mecanismos (Tipo I y II), en la producción de ROS. Estudios previos con otro fullereno dicatiónico, muestran un comportamiento similar en suspensión celular de *C. albicans* y *E. coli*.¹⁹⁶

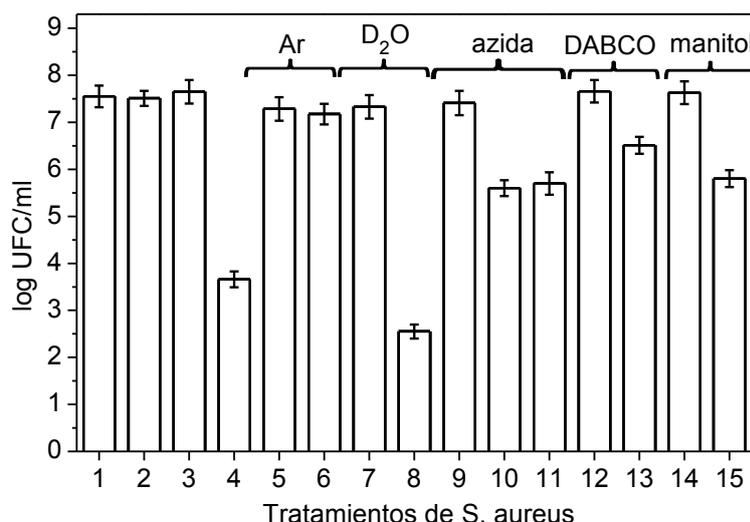


Figura 20. Supervivencia de células de *S. aureus* (0,2 ml, $\sim 10^8$ UFC/ml) incubadas con 0.5 μM DPC_{60}^{2+} en la oscuridad por 30 min a 37 °C e irradiadas con luz visible durante 15 min en policubeta de poliestireno de 96 pocillos: (1) cultivo control en oscuridad; 2) cultivo control irradiado; 3) cultivo control tratado con DPC_{60}^{2+} y mantenido en oscuridad; 4) cultivo tratado con DPC_{60}^{2+} e irradiado; 5) cultivo control en atmósfera de argón e irradiado; 6) cultivo tratado con DPC_{60}^{2+} en atmósfera de argón e irradiado; 7) cultivo control en D_2O e irradiado 8) cultivo tratado con DPC_{60}^{2+} en D_2O e irradiado 9) cultivo control con 50 mM de azida e irradiado; 10) cultivo tratado con DPC_{60}^{2+} , 50 mM azida e irradiado; 11) cultivo tratado con DPC_{60}^{2+} , 50 mM azida en atmósfera de argón e irradiado; 12) cultivo control con 50 mM de DABCO e irradiado; 13) cultivo tratado con DPC_{60}^{2+} , 50 mM de DABCO e irradiado; 14) cultivo control con 50 mM de D-manitol e irradiado; 15) cultivo tratado con DPC_{60}^{2+} , 50 mM de D-manitol e irradiado.

4.5.6. Efecto del NADH en la PDI

Con el objetivo de realizar más estudios sobre el mecanismo de acción de DPC_{60}^{2+} e investigar alternativas posibles de potenciación de la PDI, se evaluó la actividad fotodinámica de DPC_{60}^{2+} en *S. aureus* en presencia de NADH (Figura 21). Se conoce que este sustrato de origen biológico puede actuar como dador de electrones para generar $\text{O}_2^{\cdot-}$,¹⁸⁹ pero también como sustrato fotooxidable a partir de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ o desactivante del mismo.³³⁹ Previamente se observó que en medio homogéneo DMF, la presencia de NADH permite la fotooxidación de NBT a través del anión radical superóxido por el mecanismo Tipo I.³⁴⁰ Sin embargo en medio biológico, el comportamiento puede variar.

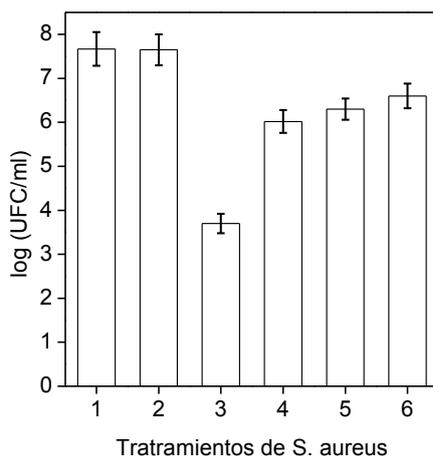
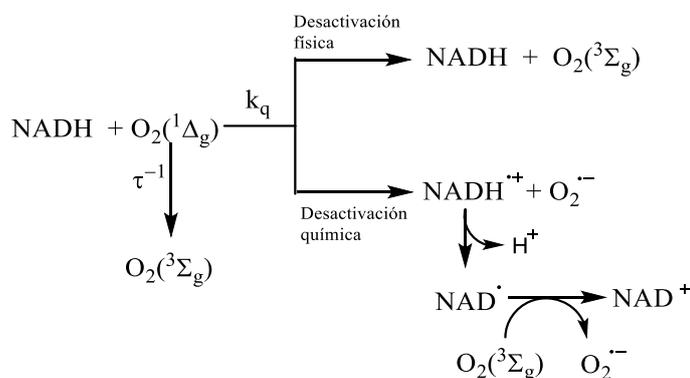


Figura 21. Supervivencia de células de *S.aureus* (0.2 ml, $\sim 10^8$ CFU/ml) incubadas con $0,5 \mu\text{M}$ de DPC_{60}^{2+} en oscuridad por 30 min a 37°C y expuesta a luz visible por 15 min; 1) cultivo control en oscuridad; 2) cultivo conteniendo 50 mM de NADH e irradiado con luz visible por 15 min; 3) cultivo tratado con DPC_{60}^{2+} e irradiado; 3) cultivo tratado con DPC_{60}^{2+} conteniendo 10 mM de NADH e irradiado; 4) cultivo tratado con DPC_{60}^{2+} conteniendo 25 mM de NADH e irradiado; 5) cultivo tratado con DPC_{60}^{2+} conteniendo 50 mM de NADH e irradiado.

Suspensiones celulares de *S. aureus* se trataron con DPC_{60}^{2+} en presencia de NADH a diferentes concentraciones (10, 25 y 50 mM). Luego de 15 min de irradiación, se observó claramente una relevante inhibición de la PDI en presencia de NADH a las tres concentraciones evaluadas (Figura 21).

Este comportamiento estaría indicando que el NADH desactiva al $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, responsable principal del daño celular, y no actúa de una manera preponderante como dador de electrones para generar ROS a partir del mecanismo Tipo I. Estudios previos demostraron que NADH desactiva tanto química como físicamente al $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, como se muestra en el esquema 54.³⁴¹



Esquema 54. Procesos de desactivación química y física de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ en presencia de NADH.

Considerando los resultados obtenidos, podemos inferir que $O_2(^1\Delta_g)$ es desactivado preponderantemente por el mecanismo físico. Ya que, si existiese una relevante contribución de la desactivación química, con la correspondiente generación de $O_2^{\cdot-}$ como producto, debería observarse actividad fotodinámica, por el contrario se observa una inhibición casi total de la PDI en presencia de NADH. Estudios fotodinámicos previos con dos fullerenos de distinta solubilidad en medios biológicos, demostraron este comportamiento dual del NADH, dependiendo del mecanismo principal de acción del fotosensibilizador.^{342,343} Cuando el mecanismo principal es el Tipo I, NADH puede actuar como un eficiente dador de electrones, en cambio cuando el Tipo II es el preponderante, el sustrato puede desactivar el $O_2(^1\Delta_g)$. Este último comportamiento es el observado para DPC_{60}^{2+} .

4.5.7. Efecto del I^- en la PDI

Suspensiones celulares de *S. aureus* se trataron con DPC_{60}^{2+} en presencia de ioduro de potasio a diferentes concentraciones (10, 25 y 50 mM) (Figura 22, columnas 5,6 y 7). Cuando se añadió la sal, se observó una relevante potenciación de la PDI directamente proporcional a la concentración adicionada. Con una concentración de 50 mM de ioduro, se generó una potenciación de la inactivación mayor a 3 log. Además se realizaron los ensayos controles de DPC_{60}^{2+} con KI en la oscuridad, y la irradiación de los cultivos bacterianos en presencia sólo de I^- . Ambos controles no mostraron inactivación, lo que indica que el incremento en la PDI es posible debido a la fotosensibilización del FS en presencia de KI.

Este resultado es de gran interés, ya que se trata de una simple adición en los cultivos bacterianos de una sal no tóxica, como KI, que permite potenciar eficientemente la PDI del fullereno catiónico en *S. aureus*.

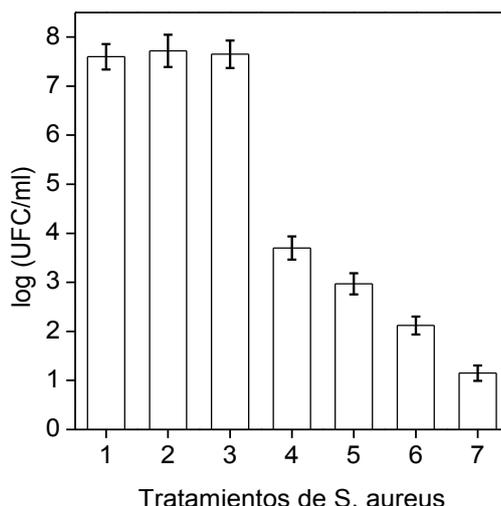


Figura 22. Supervivencia de células de *S.aureus* (0,2 ml, $\sim 10^8$ CFU/ml) incubadas con $0.5 \mu\text{M}$ de DPC_{60}^{2+} en oscuridad por 30 min a 37°C y expuesta a luz visible por 15 min; 1) cultivo control en oscuridad; 2) cultivo control en oscuridad conteniendo KI; 3) cultivo control en oscuridad conteniendo DPC_{60}^{2+} 4) cultivo tratado con DPC_{60}^{2+} e irradiado 5) cultivo tratado con DPC_{60}^{2+} conteniendo 10 mM de KI e irradiado; 6) cultivo tratado con DPC_{60}^{2+} conteniendo 25 mM de KI e irradiado; 7) cultivo tratado con DPC_{60}^{2+} conteniendo 50 mM de KI e irradiado.

En la tabla 4, se muestra la potenciación de PDI para cada concentración de Γ , y la correspondiente contribución a la inactivación total de *S. aureus* para DPC_{60}^{2+} .

Tabla 4. Inactivación de *S. aureus* tratada con $0,5 \mu\text{M}$ de DPC_{60}^{2+} en presencia de diferentes concentraciones de KI.

[Γ]	Potenciación PDI	PDI total	% PDI total
0	0	$\sim 3,0$ log	99,9%
10 mM	$\sim 1,3$ log	$\sim 4,3$ log	99,99%
25 mM	$\sim 2,1$ log	$\sim 5,1$ log	99,999%
50 mM	$\sim 3,4$ log	$\sim 6,4$ log	99,9999%

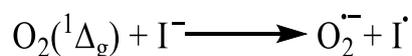
Puede observarse un incremento relevante en la PDI cuando se aumenta la concentración de KI en el medio. En estudios previos también se obtuvieron comportamientos similares para la PDI medfada por fullerenos en presencia de Γ . Recientemente, Hamblin *et al* han logrado demostrar esta potenciación tanto *in vitro* como *in vivo* en infecciones localizadas en ratones.¹⁹⁹ El estudio del mecanismo de acción que

hace posible esta potenciación no se comprende aún de forma completa. Hay varias vías mecanísticas posibles de generación de especies reactivas generadoras del daño celular.³⁴⁴

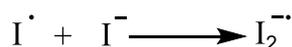
Por un lado, el anión ioduro podría sufrir una oxidación mediante la transferencia de un electrón al fullereno fotoexcitado ($^1C_{60}^*$ o $^3C_{60}^*$) para formar radicales ioduro (I^\cdot) y aniones radicales fullerenos $C_{60}^{\cdot-}$, y subsiguientes especies radicales que pueden actuar como bactericidas. Así, los aniones ioduros podrían actuar como una fuente de electrones para potenciar el mecanismo Tipo I de transferencia de electrones desde $C_{60}^{\cdot-}$ hacia el oxígeno para generar $O_2^{\cdot-}$, que puede terminar en ROS de gran carácter bactericida, como HO^\cdot y H_2O_2 .^{317,345}

Por otro lado, el anión ioduro podría ser oxidado tanto por el mecanismo Tipo I, como por el Tipo II en reacción con $O_2(^1\Delta_g)$ para producir $O_2^{\cdot-}$, OH^\cdot y H_2O_2 secuencialmente³⁴⁶ y también especies bactericidas como iodo molecular (I_2), o anión triioduro I_3^- por recombinación de $2I^\cdot$ y I^\cdot .

Considerando los resultados obtenidos previamente en presencia de NADH, los cuales mostraron que DPC_{60}^{2+} presenta una mayor contribución del mecanismo Tipo II en la PDI, es esperable que en este caso, esté ocurriendo la oxidación del I^- por parte del $O_2(^1\Delta_g)$, obteniendo las especies reactivas que se muestran a continuación:



Debido a que I^\cdot presenta una gran inestabilidad, es posible que reaccione con ioduro:



Tanto $O_2^{\cdot-}$, que puede generar el HO^\cdot altamente reactivo, y $I_2^{\cdot-}$ podrían ser las especies reactivas que generan el considerable incremento de la PDI observado. A diferencia del NADH, el I^- desactiva al $O_2(^1\Delta_g)$ mediante transferencia de electrones pero en paralelo, genera radicales de iodo altamente reactivos que permiten potenciar el efecto fotodinámico.

En estos mecanismos propuestos, la adición de un gran número de aniones ioduro dador de electrones, debería inducir el aumento de la generación de radicales cuando se irradia el fotosensibilizador. Esto es consistente con los aumentos de citotoxicidad que se observaron para DPC_{60}^{2+} con el incremento de la concentración de I^- .

Por otro lado, cabe señalar que el KI se añade a una solución de PBS donde se encuentran las bacterias y el fullereno. Este PBS contiene cloruro de sodio en una alta

concentración en comparación con el KI agregado. Sin embargo, se observa sólo actividad para el yoduro, lo que estaría indicando que los potenciales redox relativos son importantes para la PDI ($I^- = -0,54$ V; $Cl^- = -1,36$ V). Otro aspecto posiblemente relevante de esta interacción entre yoduro y fullereno es la capacidad del I^- para desactivar la fluorescencia de varios colorantes y promover entrecruzamiento de sistemas.³⁴⁷ Este efecto no es significativo en nuestra experiencia, ya que el C_{60} presenta por sí solo un alto rendimiento de entrecruzamiento de sistemas.

Esta potenciación de la PDI mediada por el fullereno dicatiónico resulta interesante por la baja toxicidad que presenta el yoduro derivado de la sal inorgánica KI.³⁴⁸ Este es un elemento esencial en la nutrición humana, se ha utilizado de forma rutinaria en su forma radiactiva para tratar el cáncer de tiroides, y se recomienda como profiláctico para evitar la incorporación en las tiroides del radioyodo en caso de un desastre nuclear.³⁴⁹ Además el KI se encuentra presente en la solución de Lugol utilizada como antiséptico y desinfectante, siendo sus efectos secundarios conocidos y reportados.^{350,351}

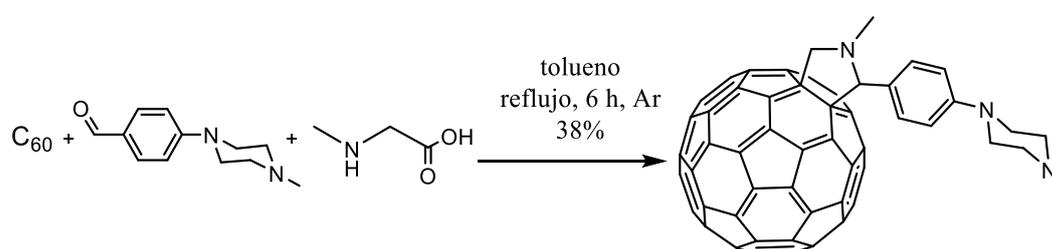
4.6. Diseño de un nuevo derivado del fullereno C_{60}

Hasta el momento se sintetizó un derivado de fullereno C_{60} con dos grupos catiónicos, DPC_{60}^{2+} . Este fotosensibilizador resultó eficiente para inactivar la bacteria Gram positiva *S. aureus* un 99,998%, luego de 30 min de irradiación y con una concentración del fotosensibilizador de 0,5 μ M. Sin embargo, no fue capaz de inactivar a la bacteria Gram negativa *E. coli* a bajas concentraciones. Este tipo de microbio, son el objetivo más desafiante para cualquier tipo de tratamiento antimicrobiano. En general, los estudios *in vitro* con microorganismos, indican que las bacterias Gram positivas son susceptibles al efecto producido por una gran variedad de fotosensibilizadores inclusive por aquellos que son neutros o aniónicos, mientras que las Gram negativas son resistentes a una amplia variedad de moléculas.¹³⁰

Con el objetivo de sintetizar un nuevo compuesto que fuera capaz de inactivar a *E. coli*, se diseñó un fullereno C_{60} que posee tres grupos de aminas terciarias, denominado MMC_{60} . Estos grupos susceptibles a la metilación se utilizaron para obtener el fotosensibilizador tricatiónico DMC_{60}^{3+} .

4.7. Síntesis de derivados del fullereno C₆₀ (MMC₆₀ y DMC₆₀³⁺)

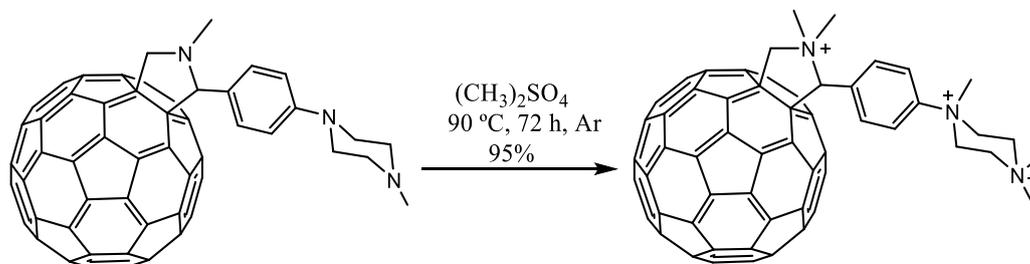
La vía sintética utilizada y los métodos de purificación fueron similares a los empleados previamente. Inicialmente se generó el derivado del C₆₀ sin cargas (MMC₆₀), mediante la cicloadición 1,3-dipolar. La reacción se llevó a cabo en tolueno anhídrido, a partir de 4-(4-metilpiperazino) benzaldehído, *N*-metilglicina y fullereno C₆₀ (Esquema 55). La mezcla de reacción se agitó a reflujo 6 h en atmósfera de Ar. Los productos se purificaron por cromatografía en columna *flash* con sílica gel. Primeramente se utilizó tolueno como eluyente, con el fin de extraer el C₆₀ que quedó sin reaccionar, y luego, para extraer el producto MMC₆₀, una mezcla levemente básica de tolueno/ acetato de etilo/ TEA. Este procedimiento permitió obtener MMC₆₀ con un rendimiento del 38%.



Esquema 55. Síntesis de MMC₆₀.

Para obtener el derivado tricatiónico (DMC₆₀³⁺), se realizó una metilación exhaustiva del MMC₆₀ con sulfato de dimetilo como agente metilante. El mismo, a diferencia de la síntesis anterior, se utilizó como solvente y reactivo. La reacción se llevó a cabo durante 72 h, en agitación y atmósfera de argón a 90°C, como se muestra en el esquema a continuación.

Luego, el producto se precipitó por el agregado de éter etílico y lavado con una solución de Na₂CO₃ para neutralizar restos ácidos. Después de un último lavado con agua, se obtuvo el DMC₆₀³⁺ con un 95% de rendimiento.



Esquema 56. Síntesis de DMC₆₀³⁺.

Mediante cálculo semiempíricos de orbitales moleculares (AM1) empleando el software HyperChem se obtuvo un valor de polaridad para el derivado tricatiónico de 88,1 D, siendo mayor al correspondiente para DPC_{60}^{2+} (66,1 D). El nuevo derivado sintetizado, DMC_{60}^{3+} , está formado por una esfera de carbono hidrofóbica, que contiene tres grupos catiónicos que proporcionan un mayor momento dipolar y un carácter anfifílico que lo hace compatible con el medio biológico y le permite una eficaz interacción con las membranas celulares. Además, las cargas positivas permiten aumentar la unión y/o penetración del fotosensibilizador en las células bacterias para generar mayor daño celular.

4.8. Estudios espectroscópicos

4.8.1. Espectroscopía de absorción UV-visible

Los espectros de absorción de los compuestos MMC_{60} y DMC_{60}^{3+} se tomaron en tolueno, DMF y en un sistema micelar inverso formado por tolueno/AOT(0,1M) /agua ($W_0=10$) (Figura 23). Las características espectroscópicas de absorción son similares a las de los derivados del C_{60} estudiados previamente (Tabla 5).

El derivado sin carga MMC_{60} , presenta un buen grado de monomerización en los dos solventes homogéneos de distinta polaridad, y un comportamiento similar en el medio micelar (Figura 23A). Esto evidencia que en el medio microheterogéneo, el fullereno se localiza principalmente en el solvente externo e interactúa débilmente con la interfaz micelar.

En el caso del derivado tricatiónico se observó un comportamiento similar a DPC_{60}^{2+} , presentando una buena solubilización como monómero en DMF, pero un menor grado de monomerización con respecto al derivado sin carga (Figura 23B). En tolueno se observa una disminución de la intensidad de absorción, y ensanchamiento de la banda a 430 nm, evidenciando una mayor agregación en el solvente de menor polaridad.

Sin embargo, en el medio micelar biomimético se observa un aumento de la intensidad indicando mayor monomerización en dicho medio, mediante una eficiente interacción del fullereno tricatiónico con las micelas de AOT

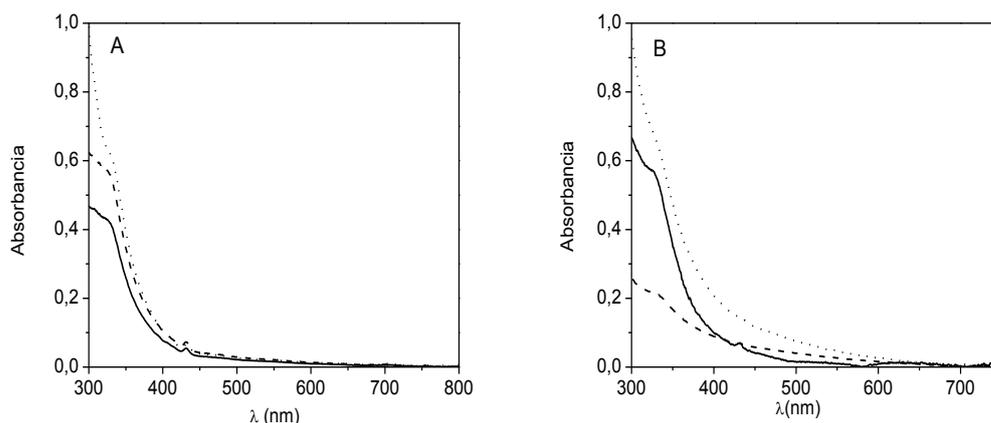


Figura 23. Espectros de absorción UV-visible de A) MMC_{60} y B) DMC_{60}^{3+} en DMF (línea continua), tolueno (línea discontinua) y tolueno/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$) (línea de puntos).

4.8.2. Espectroscopía de fluorescencia

Los espectros de emisión de fluorescencia de MMC_{60} y DMC_{60}^{3+} en DMF se presentan en la Figura 24. Ambos derivados presentan una banda centrada alrededor de 720 nm (Tabla 5). Al igual que los derivados MPC_{60} y DPC_{60}^{2+} , se observa un pequeño corrimiento de Stokes (~ 10 nm), lo que indica que la energía de absorción espectroscópica es casi idéntica a la energía de relajación del estado singlete.

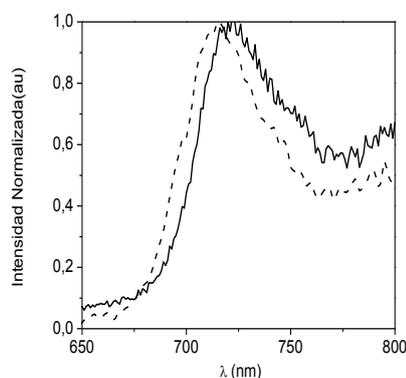


Figura 24. Espectros de emisión de fluorescencia de los fullerenos MMC_{60} (línea continua) y DMC_{60}^{3+} (línea discontinua) en DMF, $\lambda_{\text{exc}}=450$ nm.

Utilizando el fullereno C_{60} como referencia, se obtuvieron los valores de los Φ_F para MMC_{60} y DMC_{60}^{3+} (Tabla 5), mostrando nuevamente bajos de rendimientos cuánticos de fluorescencia ($\Phi_F \sim 10^{-4}$), concordantes con las propiedades fotofísicas del fullereno.

Tabla 5. Características espectroscópicas y rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) de MMC₆₀ y DMC₆₀³⁺ en DMF.

Parámetros	C ₆₀	MMC ₆₀	DMC ₆₀ ³⁺
$\lambda_{\max}^{\text{Abs}}$ (nm)	405/700	431/706	431/705
ε (M ⁻¹ cm ⁻¹)	3400 ^a	4100 ^b	4000 ^b
$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	712	719	720
Φ_F	(2,3±0,2)x10 ⁻⁴	(4,4±0,1)x10 ⁻⁴	(2,6±0,2)x10 ⁻⁴

^a $\lambda^{\text{Abs}} = 405$ nm, ^b $\lambda^{\text{Abs}} = 431$

4.9. Actividad fotodinámica

4.9.1. Producción de O₂(¹Δ_g)

En este caso, la descomposición DPBF fotosensibilizada por MMC₆₀ y DMC₆₀³⁺ se estudió en DMF. Nuevamente, la fotodescomposición se analizó siguiendo la disminución de la banda de absorción del DPBF a 415 nm (Figura 25A).

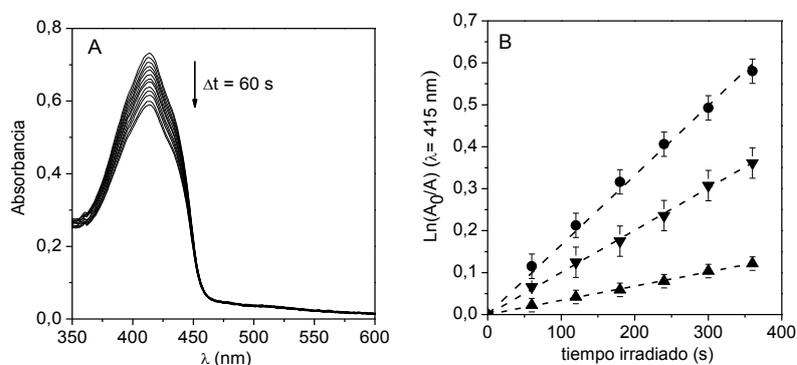


Figura 25. A) Descomposición de DPBF (20 μM) sensibilizada por DMC₆₀³⁺ (10 μM) en DMF, irradiado con luz monocromática ($\lambda=470$ nm), Δt : 60 segundos. B) Gráfico de primer orden para la fotooxidación de DPBF (20 μM) fotosensibilizada por C₆₀ (■), MMC₆₀ (●) y DMC₆₀³⁺ (▲) en DMF.

La Figura 25B muestra los gráficos semilogarítmicos que describen el progreso de la reacción de descomposición de DPBF sensibilizada por los derivados del fullereno C₆₀. A partir de las pendientes de estos gráficos se obtuvieron las constantes de velocidad observadas (Tabla 6, $k_{\text{obs}}^{\text{DPBF}}$). Los valores de Φ_{Δ} se calcularon comparando las pendientes

de los derivados de *N*-metilpirrolidinofullerenos con la correspondiente a la referencia, C₆₀.¹⁸⁸ Los valores obtenidos para MMC₆₀ y DMC₆₀³⁺ son 0,61 y 0,20 respectivamente, lo que demuestra que ambos compuestos fotodescomponen eficientemente el sustrato.

En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos en la experiencia de fotólisis con las que se midió la producción de O₂(¹Δ_g). En concordancia con lo obtenido para DPC₆₀²⁺ y MPC₆₀, el derivado del C₆₀ neutro (MMC₆₀) resultó ser el generador de O₂(¹Δ_g) más eficiente, mientras que el derivado tricatónico también generó, pero en menor medida debido a la mayor formación de agregados.

Tabla 6. Parámetros cinéticos (k_{obs}) y rendimientos cuánticos (Φ_{Δ}) de producción de O₂(¹Δ_g) de los derivados MMC₆₀ y DMC₆₀³⁺ en DMF.

Parámetros	C ₆₀	MMC ₆₀	DMC ₆₀ ³⁺
k_{obs}^{DPBF} (s ⁻¹)	(1,66±0,02)x 10 ⁻³	(1,01±0,01)x 10 ⁻³	(0,34±0,03)x 10 ⁻³
Φ_{Δ}	1	0,61±0,02	0,20±0,01
k_{obs}^{Trp} (s ⁻¹)	-	(9,24±0,04) x10 ⁻⁵	(4,26±0,06) x10 ⁻⁵

4.9.2. Determinación de O₂^{•-}

El compuesto NBT se utilizó para determinar la producción O₂^{•-} en presencia de NADH. Los fotosensibilizadores MMC₆₀ y DMC₆₀³⁺ se irradiaron con luz visible en DMF en condiciones aeróbicas en presencia de NBT y el agente reductor β-NADH. Se observa que ambos fotosensibilizadores producen O₂^{•-}, siendo mayor la producción del derivado no cargado MMC₆₀ (Figura 26). Estos resultados nos indican que existe un aporte significativo del mecanismo Tipo I a la acción fotodinámica de ambos fotosensibilizadores en el medio homogéneo DMF en presencia de NADH. Esto coincide con lo obtenido previamente para MPC₆₀ y DPC₆₀²⁺.

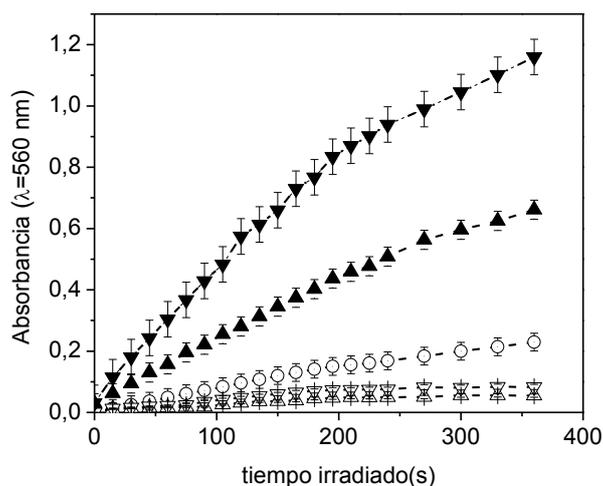


Figura 26. Detección de $O_2^{\cdot-}$ mediante la reacción con NBT (2 mM) a diferentes tiempos de irradiación con luz visible. NBT + NADH (o); NBT + MMC_{60} (∇); NBT + DPC_{60}^{2+} (\square); NBT + DMC_{60}^{3+} (Δ); NBT + NADH+ MMC_{60} (\blacktriangledown); NBT + NADH+ DMC_{60}^{3+} (\blacktriangle) en DMF. [NADH]=0,5 mM. [FS]=10 μ M.

4.9.3. Fotooxidación de L-triptófano

El efecto fotodinámico también se analizó a partir de la oxidación fotodinámica del aminoácido Trp en DMF, siguiendo la disminución de la emisión de fluorescencia a ~340 nm. La descomposición sigue una cinética de pseudo primer orden con respecto a la concentración de Trp, como se muestra en la Figura 27, para [Trp]=20 μ M. A partir de estos gráficos, se calcularon los valores de k_{obs}^{Trp} para la descomposición de Trp sensibilizada por los fullerenos.

Ambos fotosensibilizadores fotodescomponen eficientemente el Trp. Los valores de k_{obs} que se obtuvieron se muestran en la Tabla 6. El menor valor obtenido para el fullereno tricatiónico es coherente con los resultados obtenidos anteriormente en la formación de $O_2(^1\Delta_g)$ y $O_2^{\cdot-}$. Sin embargo, la actividad fotodinámica de los fullerenos puede cambiar dependiendo del medio en que se encuentre disuelto.

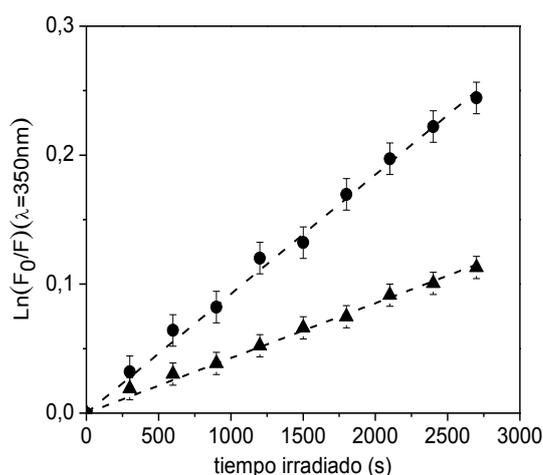


Figura 27. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de Trp (20 µM) sensibilizada por MPC₆₀ (●) y DMC₆₀³⁺ (▲) en DMF.

4.10. Inactivación fotodinámica *in vitro* de bacterias

La inactivación fotodinámica para los nuevos fullerenos sintetizados, MMC₆₀ y DMC₆₀³⁺, se evaluó en *S. aureus* y *E. coli* a dos densidades celulares (10⁶ UFC/ml y 10⁸ UFC/ml). Las bacterias en PBS se trataron con el fotosensibilizador durante 30 min a 37 °C en la oscuridad y luego los cultivos se irradiaron con luz visible. Se utilizaron concentraciones de fullereno de 0,5 µM y 1 µM para *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente.

Primeramente se evaluó la capacidad fotoinactivante de MMC₆₀ y DMC₆₀³⁺ en la bacteria Gram positiva, *S. aureus*. La Figura 28 muestra las curvas de supervivencia de las células bacterianas después de diferentes tiempos de irradiación (5, 15 y 30 min). Los experimentos de control mostraron que la viabilidad de *S. aureus* no se vio afectada por la iluminación en ausencia de fotosensibilizador, ni tampoco por incubación en la oscuridad con 0,5 µM de cada fotosensibilizador, lo que indica que la mortalidad celular resultante después de la irradiación de los cultivos tratados con los fullerenos, es debido al efecto de fotosensibilización del agente producido por la luz visible.

Para ambas densidades celulares, la viabilidad de las células de *S. aureus* después de la irradiación es dependiente tanto del derivado del fullereno utilizado en el tratamiento como también del nivel de exposición a la luz. El derivado sin carga MMC₆₀ mostró escasa eficiencia, produciendo sólo una PDI de ~1,3 log, cuando se partió de una densidad celular de 10⁸ UFC/ml. Este resultado difiere con lo obtenido para MPC₆₀, en dónde una inactivación apreciable se observó a ambas densidades celulares cuando se irradió hasta 30

min. Esto puede deberse, al grupo amino básico terminal que presenta MPC₆₀, el cual presenta mayor movilidad y facilidad para protonarse a pH fisiológico, y así adquirir una carga positiva aumentando la interacción con las células bacterianas.^{352,353}

Por otro lado, los resultados obtenidos para el derivado catiónico DMC₆₀³⁺, indican una eficiencia mucho mayor al fullereno neutro, mostrando una PDI de 5,3 log (99,9994 %) y 4,90 log (99,9987 %) para 10⁶ UFC/ml y ~10⁸ UFC/ml, respectivamente.

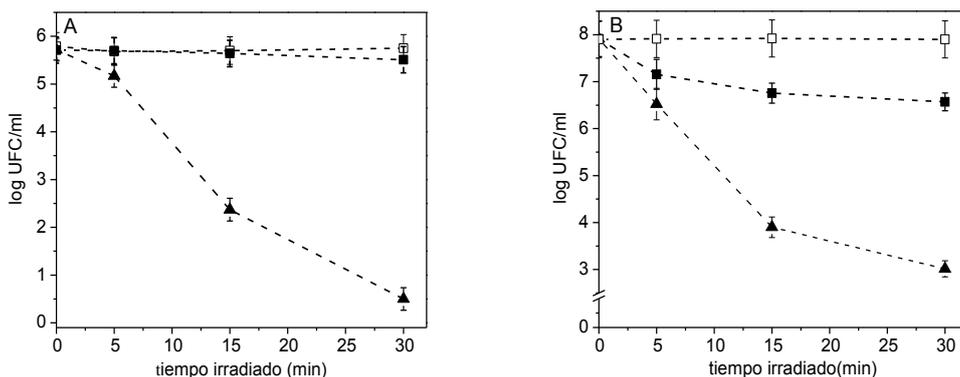


Figura 28. Curvas de inactivación de suspensiones celulares *S. aureus* a partir de ~10⁶ UFC/ml (A) y ~10⁸ UFC/ml (B), tratada con 0,5 μM de MMC₆₀ (■) y DMC₆₀³⁺ (▲) e irradiadas con luz visible. Cultivo de control sin tratar irradiado (□).

Una vez evaluada la eficacia de los nuevos fotosensibilizadores en la bacteria Gram positiva, se procedió a estudiar la PDI en *E. coli*, bacteria Gram negativa, que resulta más resistente a la acción fotodinámica, debido a sus diferencias estructurales en la membrana externa.

Suspensiones de células de *E. coli* (~10⁶ UFC/ml y ~10⁸ UFC/ml) en PBS se trataron con 1 μM de fotosensibilizador durante 30 min a 37 °C en la oscuridad y luego los cultivos se irradiaron con luz visible. Las Figura 29 muestra las curvas de supervivencia de las células bacterianas después de diferentes tiempos de irradiación (5, 15 y 30 min). Los experimentos de control mostraron que la viabilidad de *E. coli* no es afectada por la iluminación en ausencia de fotosensibilizador, ni tampoco por incubación en la oscuridad con 1 μM de cada fotosensibilizador, lo que indica que la mortalidad celular resultante después de la irradiación de los cultivos tratados con los fullerenos, es debido al efecto de fotosensibilización del agente producido por la luz visible.

Analizando los resultados obtenidos, puede verse nuevamente, que el fullereno sin carga MMC₆₀, no genera inactivación apreciable en ambas densidades celular. Sin embargo, cuando se evalúa el DMC₆₀³⁺ se observa que genera una PDI significativa. Cuando se partió de 10⁶ UFC/ml, se generó una disminución en la supervivencia celular de ~3 log a los 30 min de irradiación, lo que significa un 99,9 % de inactivación bacteriana (Figura 29A). Cuando se utilizó una densidad celular de 10⁸ CFU/ml se observa una PDI de 3,6 log, que representa un 99,97 % de inactivación (Figura 29B).

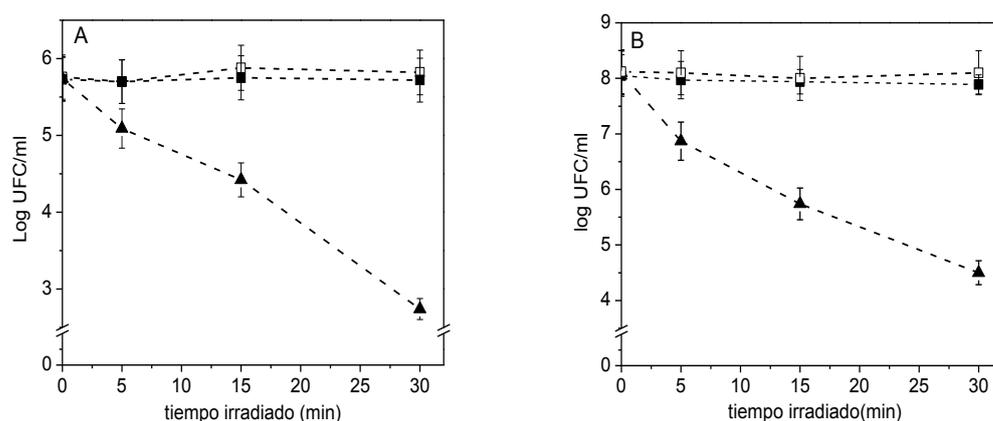


Figura 29. Curvas de inactivación de *E. coli* a partir de ~10⁶ UFC/ml (A) y ~10⁸ UFC/ml (B), tratadas con 1 μM de MMC₆₀ (■) y DMC₆₀³⁺ (▲) e irradiadas con luz visible. Cultivo de control sin tratar irradiado (□).

Los resultados obtenidos para la PDI de *E. coli* demuestra que la incorporación de otro grupo catiónico a la estructura del fotosensibilizador, aumenta eficiencia fotodinámica para inactivar la bacteria Gram negativa. Como se describió previamente, el aumento de la carga positiva intramolecular del derivado del fullereno, permite incrementar la interacción electrostática del FS con los residuos aniónicos constituyentes de la pared celular, permitiendo un mayor daño celular.³⁵⁴ Además, el incremento de cargas catiónicas en el FS permite aumentar la selectividad del agente fototerapéutico aumentando la unión con células microbianas.³⁵⁵

También resulta importante resaltar la capacidad de DMC₆₀³⁺ para inactivar ambos tipos de bacterias (Gram positiva y Gram negativa), a bajas concentraciones y cortos tiempos de irradiación. Ya que, como se dijo anteriormente, es necesario que los fotosensibilizadores estudiados para PDI, presenten la capacidad de inactivar fotodinámicamente un amplio espectro de microorganismos patógenos.

La eficacia DMC_{60}^{3+} puede compararse directamente con otros compuestos pertenecientes a grupos de fotosensibilizadores más convencionales, para condiciones de irradiación similares utilizando el mismo cultivo de *E. coli*. Por ejemplo, cuando cultivos de *E. coli* se trataron con 1 μM de una *cis* porfirina dicatiónica, yoduro de 5,10-bis(4-metilfenil)-15,20-bis(*N,N,N*-trimetilamoniofenil)porfirina, se encontró un 70% de inactivación celular después de 5 min de irradiación con luz visible, mientras que en condiciones comparables, DMC_{60}^{3+} inactiva 78% de las células bacterianas. Cuando los cultivos de *E. coli* se incubaron con 5 μM de *cis*-porfirina dicatiónica y se irradió durante 30 min, el efecto PDI produce una disminución de 3,2 log de la supervivencia celular. Este valor es comparable con la obtenida usando 1 μM para DMC_{60}^{3+} . Por otro lado, cuando se comparan con porfirinas con tres y cuatro grupos catiónicos, se observa un pequeño aumento de la PDI con respecto a DMC_{60}^{3+} .³⁵⁶ También puede compararse con derivados de ftalocianinas catiónicos. Por ejemplo, 1 μM de fullereno tricatiónico es más eficaz que 10 μM de una sal catiónica de Zn(II) tetrametiltetrapiridinoporfirazina, que produce disminución de 2 log de la supervivencia celular de *E. coli* después de 30 min de irradiación.³⁵⁷

En estudios previos se evaluaron distintos fullerenos multicatiónicos, resultando altamente efectivos para inactivar *E. coli*.^{156,181} En particular un C_{60} trisustituido con tres grupos pirrolidina cuaternarios, mostró una gran eficiencia en bacterias (99,99%). Además, éste fotosensibilizador fue evaluado *in vivo* en ratones, mostrando también capacidad para inactivar infecciones localizadas.¹⁵⁵ Por otro lado, el fullereno dicatiónico DTC_{60}^{2+} (Esquema 17), se evaluó como FS en *E. coli*, mostrando una PDI de 3,5 log pero a una densidad celular de 10^6 UFC/ml.¹⁵⁸

Una vez estudiada la PDI *in vitro* de los derivados del C_{60} sintetizados, y comprobada la mayor eficiencia antibacteriana de los fullerenos catiónicos, se procedió al estudio de los mecanismos de acción que generan el daño celular en ambas bacterias.

4.11. Mecanismo de acción fotodinámico *in vitro* de DMC_{60}^{3+}

Con el objetivo de estudiar las vías mecanísticas de la inactivación fotodinámica de *S. aureus* y *E. coli* fotosensibilizada por DMC_{60}^{3+} , se llevó a cabo la serie de experimentos descrita previamente para DPC_{60}^{2+} . La misma consistió en estudios de inactivación fotodinámica en presencia de atmósfera de argón, D_2O , azida, DABCO y D-manitol. También se evaluó la acción fotodinámica en presencia de KI. Todos los controles

correspondientes a los cultivos en presencia de cada uno de los sustratos sin el fotosensibilizador e irradiados, se realizaron y no se observó en ningún caso fototoxicidad como para DPC_{60}^{2+} .

Primeramente se realizó el estudio mecanístico en la bacteria *S. aureus* usando 10^8 UFC/ml. En todos los ensayos se empleó una concentración de $0,5 \mu\text{M}$ y el tiempo de irradiación de los cultivos de 15 min. Durante este tiempo de iluminación se produce una reducción de ~ 4 log, lo que permite observar una disminución o un aumento en la inactivación al cambiar las condiciones del experimento (Figura 30, columna 3).

Al igual que para el fullereno dicatiónico, no se observó una apreciable PDI en atmósfera de argón (Figura 30, columna 4), indicando que un ambiente aeróbico es necesario para generar la acción fotodinámica a través de la producción de ROS. Posteriormente se evaluó la acción fotodinámica en presencia D_2O , observándose una potenciación del efecto fotodinámico de $\sim 1,5$ log, indicando una contribución del mecanismo tipo II de producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ en la PDI (Figura 30, columna 5).

La inactivación también se evaluó en presencia del ion azida, mostrando una disminución del efecto fotodinámico de aproximadamente 2,4 log (Figura 30, columna 6). El mismo ensayo se realizó en atmósfera de argón observándose una disminución de la viabilidad celular de 1,5 log (Figura 30, columna 7), similar a lo encontrado anteriormente para DPC_{60}^{2+} .

La presencia de DABCO generó una relevante inhibición de la PDI, cercana a 3,3 log (Figura 10, columna 8), evidenciando una importante contribución del mecanismo tipo II en la acción fotodinámica de *S. aureus*. Sin embargo, cuando se evaluó la acción fotodinámica en presencia de D-manitol se observó una disminución de la acción fotodinámica de aproximadamente 3,7 log (Figura 30, columna 9). Esto último demuestra que también hay una significativa contribución del mecanismo tipo I en la PDI de *S. aureus* mediada por DMC_{60}^{3+} .

Por último se evaluó la PDI en presencia de KI a una concentración de 50 mM (Figura 20, columna 10), encontrando nuevamente una potenciación de la muerte celular, aumentando la PDI en 2,7 log.

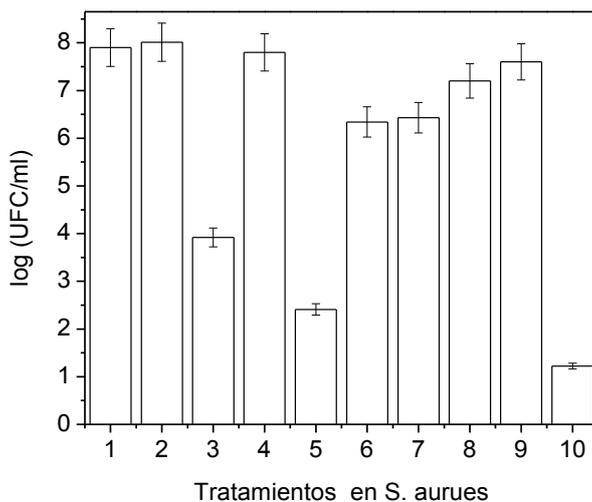


Figura 30. Supervivencia de células de *S. aureus* (0,2 ml, $\sim 10^8$ UFC/ml) incubadas con 0,5 μM DMC_{60}^{3+} en la oscuridad por 30 min a 37 °C e irradiadas con luz visible durante 15 min en policubeta de poliestireno de 96 pocillos: (1) cultivo control en oscuridad; 2) cultivo control irradiado; 3) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} e irradiado; 4) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} en atmósfera de Ar e irradiado; 5) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} en D_2O e irradiado 6) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} , 50 mM azida e irradiado; 7) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} , 50 mM azida e irradiado en atmósfera de Ar; 8) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} , 50 mM de DABCO e irradiado; 9) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} , 50 mM de D-manitol e irradiado. 10) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} , 50 mM de KI e irradiado.

A continuación se estudiaron los mecanismos de acción de DMC_{60}^{3+} en la bacteria Gram negativa *E. coli*, con una densidad celular de 10^8 UFC/ml. En todos los ensayos se empleó una concentración de 1 μM y el tiempo de irradiación de los cultivos de 15 min (Figura 31). Durante este tiempo de iluminación se produce una reducción de $\sim 2,8$ log, y, por lo tanto, cambios en las condiciones experimentales permiten observar una disminución o potenciación de la PDI.

Puede observarse que en atmósfera de argón hay una inhibición total de la PDI, indicando que para la inactivación de *E. coli* también es necesaria la presencia de oxígeno en el ambiente (Figura 31, columna 4). Cuando se adicionó D_2O a los cultivos celulares se observó una potenciación del daño celular de 1,83 log, evidenciando contribución del mecanismo tipo II en la PDI de *E. coli* (Figura 31, columna 5).

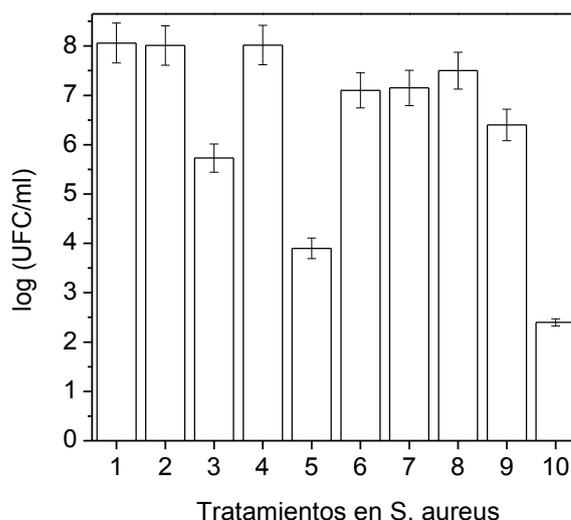


Figura 31. Supervivencia de células de *E. coli* (0,2 ml, $\sim 10^8$ UFC/ml) incubadas con $1 \mu\text{M}$ DMC_{60}^{3+} en la oscuridad por 15 min a 37°C e irradiadas con luz visible durante 15 min en policubeta de poliestireno de 96 pocillos: 1) cultivo control en oscuridad; 2) cultivo control irradiado; 3) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} e irradiado; 4) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} en atmósfera de Ar e irradiado; 5) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} en D_2O e irradiado 6) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} , 50 mM azida e irradiado; 7) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} , 50 mM azida e irradiado en atmósfera de Ar; 8) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} , 50 mM de DABCO e irradiado; 9) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} , 50 mM de D-manitol e irradiado. 10) cultivo tratado con DMC_{60}^{3+} , 50 mM de KI e irradiado.

En presencia de azida se observó un comportamiento similar al encontrado para *S. aureus*. Una disminución de la PDI de 1,4 log se observó en condiciones aeróbicas (Figura 31, columna 6). Esta inhibición resulta menor a la obtenida en la bacteria Gram positiva. Esto puede explicarse considerando los distintos microentornos en donde se ubica el fotosensibilizador en cada microorganismo en conjunción con la diferente penetración del ión azida en las células microbianas.^{96,197} En condiciones anóxicas se observó una inactivación cercana a 1 log evidenciando nuevamente la presencia de PDI independiente de oxígeno (Figura 31, columna 7).

Cuando se adiciona DABCO en el medio, se observa una protección del efecto fotodinámico de 1,8 log aproximadamente, confirmando la contribución del mecanismo tipo II de producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (Figura 31, columna 8). Además, al evaluar la PDI en presencia de D-manitol, se observa una inhibición menor a 1 log, indicando que también

puede estar presente una contribución del mecanismo tipo I en la fotoinactivación de *E. coli* mediada por DMC_{60}^{3+} (Figura 31, columna 9).

Por último, se evaluó el efecto de KI, donde se observó un incremento de la acción fotodinámica de 3,33 log (Figura 31, columna 10).

Los resultados obtenidos para ambas bacterias indican que la fotoinactivación mediada por DMC_{60}^{3+} puede presentar contribuciones de ambos mecanismos fotodinámicos. No obstante, si se analizan los efectos en la acción fotodinámica de los sustratos específicos DABCO y D-manitol, puede observarse algunas diferencias entre las dos bacterias estudiadas. Para *S. aureus* se observó una mayor inhibición de la PDI en presencia de D-manitol en comparación con DABCO. En cambio, para *E. coli* se observó un comportamiento inverso, siendo el DABCO quien protege en mayor medida. Esto estaría indicando una mayor contribución del mecanismo tipo I en la bacteria Gram positiva, y del tipo II en la Gram negativa. Tal comportamiento puede explicarse considerando el microentorno donde se localiza el fotosensibilizador en cada bacteria. En general las bacterias Gram negativas presentan una mayor densidad de carga negativa que las bacterias Gram positivas.³⁵⁸ Por lo tanto, es esperable que el fullereno tricatiónico se una más fuertemente a *E. coli* que a *S. aureus*. Esta localización del fullereno influye en el tipo de ROS que se genera mediante el proceso de fotosensibilización.⁹⁶ En aquellos microentornos en los cuales la concentración de oxígeno es baja, el mecanismo de fotorreacción será principalmente tipo I, mientras que cuando el medio es oxigenado adquirirá importancia la formación de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Entonces, en el caso de *E. coli* donde el fullereno está estrechamente unido a la membrana celular hidrofóbica y la concentración de oxígeno es relativamente alta, se espera que la contribución del mecanismo tipo II sea mayor. En cambio, en *S. aureus*, DMC_{60}^{3+} puede encontrarse en mayor proporción en la solución acuosa en donde se favorece la transferencia de electrones para generar ROS por mecanismo tipo I. Estos resultados son congruentes con los encontrados en presencia de D_2O , donde se observa una mayor potenciación por aumento del tiempo de vida del $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ en la *E. coli*.

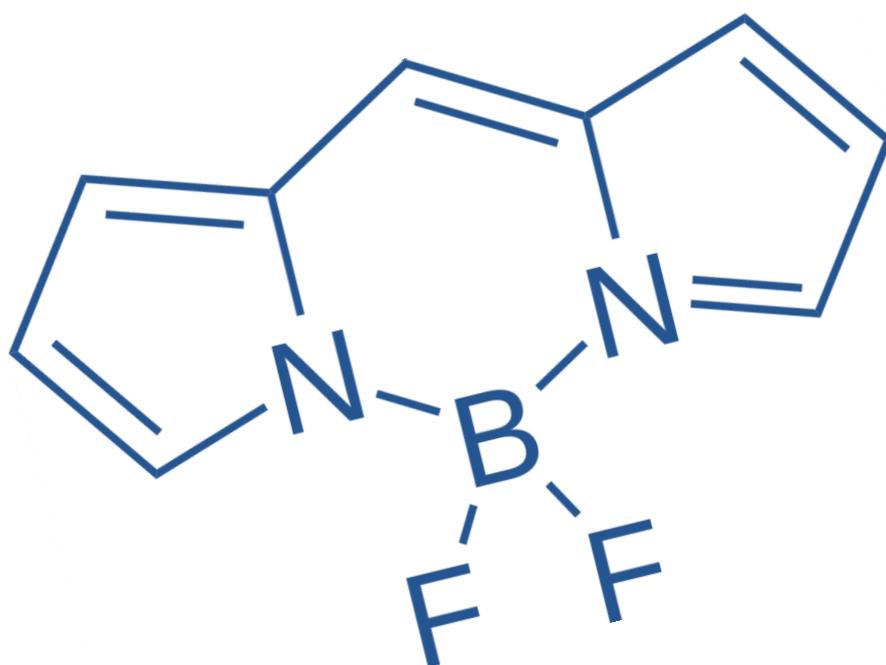
En el caso de DPC_{60}^{2+} estudiada previamente, se observa una mayor contribución del mecanismo tipo II en la PDI de *S. aureus*. Esto puede deberse a las características estructurales del fotosensibilizador, que presenta una cadena alifática que permite una fácil movilidad de la carga facilitando la interacción con la membrana bacteriana.

Por otro lado, puede observarse que DMC_{60}^{3+} , al igual que DPC_{60}^{2+} , muestra acción fotodinámica en condiciones anóxicas y en presencia de anión azida. Este comportamiento resulta importante ya que existen infecciones generadas por microorganismos anaeróbicos. *S. aureus* y *E. coli* son bacterias anaeróbicas facultativas, por lo que crecen en presencia de oxígeno, pero en su ausencia son capaces de cambiar a la fermentación o respiración anaeróbica. Así la combinación de fullereno, azida e irradiación puede permitir la PDI en ausencia de oxígeno.

También es necesario remarcar que la presencia de KI potencia relevantemente la PDI de DMC_{60}^{3+} en ambas bacterias, mostrando un incremento mayor en la *E. coli*. Esto puede deberse a la mayor contribución del mecanismo tipo II descrito previamente. La mayor formación de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ hace que reaccione con el anión I^- , formando $\text{O}_2^{\cdot-}$ y especies reactivas de yodo, que permiten potenciar significativamente el efecto fotodinámico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

BODIPYs como fotosensibilizadores y moléculas antenas



4.12. Derivados de BODIPYs como fotosensibilizadores

Luego del estudio y evaluación de derivados del C₆₀ nos propusimos estudiar y diseñar estructuras que aporten a la disminución de otra desventaja que presenta el C₆₀, que tiene que ver con su bajas absorptividades molares y con la presencia de sus principales bandas de absorción en la zona ultravioleta y en la región azul del visible, en donde la penetración de la luz en los tejidos es relativamente pobre. Para tal fin, se pensó en el diseño de díadas conformadas por una antena captadora de luz en el centro de la región visible y dadora de energía, unida covalentemente a derivados del C₆₀, como aceptores de esa energía. Como antenas captadoras de luz, se propusieron fluoróforos derivados del BODIPY. Así, en primera instancia, se realizó la síntesis de dos BODIPYs catiónicos con diferentes características estructurales, para luego estudiar en detalle sus propiedades fisicoquímicas y fotodinámicas en solución y medio micelar. Posteriormente se evaluaron estos compuestos como FS en PDI de bacterias (*S. aureus* y *E. coli*). En paralelo a estos estudios, se evaluó el efecto de la presencia de KI en la emisión de fluorescencia, las propiedades fotodinámicas y en la PDI *in vitro* de ambos BODIPY

4.13. Síntesis de BODIPYs

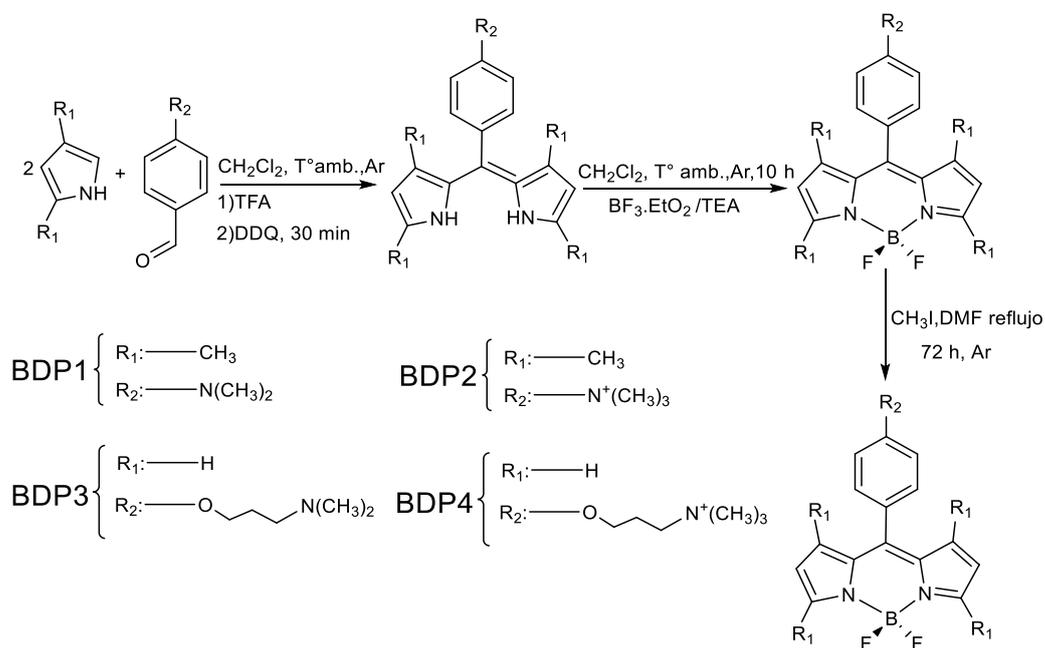
Los BODIPYs se sintetizaron mediante la conocida reacción de condensación de pirrol, desarrollada inicialmente para la síntesis de varios tipos de porfirinas.^{359,360} La misma permite preparar los compuestos deseados a través de una condensación directa entre el pirrol o sus derivados, y aldehídos aromáticos, en presencia de TFA en cantidades catalíticas. El carácter electrófilo del aldehído aromático es necesario para la formación de la unión entre dos unidades de pirrol.

Para BDP1, se partió de 2,4-dimetilpirrol y 4-(*N,N*-dimetilamino)benzaldehído, y para BDP3, de 4-[3-(*N,N*-dimetilamino)propoxyl]benzaldehído y pirrol sin sustituir (Esquema 57).

Los dipirrometanos obtenidos a partir de la condensación, se oxidaron con DDQ para formar los dipirrometenos. Posteriormente, se trataron con BF₃·EtO₂ en presencia de una base (TEA), para obtener los BODIPYs deseados. Todos estos pasos sintéticos se realizaron en el mismo balón de reacción. Para obtener los productos puros, se requirió de una sola etapa de purificación mediante cromatografía en columna, utilizando CH₂Cl₂ como solvente eluyente. En el caso del BDP3, se agregó una pequeña cantidad de TEA, para prevenir la interacción de la amina terciaria básica del producto con la sílica gel, la

cual tiene propiedades débilmente ácidas. Los rendimientos de síntesis para BDP1 y BDP3 fueron de 25% y 6% respectivamente. El bajo rendimiento de reacción para BDP3, puede deberse a la presencia de reacciones secundarias, debido a la reactividad del anillo de BODIPY sin derivatizar. No obstante, este rendimiento podría aumentarse optimizando las condiciones de reacción.

La inserción de aminas aromáticas en la posición 8 del anillo del BODIPY permite modular el carácter anfifílico de los compuestos, lo que aumenta la solubilidad en el medio biológico, e incrementa la asociación y penetración en las membranas celulares. Además, los sustituyentes en la posición *meso*, permiten incorporar funcionalidad a los compuestos. En tal sentido, los grupos aminos libres, brindan un sitio accesible para generar sales de amonio cuaternaria, y así obtener los derivados catiónicos importantes para lograr una fuerte interacción con membranas celulares. En efecto, se realizó una metilación exhaustiva de BDP1 y BDP3 con un exceso de yoduro de metilo como agente metilante en DMF. La reacción se llevó a cabo durante 72 h, en agitación y atmósfera de argón a 40°C, obteniéndose para ambos casos 95% de rendimiento.



Esquema 57. Síntesis de BODIPYs.

La principal diferencia entre ambos BODIPYs catiónicos es la presencia del grupo alifático de amonio cuaternario en BDP4. En esta estructura el grupo catiónico se aísla del BODIPY mediante un puente propoxi, por lo tanto, la carga tiene una influencia mínima

sobre la densidad electrónica del núcleo del BODIPY. Además, la cadena alifática proporciona una mayor movilidad a la carga, lo que podría facilitar la interacción con la envoltura celular de los microorganismos. Otra diferencia importante tiene que ver con la β -sustitución en BDP1 por grupos metilos, que puede tener influencia en la rotación del anillo aromático en la posición meso del BODIPY, como veremos más adelante.³⁶¹

4.14. Propiedades espectroscópicas de absorción y fluorescencia

Los espectros de absorción de los compuestos BDP2 y BDP4 se registraron en medios homogéneos de diferente polaridad (*n*-heptano, tolueno, DMF y agua), y en un sistema micelar inverso formado por *n*-heptano/AOT(0,1M) /agua ($W_0=10$). En la Figura 33, se muestran los espectros obtenidos.

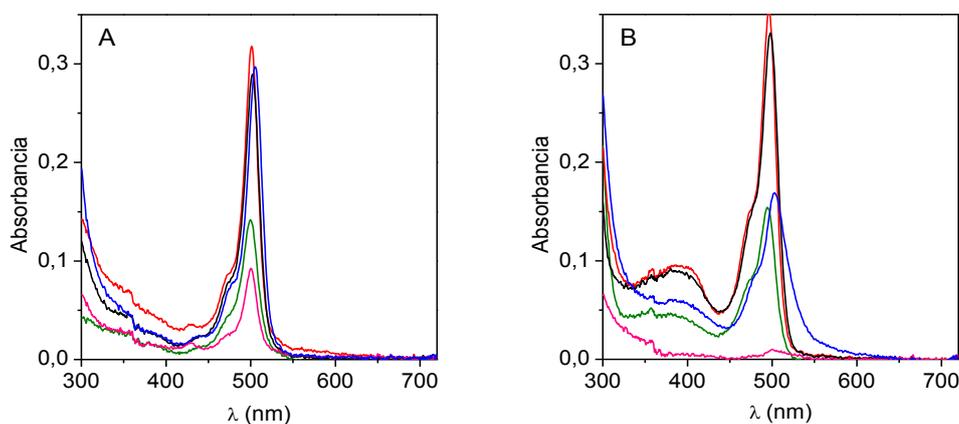


Figura 32. Espectros de absorción de UV-visible de BODIPYs en diferentes medios. A) BDP2 B) BDP4. DMF (negro), agua (verde), *n*-heptano (fucsia), tolueno (azul), *n*-heptano/AOT(0,1M) /agua ($W_0=10$) (rojo)

La sustitución en la posición *meso* del núcleo del BODIPY, no modifica considerablemente las bandas de absorción con respecto a los compuestos sin sustitución.^{235,236} Los espectros de ambos compuestos muestran las características encontradas para la mayoría de BODIPYs con estructuras similares, con altos coeficientes de extinción molar ($>10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La banda principal de absorción se presenta alrededor de 500 nm, correspondiendo a la transición al primer estado excitado (S_0-S_1), con un pequeño hombro en torno a 480 nm, que puede asignarse a la banda vibracional 0-1 de la misma transición. También se observa, principalmente para BDP4, la banda de transición S_0-S_2 ($\pi-\pi^*$) en torno a 370 nm.

La posición de los espectros es sólo ligeramente afectada por la influencia del solvente. Se observa un leve corrimiento hipsocrómico en la longitud de onda de máxima absorbancia con el incremento de la polaridad del solvente. Este comportamiento también se observó en los espectros de otras estructuras similares.²³⁷ Por otro lado, la absorbancia de los compuestos evidencia una fuerte dependencia con la polaridad del medio, mostrando diversos grados de agregación según el solvente. Comparando los espectros en agua y *n*-heptano, con respecto a los recogidos para *n*-heptano/AOT(0,1M) /agua ($W_0=10$), puede observarse como el sistema micelar aumenta el grado de monomerización de ambos BODIPYs. Cuando se estudió el espectro de absorción de BDP3 en micelas de AOT, se observó un aumento de la intensidad y un pequeño corrimiento hipsocrómico de 4 nm en el máximo de la banda con respecto al obtenido en *n*-heptano. Del mismo modo, la absorbancia de BDP4 aumentó significativamente en el medio micelar en comparación a lo observado en *n*-heptano, en donde la absorción resultó insignificante. El espectro de los BODIPYs en este sistema microheterogéneo resultó ser muy similar al obtenido en DMF, indicando que se disuelven como monómeros gracias a su interacción con la interfase micelar.¹²⁰ Estos resultados son interesantes, ya que tales medios micelares pueden ayudarnos a evaluar el comportamiento de las estructuras en microentornos biomiméticos de membranas biológicas.³²⁵

Los espectros de emisión de fluorescencia de los dos BODIPYs en DMF se presentan en la Figura 33. Estos se obtuvieron excitando la muestra a 470 nm. Ambas bandas de emisión alrededor de los 512 nm son las características de estas estructuras.²⁵⁴ Tales bandas pueden asignarse a la banda de vibración 0-0 de las transiciones $S_1 \rightarrow S_0$.²⁸⁴ A partir de la intersección de los espectros de absorción y fluorescencia, se calcularon los desplazamientos de Stokes de 11 y 14 nm para BDP2 y BDP4, respectivamente. Tal comportamiento, indica que la energía de absorción es similar a la energía de relajación del estado singlete excitado de más baja energía (S_1), lo que está de acuerdo con la estructura plana y rígida de los BODIPYs.³⁶² Esto sugiere que sólo una relajación geométrica menor se produce en el primer estado excitado. Los niveles de energía del estado excitado singlete (E_s) se calcularon teniendo en cuenta la energía de las transiciones electrónicas 0-0 (Tabla 7). Los valores de E_s son similares a los reportados anteriormente para este tipo de BODIPYs.^{305,362}

Al igual que en los espectros de absorción, la posición de los espectros de emisión no varía significativamente en relación a los que muestran los BODIPYs sin derivatizar en

la posición *meso*. Sin embargo, variaciones relevantes en los Φ_f se observan entre ambos compuestos. Como se muestra en la Tabla 7, BDP2 presenta un $\Phi_f \sim 0,29$ en coincidencia con lo descrito en trabajos previos para estructuras similares. Dicha emisión resulta apropiada para la cuantificación de los fotosensibilizadores por técnicas de emisión de fluorescencia.³⁶³ Sin embargo, BDP4 exhibe un rendimiento de un orden de magnitud más bajo que BDP2 ($\Phi_f \sim 0,03$). Resultados similares se reportaron previamente para estructuras de BODIPYs sustituidos en la posición 5. Estos resultaron ser débilmente fluorescentes en contraste con la alta fluorescencia encontrada para estructuras análogas de BODIPYs con sustituciones en las posiciones β .²⁸⁴ La baja fluorescencia se asignó a la libre rotación de los grupos sustituyentes en la posición *meso* del núcleo boro-dipirrometénico.³⁶⁴

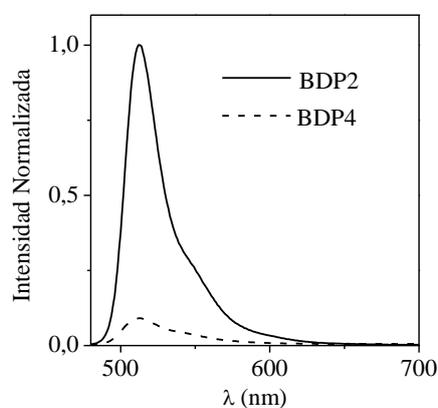
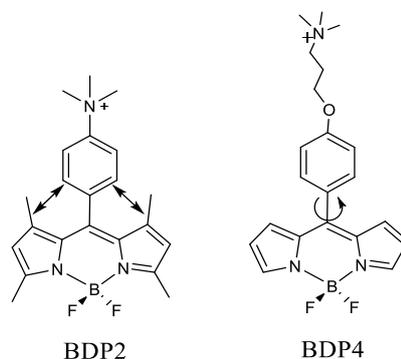


Figura 33. Espectros de emisión de fluorescencia de BDP2 (línea continua) y BDP4 (línea discontinua) en DMF.

En nuestro caso, la variación en la emisión también puede explicarse teniendo en cuenta las diferencias estructurales de los anillos pirrólicos constitutivos de los BODIPYs. Los grupos metilo en las posiciones β en BDP2, dificultan la libre rotación del anillo aromático localizado en la posición *meso*, incrementando la rigidez estructural y disminuyendo el número de vías de desintegración no radiactiva.³⁶⁵ En cambio, en el BDP4, el grupo sustituyente aromático puede rotar más libremente sin restricción estérica, ya que las unidades pirrólicas no se encuentran derivatizadas en las posiciones β (Esquema 58). Este cambio estructural en BDP4 tiene un efecto importante en las propiedades fotofísicas del estado estado singlete excitado. La rápida rotación intramolecular, hace que S_1 decaiga principalmente por un proceso no radiativo de conversión interna ($S_1 \rightarrow S_0$), haciendo que el Φ_f sea menor.^{284,361} Además la emisión de fluorescencia también puede

desactivarse por un proceso de transferencia de carga intramolecular generado por el efecto dador del oxígeno presente en la cadena alifática.



Esquema 58. Diferencias en la libre rotación del grupo sustituyente en la posición meso de los BODIPYs.

Tabla 7. Parámetros espectroscópicos y rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_f) de BODIPYs.

Parámetros	Medio	BDP2	BDP4
$\lambda_{\max}^{\text{Abs}}$ (nm) ^a	DMF	502	498
ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) ^a	DMF	8,51x10 ⁵	9,49x10 ⁵
$\lambda_{\max}^{\text{Em}}$ (nm) ^a	DMF	513	512
E_s (eV) ^a	DMF	2,44	2,45
Φ_F	DMF	0,29±0,02	0,030±0,005

Es importante tener en cuenta este comportamiento, que afecta de manera crucial a las magnitudes de Φ_f , a la hora de diseñar estructuras moleculares con el objetivo de utilizarlas como fluoróforos para técnicas de imagen o como dadores de energía en sistemas díadas. No obstante, BDP4 puede ser una estructura interesante para su estudio en técnicas de anisotropía de fluorescencia para imágenes en células. Por ejemplo, puede utilizarse para sensar cambios de viscosidad en el entorno biológico, mediante el incremento de su emisión en entornos más viscosos, debido a la disminución o impedimento de la rotación del grupo sustituyente.³⁶⁶ Además, se encontró previamente

que para BDP1 la fluorescencia se desactiva a un pH neutro o básico debido a la transferencia de electrones fotoinducida (PeT).²⁸³ Sin embargo, tras la protonación del nitrógeno de la anilina, la intensidad de fluorescencia aumenta drásticamente. Un efecto similar se observó en BDP3 porque la metilación del grupo amina también evita PeT.

4.15. Actividad fotodinámica

4.15.1. Fotooxidación de DPBF

El valor del rendimiento cuántico de producción de $O_2(^1\Delta_g)$ se calculó mediante la fotooxidación de DPBF que, como se dijo anteriormente, es un sustrato que desactiva a $O_2(^1\Delta_g)$ por reacción química exclusivamente (Esquema 44).³²¹

La descomposición DPBF fotosensibilizada por los BODIPYs se estudió en DMF y en medio micelar de *n*-heptano/AOT(0,1M) /agua ($W_0=10$). Las soluciones se irradiaron a 500 nm en condiciones aeróbicas. La fotodegradación de DPBF se siguió monitoreando su descomposición a partir de los espectros de absorción (Figura 34).

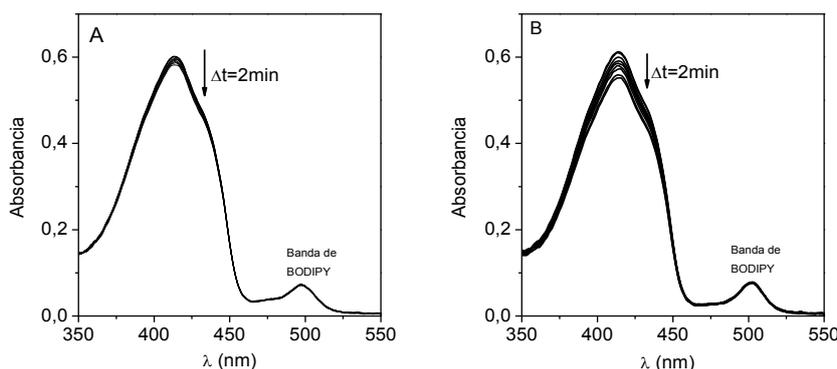


Figura 34. Descomposición de DPBF sensibilizada por BDP2 (A) y BDP4 (B) en DMF, irradiado con luz monocromática ($\lambda=500$ nm), Δt : 120 s.

En la Figura 34 puede observarse que la única banda de absorción que cambia con el tiempo de irradiación es la correspondiente a la disminución del DBPF, quedando invariante la banda principal de los BODIPYs. Esto indica que expuestas a tales condiciones de irradiación, ambos BODIPYs exhiben una buena fotoestabilidad.

En la Figura 35 se observa que la fotooxidación en todos los casos, sigue una cinética de pseudo primer orden a una longitud de onda de 415 nm con respecto a la concentración de DPBF.

A partir de los gráficos semilogarítmicos que describen el progreso de la reacción del DPBF, fueron calculados los valores de k_{obs} para cada BODIPY (Tabla 8). Teniendo en cuenta que este sustrato desactiva $O_2(^1\Delta_g)$ por reacción química exclusivamente, es un método utilizado para evaluar la capacidad de los fotosensibilizadores de producir $O_2(^1\Delta_g)$ en solución.

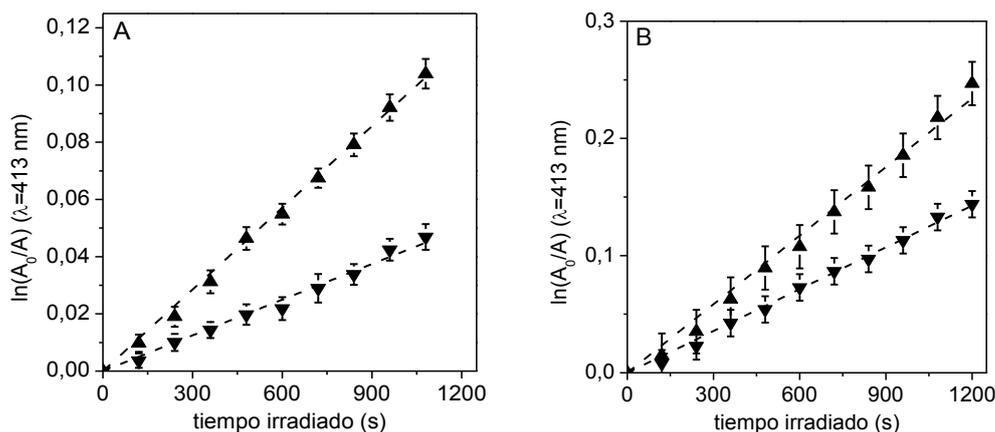


Figura 35. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de DPBF fotosensibilizada por BDP2 (▲) y BDP4 (▼) en DMF (A) y *n*-heptano/AOT(0,1M) /agua ($W_0=10$) (B).

Los valores de Φ_{Δ} en DMF, se calcularon comparando las pendientes de las rectas de descomposición de DPBF mediada por los BODIPYs con la correspondiente al C_{60} , utilizado como referencia. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 8. Si bien estos BODIPYs generan $O_2(^1\Delta_g)$ fotoinducidamente, los rendimientos cuánticos obtenidos son menores en comparación a otros fotosensibilizadores convencionales. Similares resultados se encontraron para otras estructuras de BODIPYs usando DPBF en isopropanol.^{281,367} Además, la oxidación fotosensibilizada de DPBF por 8-fenil-4,4'-difluoroboradiazaindaceno no se detectó en disolventes polares o no polares.³⁶⁸ Las mediciones directas revelaron que la fotogeneración de $O_2(^1\Delta_g)$ es muy baja en acetonitrilo para derivados de BODIPYs estructuralmente similares.³⁶⁹

Cuando la fotooxidación de DPBF se estudió en el medio micelar, se observó un aumento en la velocidad de descomposición del sustrato mediada por ambos BODIPYs. En este sistema, los compuestos de diferentes polaridades pueden disolverse simultáneamente. En general, la fotooxidación de los sustratos resulta más lenta en micelas inversas de AOT debido a la partición de $O_2(^1\Delta_g)$ entre las pseudofases internas y externas.¹²³ Sin embargo,

estos BODIPYs pueden interactuar eficientemente con las micelas de AOT a través de sus sustituyentes catiónicos, y localizarse en la interfase micelar debido a su carácter anfifílico. La localización de BODIPYs en la interfase micelar disminuye la agregación, como se observó en los estudios espectroscópicos y también puede disminuir el decaimiento vibratorio del estado singlete excitado. Como consecuencia de lo anterior, puede incrementarse la fotosensibilización de $O_2(^1\Delta_g)$ desde el estado triplete del BODIPY, aumentando la velocidad de fotooxidación de DPBF con respecto al medio homogéneo.

Diferentes estrategias se han utilizado para incrementar la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ por parte de BODIPYs. Principalmente se han sintetizado BODIPYs con átomos de halógeno (I, Br) unidos de manera covalente, principalmente en las posiciones 3 y 4 del núcleo dipirrólico.^{285,290} Esta derivatización permite incrementar el ISC desde el S_1^* hacia el T_1^* , por efecto de átomo pesado interno, y así aumentar la producción de $O_2(^1\Delta_g)$.³⁷⁰ Otros investigadores han logrado generar BODIPYs que producen eficientemente $O_2(^1\Delta_g)$ sin la necesidad de enlazar covalentemente átomos pesados. Recientemente se sintetizaron BODIPYs conjugados con átomos de platino y oro que también por efecto de átomo pesado, incrementan la capacidad fotosensibilizadora de la estructura.^{371,372} Anteriormente se diseñaron BODIPYs sin la presencia átomos pesados, que pueden poblar eficientemente sus estados tripletes. Por ejemplo se sintetizaron dímeros de BODIPYs que producen $O_2(^1\Delta_g)$ con elevada eficiencia.³⁷³ Además, se ha encontrado que BODIPYs fusionados con tienopirroles presentan habilidad para generar $O_2(^1\Delta_g)$.³⁷⁴ En el año 2013, Sun *et al.* diseñaron y sintetizaron BODIPYs conjugados con complejos ciclometalados de hierro (III) que mostraron una gran capacidad para producir $O_2(^1\Delta_g)$ bajo irradiación con luz visible.³⁷⁵ Recientemente se comprobó que BODIPYs conjugados con derivados de fenotiazinas pueden generar eficientemente $O_2(^1\Delta_g)$ mediante la formación de estados tripletes a partir de un proceso de recombinación de carga derivado de una transferencia fotoinducida de electrones.³⁷⁶

Por otro lado, y como se mostrará en detalle más adelante, una valiosa estrategia para potenciar la producción de ROS por parte de los BODIPYs, se basa en la unión covalente con estructuras que presentan altos ISC, como los fullerenos C_{60} .³⁰⁵

4.15.2. Fotooxidación de L-triptófano

El aminoácido Trp se empleó como un sustrato modelo de compuestos de interés biológico debido a que puede ser una molécula objetivo del efecto fotodinámico inducido

por los fotosensibilizadores en tratamientos de PDI. Como se mencionó previamente, este sustrato puede ser fotooxidado eficientemente por el mecanismo tipo I y tipo II.^{172,322}

El efecto fotodinámico se analizó a partir de la fotodescomposición del aminoácido Trp en DMF, siguiendo la disminución de la emisión de fluorescencia a ~340 nm. Esta reacción sigue una cinética de pseudo primer orden con respecto a la concentración de Trp (Figura 36). A partir del ajuste lineal de gráficos de $\ln(I_0/I)$ en función del tiempo, se calcularon los valores de k_{obs}^{Trp} para la descomposición de Trp sensibilizada por los BODIPYs.

Puede observarse que ambos BODIPYs fotodescomponen el Trp. Los valores de k_{obs} se muestran en la Tabla 8. Además, se observa que la velocidad de fotooxidación inducida por BDP4 es levemente mayor a la sensibilizada por BDP2.

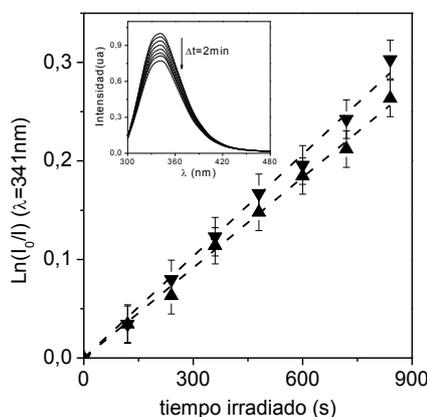


Figura 36. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de Trp fotosensibilizada por BDP2 (▲) y BDP4 (▼) en DMF. Inserto: Fotodescomposición de Trp sensibilizada por BDP2 en DMF, irradiado con luz monocromática ($\lambda_{irr}=500$ nm)

A partir de los resultados cinéticos de Trp y DPBF en DMF en las mismas condiciones experimentales, pueden calcularse las relaciones $k_{obs}^{Trp} / k_{obs}^{DPBF}$, arrojando valores de 3,2 y 8,3 para BDP2 y BDP4, respectivamente. Por otro lado, considerando las constantes de velocidad de segundo orden con $O_2(^1\Delta_g)$ de DPBF ($k_r^{DPBF}=1,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en DMF), y Trp con valores de $k_r^{Trp}=8,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en $HCONH_2/D_2O$ (90:10) o $k_r^{Trp}=7,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en metanol/ H_2O (50:50), puede calcularse la relación de $k_{obs}^{Trp} / k_{obs}^{DPBF}$.³³²

El valor obtenido es de aproximadamente 0,07, el cual es considerablemente inferior a los valores de $k_{obs}^{Trp} / k_{obs}^{DPBF}$ encontrados para ambos BODIPYs. Por lo tanto, es posible que una contribución del mecanismo tipo I esté también interviniendo en la

descomposición de Trp inducida por estos BODIPYs en DMF. Este efecto es más pronunciado cuando se utiliza BDP4, que cuenta con el grupo catiónico separado por una cadena alifática que puede evitar la interacción con la estructura principal del anillo de indaceno.

En línea con lo anterior, también se determinó la fotooxidación de Trp en presencia de DABCO y D-manitol. Es conocido que el primero, desactiva específicamente al $O_2(^1\Delta_g)$ por *quenching* físico; en cambio el segundo actúa como un atrapador de radicales como el anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y radical hidroxilo (HO^{\cdot}), generados por el mecanismo tipo I. Estos estudios se realizaron en DMF/5% H_2O debido a que los sustratos se agregaron desde una solución acuosa. Por lo tanto, en primer lugar se llevó a cabo la descomposición de Trp sensibilizada por los BODIPYs en este medio. Como puede observarse en la Figura 37 y Tabla 8, los valores de k_{obs} son menores en DMF/5% H_2O que en DMF. Este efecto puede estar influenciado por un tiempo de vida menor del $O_2(^1\Delta_g)$ en el medio más polar conteniendo agua que en DMF.³³²

En presencia de DABCO o D-manitol los resultados indican que los valores de k_{obs} disminuyen notoriamente, como se muestra en la Tabla 8.

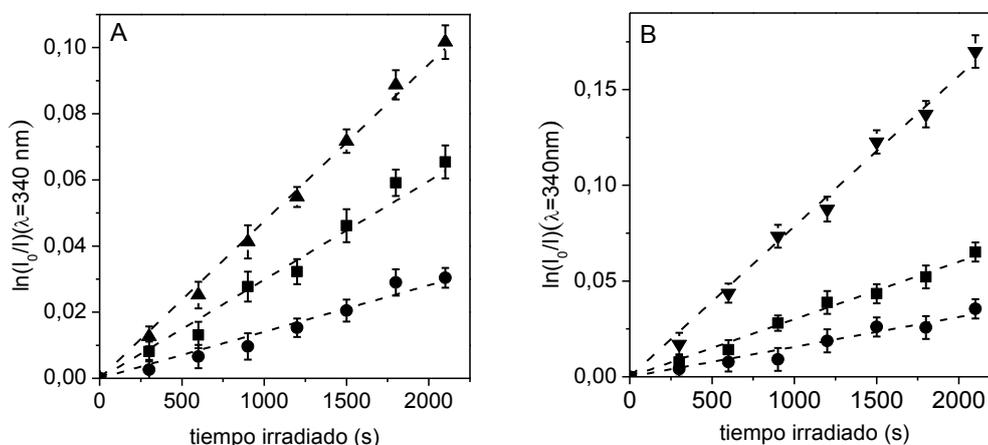


Figura 37. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de Trp en DMF/5% H_2O fotosensibilizada por: (A) BDP2 (▲) y (B) BDP4 (▼) con adición de DABCO (50 mM) (●) and D-manitol (50 mM) (■), $\lambda_{irr}=500\text{ nm}$.

Los estudios de fotooxidación del Trp evidencian la presencia de una contribución importante del mecanismo tipo I en la fotodescomposición del sustrato de origen biológico inducida por los BODIPYs. En estudios anteriores de BODIPYs con estructuras y características similares, también se comprobó la participación relevante del mecanismo

tipo I. Wang *et al.* detectaron por resonancia paramagnética electrónica (EPR, por sus siglas en inglés) formación del radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) para diversas estructuras de BODIPYs.²⁸⁶ Otros investigadores estudiaron los mecanismos de acción de BODIPYs en la escisión de ADN, y revelaron formación tanto del $O_2^{\cdot-}$, como del altamente reactivo radical hidroxilo ($HO\cdot$).³⁶⁷ Recientemente, Laine *et al.* sintetizaron tres simples BODIPYs y evaluaron la capacidad fototóxica de cada uno en células de cáncer de colon. También comprobaron que parte de la acción fotodinámica es generada por la formación de $O_2^{\cdot-}$.³⁶⁹

Tabla 8. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de DPBF (k_{obs}^{DPBF}), Trp (k_{obs}^{Trp}), y rendimientos cuánticos de oxígeno molecular singlete (Φ_{Δ}).

Parámetros	Medio	BDP2	BDP4
k_{obs}^{DPBF} (s^{-1})	DMF	$(9,51\pm 0,05)\times 10^{-5}$	$(4,15\pm 0,03)\times 10^{-5}$
Φ_{Δ}^a	DMF	0,07±0,01	0,03±0,01
k_{obs}^{DPBF} (s^{-1})	AOT ^b	$(1,95\pm 0,03)\times 10^{-4}$	$(1,25\pm 0,02)\times 10^{-4}$
k_{obs}^{Trp} (s^{-1})	DMF	$(3,06\pm 0,02)\times 10^{-4}$	$(3,44\pm 0,02)\times 10^{-4}$
k_{obs}^{Trp} (s^{-1})	DMF/ H ₂ O 5%	$(4,75\pm 0,05)\times 10^{-5}$	$(7,86\pm 0,07)\times 10^{-5}$
$k_{obs}^{Trp+DABCO}$ (s^{-1}) ^c	DMF/ H ₂ O 5%	$(2,98\pm 0,06)\times 10^{-5}$	$(3,00\pm 0,02)\times 10^{-5}$
$k_{obs}^{Trp+D-manitol}$ (s^{-1}) ^d	DMF/ H ₂ O 5%	$(1,41\pm 0,05)\times 10^{-5}$	$(1,56\pm 0,03)\times 10^{-5}$

^aReferencia fullereno C₆₀, $k_{obs}^{DBPF}=(1,44\pm 0,03)\times 10^{-3} s^{-1}$, $\Phi_{\Delta}=1$; ^b*n*-heptano/AOT (0,1M)/agua ($W_0=10$); ^c 50 mM DABCO; ^d 50 mM D-manitol.

4.16. Efecto del KI en la acción fotodinámica

Luego de evaluadas las propiedades fotodinámicas en solución de los BODIPYs, y de observar que estos exhiben una pequeña producción $O_2(^1\Delta_g)$ y una significativa participación de especies ROS generadas por el mecanismo tipo I, nos propusimos estudiar estas propiedades en presencia de la sal KI.

En estudios anteriores, se observó que el anión ioduro puede incrementar considerablemente el ISC de varios colorantes, mediante el efecto de átomo pesado

externo.³⁷⁷⁻³⁷⁹ Además, se comprobó que el I⁻ puede potenciar la acción fotoinactivante de algunos fotosensibilizadores, mediante la generación de especies reactivas de yodo, que en conjunto con las ROS, producen el daño celular.^{199,380} Por estos motivos, nos resultó interesante evaluar las propiedades espectroscópicas y la acción fotodinámica de los BODIPYs en presencia de KI.

4.16.1. Efecto del KI en la emisión de fluorescencia

En primera instancia, se evaluó el efecto del KI en la emisión de fluorescencia de ambos BODIPYs. Los espectros de emisión se tomaron en DMF conteniendo distintas concentraciones de KI (10, 25 y 50 mM) (Figura 38). A medida que aumenta la concentración del anión se observó una disminución en la intensidad de emisión de los BODIPYs.

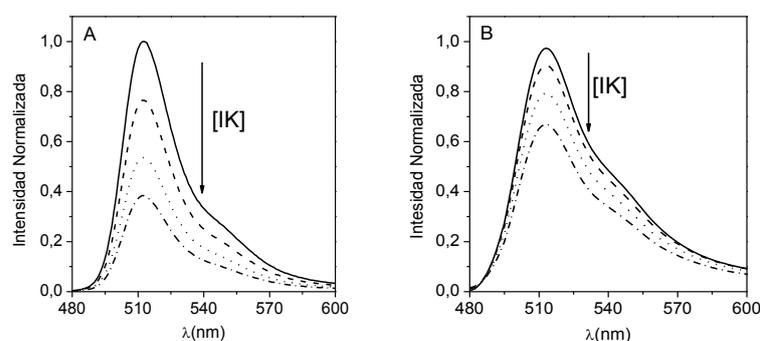


Figura 38. Espectros de emisión de BDP2 (A) y BDP4 (B) en DMF a diferentes concentraciones de KI, λ_{exc} 470 nm. Sin KI (línea continua), y con KI: 10 mM (línea discontinua), 25 mM (línea de puntos) e KI 50 mM (línea discontinua con punto).

Este efecto está acompañado por una disminución del Φ_F con el aumento de la concentración de la sal para ambos BODIPYs. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Con los datos obtenidos, podemos graficar la variación de la I_f en función de la concentración de KI (Figura 39). Mediante un ajuste lineal puede obtenerse la constante de Stern-Volmer a partir de pendiente de la recta (Ecuación 14)

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [KI] = 1 + K_{SV} [KI] \quad (14)$$

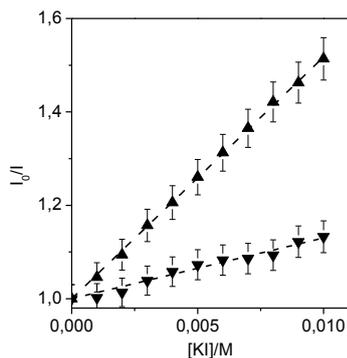


Figura 39. Variación de la intensidad de emisión de fluorescencia en función de [KI] en DMF de BDP2 ($\lambda_{\text{max}}^{\text{Em}} = 513 \text{ nm}$) (\blacktriangle) y BDP4 ($\lambda_{\text{max}}^{\text{Em}} = 512 \text{ nm}$) (\blacktriangledown), $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$.

Los valores obtenidos para la desactivación de fluorescencia por los iones yoduro se presentan en la Tabla 9. Se obtuvo un valor de K_{SV} mayor para BDP2. La desactivación de la emisión de ambos BODIPYs podría estar producido, posiblemente, por el incremento del ISC generado por el I. Por lo tanto, mediante un efecto de átomo pesado externo, podemos aumentar considerablemente la población del estado triplete de los BODIPYs, lo que resulta de gran importancia para la producción de ROS necesarias para la actividad fotodinámica.

Tabla 9. Rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_{F}) de BODIPYs a diferentes concentraciones de KI.

Parámetros	[KI] (mM)	BPD2	BDP4
Φ_{F}	0	0,29±0,02	0,030±0,001
	10	0,25±0,01	0,029±0,001
	25	0,18±0,01	0,026±0,001
	50	0,13±0,02	0,024±0,001
$K_{\text{SV}} (\text{M}^{-1})$	-	51,8±0,6	13,0±0,4

4.16.2. Espectroscopía de absorción de transientes en presencia de KI

Para confirmar la influencia del anión ioduro en las propiedades fotofísicas de los BODIPYs, espectros de absorción de transientes se registraron en ausencia y presencia de KI por láser flash fotólisis. Los espectros de transientes para BDP2 tomados en diferentes tiempos luego del pulso de láser se muestran en la Figura 40A.

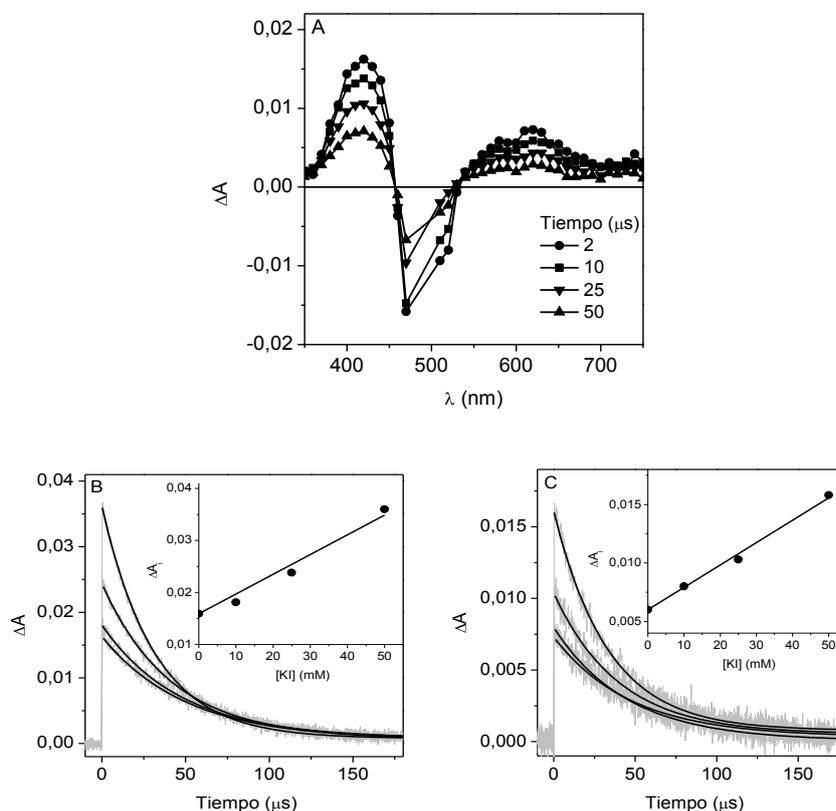


Figura 40. (A) Espectro de absorción de transientes de BDP2 en solución de DMF saturada en argón, determinado a diferentes tiempos, luego de excitación con pulso de láser a 532 nm. (B) Perfiles de decaimiento de absorción de BDP2 a 420 nm en presencia de 0, 10, 25 and 50 mM KI, inserto: cambios en la diferencia de absorbancia inicial (ΔA_i) con la concentración de KI a 420 nm. (C) Perfiles de decaimiento de absorción de BDP2 a 620 nm en presencia de 0, 10, 25 and 50 mM KI, inserto: cambios en la diferencia de absorbancia inicial (ΔA_i) con la concentración de KI a 620 nm.

La excitación con láser de pulso a 532 nm y en solución de DMF saturada con argón, da lugar a la formación de especies transitorias que presentan absorciones en el rango de 350-450 nm, con un máximo próximo a 420 nm, y una banda de longitud de onda más larga centrada cerca de 620 nm. Además, alrededor de 500 nm se observa la banda correspondiente a la depleción del estado fundamental del BODIPY tras la fotoexcitación.

Estudios previos con moléculas estructuralmente similares, mostraron espectros de absorción de transientes con características análogas.^{381,382} Estas observaciones indican que el espectro de absorción observado corresponde a una única especie transiente, la cual puede ser asignada al estado excitado triplete de BDP2 (³BDP2*). En presencia de diferentes concentraciones de KI se observó un incremento relevante en la absorción ³BDP2* a tiempo cero a ambas longitudes de onda (Figura 40B y 40C). Este aumento resultó ser directamente proporcional a la concentración de KI. A partir del ajuste exponencial de primer orden de los perfiles de decaimiento del triplete, se obtuvieron los tiempos de vida de ³BDP2 (τ_T) a ambas longitudes de onda de absorción (420 y 620 nm), en ausencia y en presencia de KI (Tabla 10). En ausencia de KI, el τ_T encontrado fue de 50 μ s, aproximadamente. En presencia de KI, los valores disminuyeron en proporción a la concentración de la sal inorgánica en solución.

Tabla 10. Tiempo de vida del estado triplete (τ_T) de BDP3 en ausencia y presencia de KI en las dos longitudes de onda de máxima absorción en DMF.

KI (mM)	τ_T (μ s) $\lambda = 420$ nm	τ_T (μ s) $\lambda = 620$ nm
0	50,3 \pm 0,8	48,9 \pm 0,8
10	46,1 \pm 0,7	45,0 \pm 0,8
25	41,2 \pm 0,7	39,8 \pm 0,7
50	31,2 \pm 0,6	32,4 \pm 0,6

Para BDP4, con una excitación por láser pulsado a 355 nm, se observó la banda de absorción alrededor de 420 nm con una baja absorción (Figura 41A). En este caso, se encontró una especie transitoria de larga vida (Figura 41B). Además, se visualizó un aumento en la absorción a tiempo cero en presencia de KI a una concentración de 50 mM (Figura 41B).

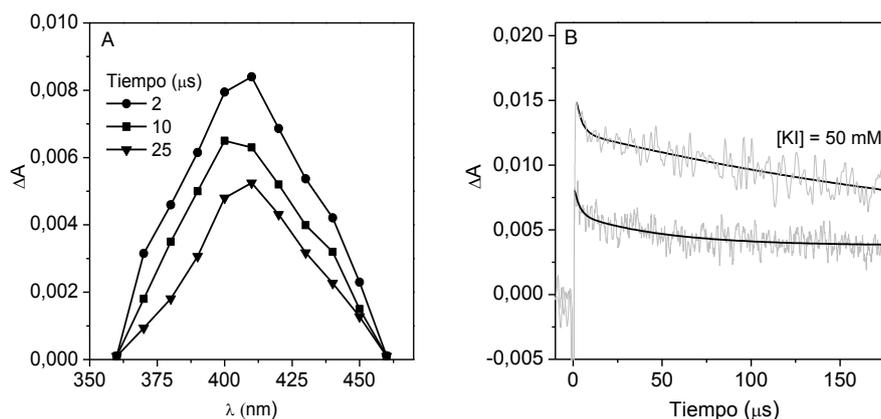


Figura 41. (A) Espectro de absorción de transientes de BDP4 en solución de DMF saturada en argón, determinado a diferentes tiempos, luego de excitación con pulso de laser a 355 nm. (B) Perfiles de decaimiento de absorción de BDP4 a 420 nm en ausencia de KI y en presencia de 50 mM de KI.

Los resultados encontrados confirman que la presencia de KI incrementa considerablemente el ISC hacia estados tripletes de ambos BODIPYs, lo que resulta de gran relevancia porque permite optimizar la acción fotodinámica de los fotosensibilizadores con la presencia de un átomo pesado externo. Un comportamiento similar se observó anteriormente para fluoróforos derivados de la rodamina y cianina.^{347,379} Mediante varios estudios fotofísicos, los investigadores observaron que el incremento en el ISC ocasionado por la presencia de KI (en concentraciones milimolares) es el proceso de mayor preponderancia, en comparación a otros procesos fotofísicos que también pueden influir en la desactivación de la emisión de fluorescencia. También se encontró que la sal inorgánica incrementa la velocidad de decaimiento del estado triplete.²⁸⁹

4.16.3. Fotooxidación de DPBF y Trp en presencia de KI

Para continuar profundizando el análisis del efecto del Γ en la acción fotodinámica de los BODIPYs, se evaluó la fotooxidación de DPBF y Trp DMF/ H₂O 5%, en presencia de diferentes concentraciones de KI.

En la reacción de descomposición de DPBF, se observó que las k_{obs} disminuyen con la presencia de la sal, decreciendo la velocidad de reacción a medida que aumenta la concentración de Γ (Figura 42). El efecto generado resultó ser mayor para la reacción sensibilizada por BDP4. En presencia de 50 mM de KI, el valor de k_{obs} disminuyó en un factor de 1,8 para BDP2, mientras que para BDP4 lo hizo en 9,0 (Tabla 11).

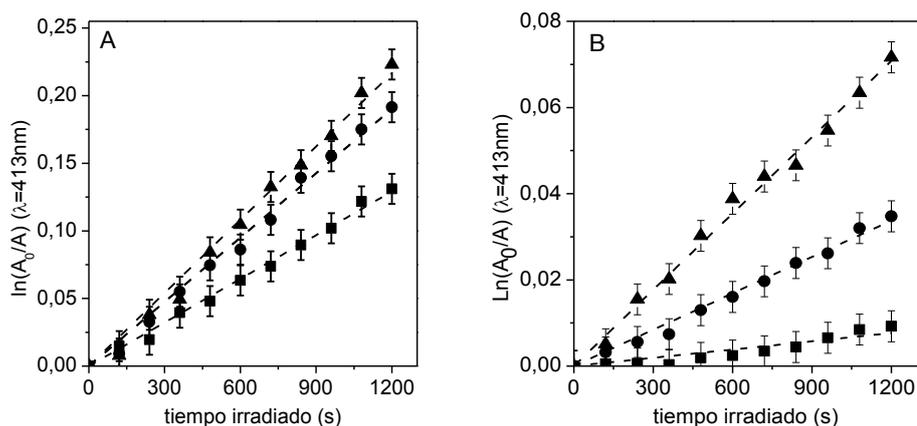


Figura 42. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de DPBF ($\lambda_{\text{irr}} = 500 \text{ nm}$) fotosensibilizada por BDP2 (A) y BDP4 (B) sin adición de KI (▲), con adición de 10 mM KI (●) y 50 mM KI (■).

Considerando el incremento del ISC con la presencia de KI, por el efecto de átomo pesado externo confirmado previamente, se esperaría un aumento en la producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Contrariamente, se observa una disminución de tal producción, lo que indica que puede estar ocurriendo una reacción de desactivación del $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ por parte del I. De hecho el anión yoduro se ha utilizado como sensor indirecto de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Previamente se ha observado que, cuando se añade KI en concentraciones micromolares, puede actuar como un antioxidante, promoviendo la recuperación de fluoróforos fotooxidados.³⁴⁷

La reacción entre el anión I y $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ posiblemente ocurra mediante una transferencia electrónica entre ambas especies, que puede desembocar en la generación de diferentes especies de yodo.³⁴⁴

Para profundizar en la evaluación de la actividad fotodinámica en presencia de yoduro, se estudió la reacción de fotooxidación de Trp con KI (50 mM). Como se observa en la Figura 43, se produce un incremento considerable de las k_{obs} cuando el medio de reacción contiene la sal inorgánica (Tabla 11).

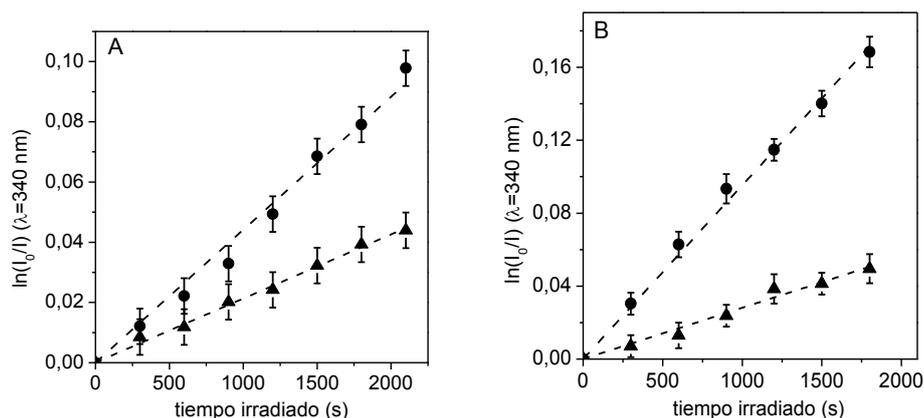


Figura 43. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de Trp ($\lambda_{irr} = 500 \text{ nm}$) fotosensibilizada por BDP2 (A) y BDP4 (B) sin adición de KI (\blacktriangle) y con adición de 50 mM KI (\bullet).

Este incremento en la descomposición del sustrato, puede ser consecuencia del aumento en la generación ROS por el efecto de átomo pesado externo, y en paralelo, por la formación de las especies radicales de yodo que también podrían estar descomponiendo al Trp. La degradación oxidativa de Trp puede encontrarse bajo diferentes condiciones de ionización de las proteínas.³⁸³ Además, el aminoácido Trp puede actuar como inhibidor competitivo de la reacción de oxidación de yoduro, y por lo tanto pueden reaccionar con su forma oxidada.³⁸⁴

Tabla 11. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de DPBF (k_{obs}^{DPBF}) y Trp (k_{obs}^{Trp}) en presencia de KI.

Parámetros	Medio	Aditivo	BDP2	BDP4
$k_{obs}^{DPBF} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	DMF/ H ₂ O 5%	-	$(1,80 \pm 0,03) \times 10^{-4}$	$(5,81 \pm 0,04) \times 10^{-5}$
	DMF/ H ₂ O 5%	10 mM KI	$(1,58 \pm 0,02) \times 10^{-4}$	$(2,79 \pm 0,03) \times 10^{-5}$
	DMF/ H ₂ O 5%	50 mM KI	$(1,02 \pm 0,01) \times 10^{-4}$	$(0,64 \pm 0,05) \times 10^{-5}$
$k_{obs}^{Trp} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	DMF/ H ₂ O 5%	-	$(2,13 \pm 0,03) \times 10^{-5}$	$(2,79 \pm 0,04) \times 10^{-5}$
	DMF/ H ₂ O 5%	50 mM KI	$(4,42 \pm 0,06) \times 10^{-5}$	$(9,55 \pm 0,05) \times 10^{-5}$

4.16.4. Generación de especies reactivas de iodo

Por último, en lo que respecta a estudios en presencia de KI en solución, se investigó la generación de especies reactivas de iodo por parte de ambos BODIPYs. El seguimiento de estas especies, se realizó a partir de los espectros de absorción generados luego de la irradiación con luz visible de la solución de BODIPY con KI, a diferentes tiempos de irradiación (5, 10, 15 y 30 min). Como control positivo, se utilizó el espectro de absorción correspondiente al I_3^- , generado a partir de una solución de Lugol (sol. acuosa de $I_2 + I^-$) (Figura 44).

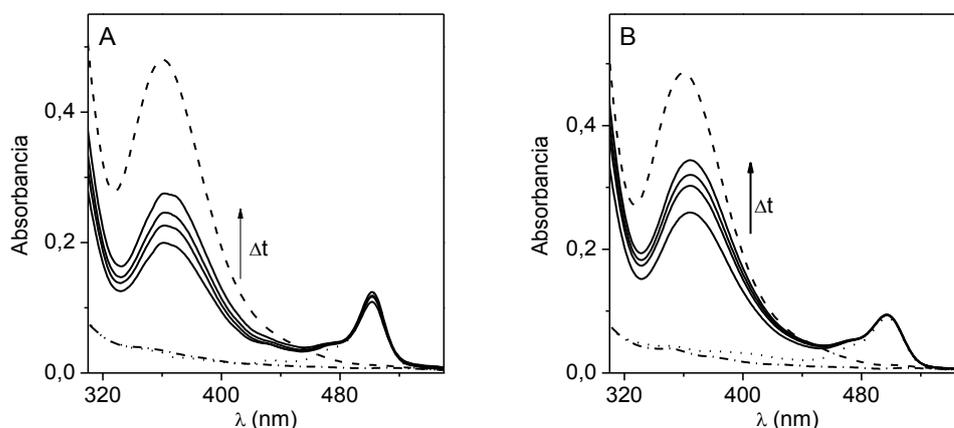
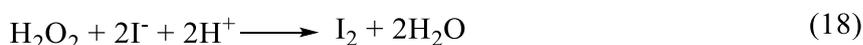
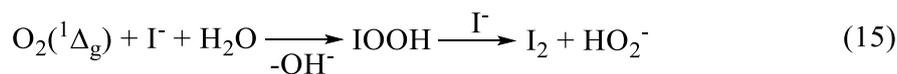


Figura 44. Espectros de absorción de (A) BDP2 (1 μ M) y (B) BDP4 (1 μ M) en DMF/H₂O 5% con 10 mM KI registrados antes (línea de puntos), y luego de la irradiación con luz visible a diferentes tiempos (5, 10, 15 y 30 min, línea continua). Espectro referencia de una solución de iodo (20 μ M, línea discontinua). Control de KI sólo e irradiado por 30 min (línea de guión punto).

Para ambos BODIPYs se observa un crecimiento relevante de la banda de absorción alrededor de 360 nm en función del tiempo irradiación. El espectro formado es el característico del anión triioduro (I_3^-).³⁸⁵ Es importante resaltar que la misma experiencia se realizó en atmósfera de argón, y no se observó formación de I_3^- , lo que indica que el mismo se forma por la reacción con $O_2(^1\Delta_g)$.

En medios acuosos, la reacción de aniones ioduro y $O_2(^1\Delta_g)$ puede resultar en la producción de I_3^- detectado espectroscópicamente (Ecuaciones 15 y 16).^{386,387} En este proceso también se forma peróxido de hidrógeno (H_2O_2), una especie reactiva de oxígeno eficiente para la acción fotodinámica³⁸⁸ (Ecuación 17). Además, H_2O_2 puede reaccionar con más aniones I^- para generar I_2 (Ecuación 18). En presencia de un exceso de aniones ioduro, los átomos de iodo pueden producir más I_3^- (ecuación 16).



Además, en este sistema también podrían generarse otras especies reactivas de iodo de corta duración, tales como radical iodo (I^\cdot) y anión radical iodo ($\text{I}_2^{\cdot-}$).³⁴⁴ Puede asumirse que el radical iodo altamente reactivo reacciona con I^- , para producir $\text{I}_2^{\cdot-}$.³⁸⁹ Esta especie es un intermediario inestable que puede dismutar formando de I_3^- y I^\cdot .³⁹⁰

4.17. Unión de BODIPYs en bacterias

La unión celular de ambos BODIPYs en células bacterianas se investigó por microscopía de fluorescencia. La Figura 45 muestra las imágenes obtenidas en células de *S. aureus* y *E. coli* incubadas con los fotosensibilizadores a una concentración de 5 μM en PBS durante 30 min en la oscuridad.

La fluorescencia verde observada en las células bacterianas para ambos BODIPYs, muestra que estos presentan una alta afinidad para la unión con tales microorganismos. Similares resultados se encontraron previamente para derivados de porfirina unidos a células microbianas.^{125,363}

A diferencia de lo observado anteriormente en los estudios de fluorescencia en medio homogéneo, en donde se encontró que el rendimiento cuántico de fluorescencia de BDP4 fue aproximadamente de un orden de magnitud menor que el correspondiente a BDP3, en el medio celular no se observan diferencias significativas en la emisión de ambos BODIPYs. Este comportamiento puede deberse a la reducción de la libre rotación del grupo sustituyente del BDP2 en un medio de mayor viscosidad como lo es el entorno celular.³⁹¹ Esta disminución de la rotación puede generar una disminución del decaimiento del estado singlete excitado del BDP2 por desactivación térmica, y en paralelo, potenciar la emisión de fluorescencia.

La emisión importante que muestran estos BODIPYs en el medio biológico señala que estos compuestos presentan interesantes características para utilizarlos dualmente como agentes teranósticos. O sea como fluoróforos para imágenes de diagnóstico celular y

como fotosensibilizadores en terapia de PDI. Además, las imágenes de fluorescencia pueden resultar útiles para monitorear y confirmar la presencia del fotosensibilizador en los tejidos objetivos, así como su grado de fotoblanqueo.³⁹²

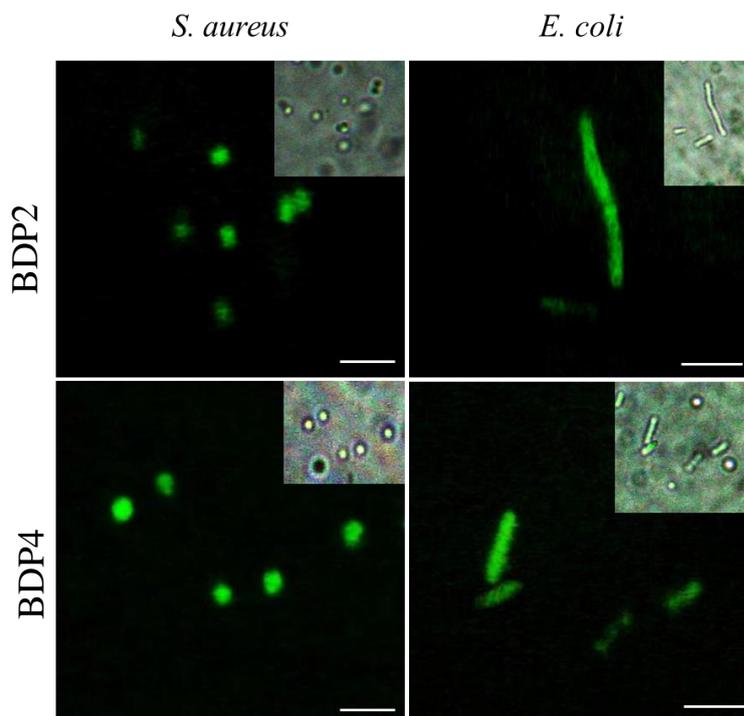


Figura 45. Microscopía de fluorescencia en *S. aureus* y *E. coli* incubadas con 5 μM de BDP2 y BDP4 durante 30 minutos a 37 ° C en la oscuridad. Inserto: Microscopía de campo claro (objetivo de microscopio 100 \times , barra de escala $\sim 2 \mu\text{m}$).

4.18. PDI sensibilizada por BODIPYs

Los BODIPYS se evaluaron como agentes fotodinámicos *in vitro* utilizando una bacteria Gram positiva, *S. aureus* y otra Gram negativa, *E. coli*. Paralelamente se evaluó el efecto del Γ (50 mM) en la acción fotodinámica.

Para esto, suspensiones de células bacterianas ($\sim 10^7$ UFC/ml) en PBS se trataron con 1 μM de BODIPYs para *S. aureus* y 5 μM para *E. coli*, en ausencia y presencia de KI (50 mM), y se irradiaron con luz visible.

La Figura 46 muestra las curvas de supervivencia de las células bacterianas después de diferentes tiempos de irradiación (5, 15 y 30 min). Los experimentos de control mostraron que la viabilidad de ambas bacterias no se vio afectada por la iluminación en ausencia de fotosensibilizador, ni tampoco por la incubación en la oscuridad con las moléculas, lo que indica que la mortalidad celular resultante, después de la irradiación de

los cultivos tratados con los BODIPYs, es debido al efecto de fotosensibilización del agente producido por la luz visible. Además, el KI (50 mM) sólo o combinado con los fotosensibilizadores no resultó tóxico para los microorganismos en oscuridad durante 30 min de incubación. Tampoco se observó toxicidad para las células microbianas incubadas con KI (50 mM) e irradiados durante 30 min en ausencia de BODIPY.

Como puede observarse en la Figura 46 A, ambos BODIPYs mostraron una gran eficiencia en la PDI de *S. aureus*. Después de un corto tiempo de irradiación de 5 min, ambos BODIPYs indujeron una disminución de la supervivencia celular de 4,5 log. Además, lograron una erradicación completa después de 15 min a una concentración de 1 μ M. La adición de KI produjo un pequeño aumento en la fotoinactivación después de 5 min de irradiación. Pero a tiempos más largos, la influencia del I en la acción fotodinámica no resultó significativa debido a la notoria eficiencia de los BODIPYs en ausencia de KI.

En los ensayos realizados utilizando la cepa de *E. coli*, se observó una inactivación similar para los dos BODIPYs (Figura 46 B). Después de 5 min de irradiación, se observó una reducción de 1,5 log en la supervivencia celular, mientras que con una irradiación de 15 min se generó una disminución de 2,5 log. Se necesitaron 30 min de irradiación para alcanzar una PDI de \sim 4,5 log.

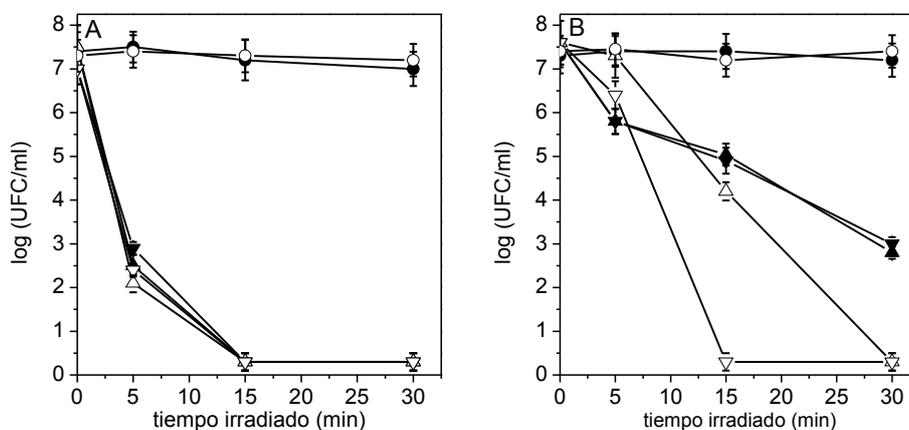


Figura 46. Curvas de inactivación de A) *S. aureus* ($\sim 10^7$ UFC/ml) tratada con 1 μ M de BDP2 (\blacktriangle), BDP4 (\blacktriangledown), BDP2 + 50 mM KI (\triangle) y BDP4 + 50 mM KI (∇). B) *E. coli* ($\sim 10^7$ UFC/ml) tratada con 5 μ M de BDP2 (\blacktriangle), BDP4 (\blacktriangledown), BDP2 + 50 mM KI (\triangle) y BDP4 + 50 mM KI (∇) e irradiadas con luz visible. Cultivo de control sin tratar (\bullet). Cultivo de control tratado con 50 mM KI sin fotosensibilizador e irradiado (\circ).

La mayor dificultad para inactivar la bacteria Gram negativa, se debe principalmente a la presencia de la membrana externa compleja altamente hidrofóbica, que la protege de la actividad fotodinámica del fotosensibilizador

Con la presencia de KI se observan dos comportamientos diferentes en *E. coli* (Figura 46B). Después de 5 min de irradiación, la fotoinactivación disminuyó en presencia de 50 mM de KI. Sin embargo, se evidenció una potenciación a los tiempos de irradiación más largos (15 y 30 min). Después de una irradiación de 15 min, la adición de KI produjo un incremento de 1 log y 4 log en la inactivación bacteriana para BDP2 y BDP4, respectivamente. Además, no se detectó supervivencia celular después de 30 min de irradiación en presencia de KI. Bajo estas últimas condiciones, ambos BODIPYS produjeron una relevante disminución (>7 log) en la viabilidad celular.

La fotoinactivación de *E. coli* también se evaluó utilizando diferentes concentraciones de KI (0-50 mM) (Figura 47). La adición de KI se analizó después de 5 min y 15 min de irradiación (Figura 47A y B). Al tiempo de irradiación más corto, la presencia de aniones de yoduro no impacta significativamente en la fotoinactivación (Figura 47A), mostrando incluso una pequeña protección en la inactivación con el incremento de la concentración de KI. Después de 15 min de irradiación, se observó un potenciación de la fototoxicidad con el aumento en la concentración de la sal (Figura 47B). El efecto de KI se observó principalmente para BDP4. Una menor potenciación por KI se encontró utilizando BDP2.

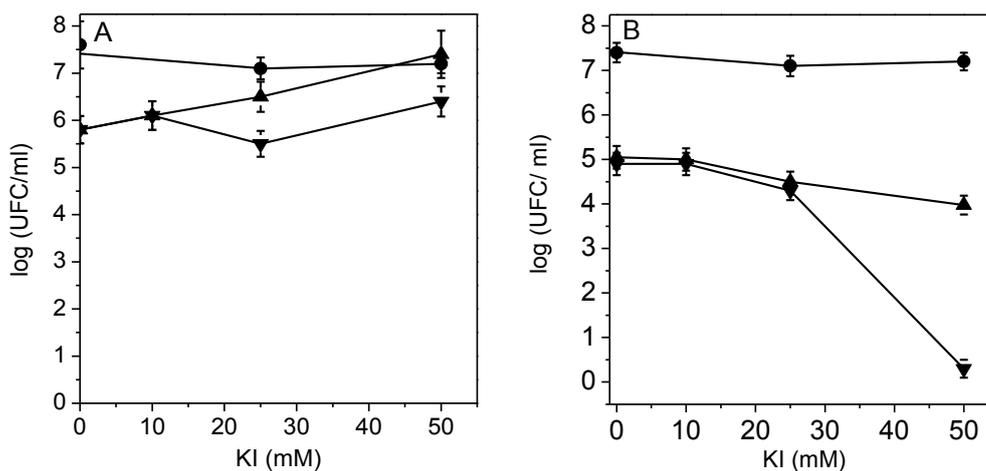


Figura 47. Curvas de supervivencia de *E. coli* ($\sim 10^7$ CFU/ml) con (A) 5 min y (B) 15 min de irradiación tratada con 5 μ M BDP3 (▲) o BDP4 (▼) y diferentes concentraciones de KI. Cultivo de control irradiado sin fotosensibilizador (●).

La mayor potenciación de la acción fotoinactivante en *E. coli* de BDP4 con la presencia de yoduro, es congruente con lo observado en los estudios fotodinámicos en solución. Estos mostraron que BDP4 fotodescompone al Trp con mayor eficiencia en comparación a BDP2, en presencia de KI. Además, se observó que BDP4 genera más I_3^- , lo que indica una mayor producción de especies reactivas de yodo por parte de este BODIPY. Esto puede estar indicando una desactivación del S_1^* a partir de un ISC más eficiente, lo que permite una mayor formación de especies reactivas generadoras de la acción fotodinámica.

La eficacia de los BODIPYs puede ser comparada con otros fotosensibilizadores monocatiónicos reportados. Por ejemplo, un fullereno con una carga positiva (DAC_{60}^+) sólo produjo una fotoinactivación de 1,5 log, en *E. coli* (10^6 UFC/ml) con $1\mu M$ y 30 min de irradiación.¹⁵⁸ Una porfirina monocatiónica (AB_3^+ , $1\mu M$) mostró una escasa inactivación de $\sim 0,5$ log en *E. coli* (10^6 UFC/ml) a los 20 min de irradiación.³⁵⁶

Si se compara con la actividad fotoinactivante de los BODIPYs yodados, mostrados en la Sección 1.6.5., se observa que éstos generan una PDI similar pero a menores tiempos de irradiación. No obstante, el efecto del yoduro en BDP4, permite alcanzar una eficiencia análoga a la que presentan los BODIPYs halogenados.^{290,393} Rice *et al.* estudiaron dos conjugados constituidos por BODIPYs y una unidad de zinc (II)-dipicolilamina, que otorga selectividad para unirse específicamente a células microbianas.²⁹⁷ Una estructura se estudió como un agente fluorescente para generación de imágenes celulares y la otra, con átomos de yodo unidos covalentemente, como agente fotosensibilizante. La acción fotodinámica del fotosensibilizador se evaluó en bacterias. A una densidad celular de 10^6 UFC/ml y con $10\mu M$ de BODIPY, se observó una PDI de aproximadamente 4,5 log para *S. aureus*, y de 3,5 log para *E. coli*.

Por otro lado, la potenciación de la PDI con la presencia de I^- fue observada también para otros fotosensibilizadores.^{199,344,380} Así, se estudió en efecto de la adición de KI en la PDI mediada por el azul de metileno en *S. aureus* y *E. coli* aumentó.³⁴⁴ Se encontró un significativo incremento de la muerte bacteriana irradiando con luz roja en presencia de KI (10 mM). Por otra parte, se comprobó que la PDI de *Acinetobacter baumannii*, *S. aureus* y *C. albicans* con fullerenos catiónicos podría ser potenciado por yoduro tanto *in vitro* como *in vivo*.¹⁹⁹

Los resultados encontrados para los BODIPYs catiónicos sintetizados, nos indican que estas estructuras fotosensibilizadores son prometedores en la PDI de bacterias.

Además, la adición del anión I⁻ potencia notoriamente esta acción fotodinámica, debido al incremento del ISC que permite aumentar la producción de ROS, y además, generar especies reactivas de iodo, que incrementan el daño celular. Este efecto externo del yoduro, evita la necesidad de unir covalentemente el iodo al BODIPY, lo que simplifica el trabajo sintético, evita posibles inconvenientes de toxicidad de los compuestos halogenados, y también, permite utilizar los BODIPYs dualmente, como fluoróforos para diagnóstico en imagen celular y como agentes fotosensibilizantes para PDI.

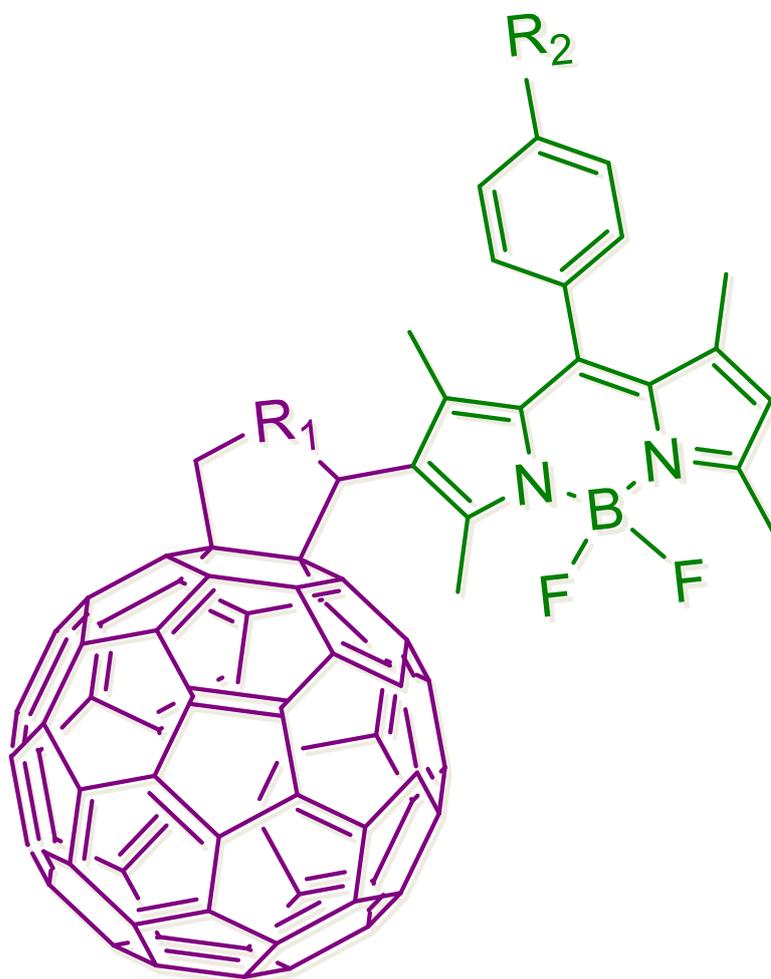
4.19. Díadas BODIPY-C₆₀ como fotosensibilizadores

Luego del estudio detallado de las propiedades de los BODIPYs sintetizados, procedimos a analizar estas estructuras como antenas captadoras de luz, unidas covalentemente a derivados del C₆₀. Para esto, elegimos utilizar el BDP2, ya que sus características fotofísicas, sobre todo el Φ_F , lo hacen más apropiado para actuar como molécula captadora de luz y dadora de energía.

Subsiguientemente, se procedió a realizar la síntesis de las díadas BDP-C₆₀, para luego, evaluar sus características espectroscópicas y propiedades fotodinámicas en solución. Por último, se estudiaron estas díadas como FS en PDI de *S. aureus*, evaluando la capacidad de las mismas para optimizar la acción fotodinámica del fullerenos C₆₀ por efecto antena.

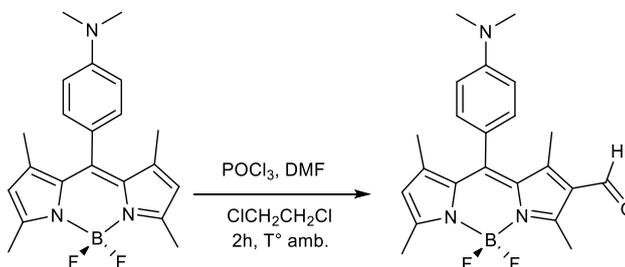
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Díadas de BODIPY-C₆₀ como fotosensibilizadores



4.20. Síntesis de díadas BODIPY-C₆₀

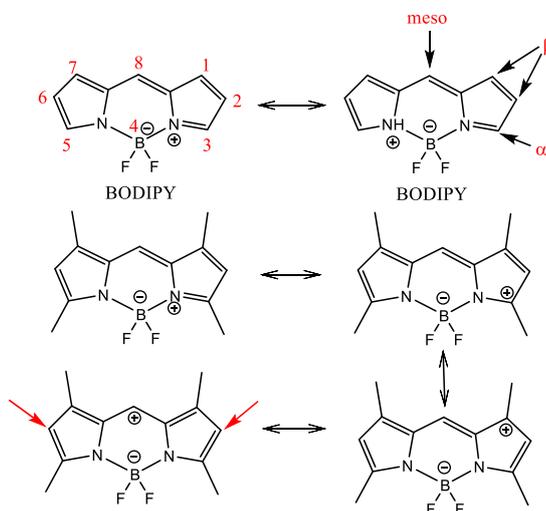
El primer paso sintético consistió en derivatizar el núcleo del BDP1, sintetizado mediante la metodología descrita en la Sección 3.4.2., y así hacerlo susceptible a la unión covalente con el derivado del C₆₀ (Esquema 59).



Esquema 59. Paso sintético a través de la reacción de Vilsmeier-Haack.

La síntesis se llevó a cabo mediante la reacción Vilsmeier-Haack, a partir de cloruro de fosforilo y DMF, en reflujo de dicloroetano. El producto BDP5 se obtuvo eficientemente, con un rendimiento del 89%.

Esta ruta sintética, se basa en un ataque electrofílico a los anillos pirrólicos. Como se observa en la Esquema 60, en las estructuras mesoméricas de BODIPY, las posiciones 2,6- (β -) del núcleo soportan menos la carga positiva, lo que las hace más susceptibles al ataque electrofílico.

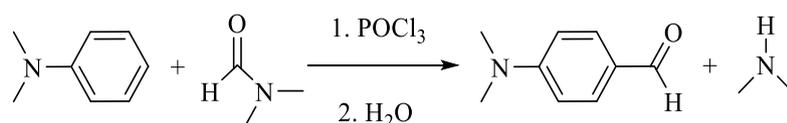


Esquema 60. Posiciones 2,6- (β -) del BODIPY más electrófilas.

La reacción Vilsmeier-Haack se ha utilizado en la síntesis de diversas moléculas, como tiofenos, índoles, bupirroles, porfirinas, clorinas y dipirrometano, siendo un enfoque que permite introducir eficientemente, distintos sustituyentes en posiciones específicas de

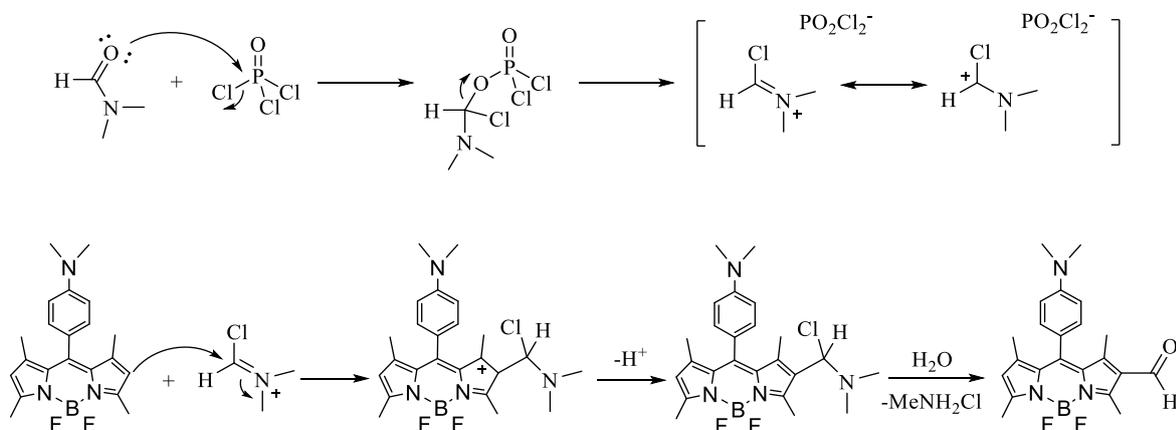
estas estructuras. Para BODIPYs, se reportó por primera vez en 2009, cuando Jiao *et al.* sintetizaron con excelentes rendimientos, una serie de β -formil-BODIPYs.²⁶⁵

La reacción general de Vilsmeier-Haack, involucra una amida sustituida con tricloruro de fosforilo y un areno activado. El producto obtenido es un aril aldehído o cetona, como se observa en la reacción del Esquema 61.^{268,394}



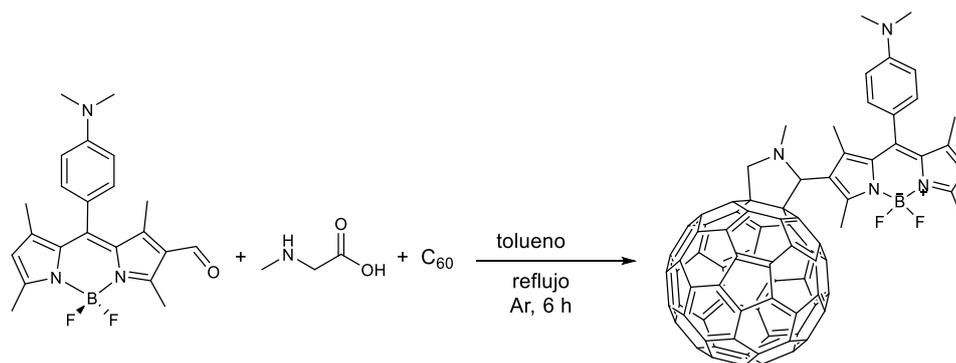
Esquema 61. Reacción de Vilsmeier-Haack.

El mecanismo de reacción indica que el agente formilante, conocido como complejo o reactivo de Vilsmeier, se forma *in situ* a partir de la amida sustituida, en este caso dimetilformamida, y tricloruro de fosforilo.³⁹⁵ Luego se produce una sustitución nucleofílica aromática al átomo de Cl en posición α a la amina, la cual es rápidamente hidrolizada, dando como producto su correspondiente cetona aromática o aldehído (Esquema 62).



Esquema 62. Mecanismo de reacción de Vilsmeier-Haack.

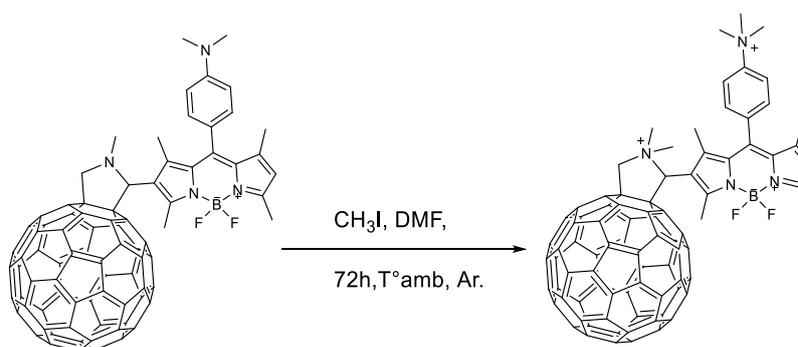
Una vez sintetizado y purificado BDP5, se procedió a realizar la unión con el fullereno C₆₀. Para esto, se utilizó la cicloadición 1,3-dipolar al C₆₀,^{170,179} descrita en la Sección 1.5.3. La reacción se llevó a cabo en tolueno anhídrido, a partir de *N*-metilglicina, fullereno C₆₀ y BDP5 (Esquema 63).



Esquema 63. Reacción de cicloadición 1,3-dipolar al C_{60} .

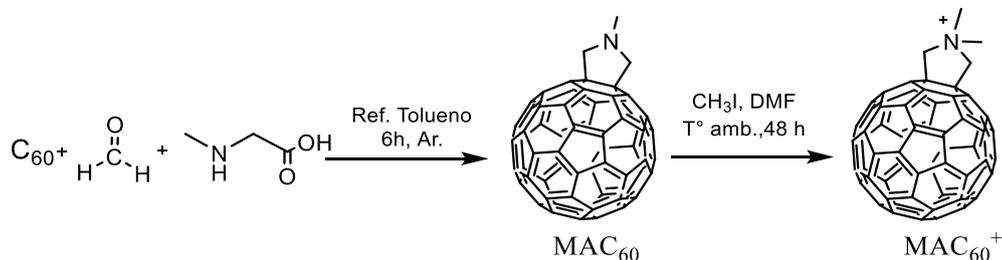
Mediante este procedimiento, y la posterior etapa de purificación, se obtuvo la díada BDP- C_{60} con un rendimiento del 34%.

Posteriormente, se realizó la metilación de BDP- C_{60} , con CH_3I como agente metilante. Esto, permitió obtener la díada dicatiónica, BDP- C_{60}^{2+} (Esquema 64).



Esquema 64. Metilación con CH_3I .

Por último, se llevó a cabo la síntesis de los derivados del C_{60} que conforman ambas díadas. También se utilizó la cicloadición 1,3-dipolar de iluro de azometino al C_{60} para sintetizar MC_{60} , y una metilación con CH_3I , para obtener el MAC_{60}^+ (Esquema 65).



Esquema 65. Síntesis de derivados del C_{60} .

Los compuestos MAC_{60} y MAC_{60}^+ fueron sintetizados y estudiados previamente por Huang *et al.*¹⁵⁹ En el presente trabajo, se utilizaron como referencias y como modelos

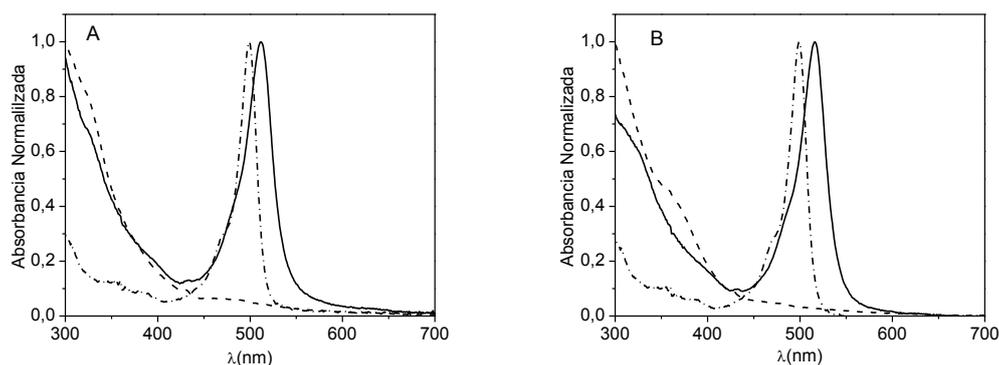


Figura 48. Espectros de absorción de UV-visible de (A) MAC_{60} (línea discontinua), BDP1 (línea discontinua y punto), BDP- C_{60} (línea continua) y (B) MAC_{60}^+ (línea discontinua), BDP2 (línea discontinua y punto), BDP- C_{60}^{2+} (línea continua) en DMF.

La absorción de ambas díadas en la región UV (300-400 nm) es mayor que la correspondiente a los BODIPYs, debido a la presencia del fullereno C_{60} . Este presenta bandas de absorción $\pi-\pi^*$ moderadamente fuertes en la región UV, absorciones bajas en la región visible y una banda de absorción débil alrededor de 710 nm. También se observa un pico agudo a ~ 430 nm en los espectros, característico de los derivados *N*-metilpirrolidinofullereno.^{183,188}

Como puede visualizarse, los espectros de las díadas son esencialmente una combinación lineal de los espectros de las estructuras individuales correspondientes, mostrando sólo diferencias en los máximos de longitud de onda. Así, los espectros de absorción son consistentes con una interacción débil entre sus partes estructurales en el estado fundamental, indicando que ambos cromóforos retienen sus identidades individuales, a pesar de estar unidos directamente, sin ningún separador de por medio. Un comportamiento similar se observó para otra díada constituida por BODIPY y C_{60} , también diseñado sin un puente conector entre dador y aceptor.³⁹⁶ Puede observarse que la presencia de la antena de BODIPY incrementa notoriamente la absorción del fotosensibilizador en la región verde del visible (Tabla 12), donde el coeficiente de extinción molar de fulleropirrolidina es inferior a $5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.¹⁸⁴

Por otro lado, los espectros de absorción de BDP- C_{60} y BDP- C_{60}^{2+} mostraron comportamientos opuestos con el cambio de polaridad del solvente (Figura 49). La díada dicatiónica mostró una fuerte agregación en tolueno, y una mejor solubilización como monómero en DMF. La díada sin carga, en cambio, presentó un comportamiento inverso.

Estas diferencias espectroscópicas con la polaridad del solvente, son consecuentes con las diferencias estructurales de ambas díadas.

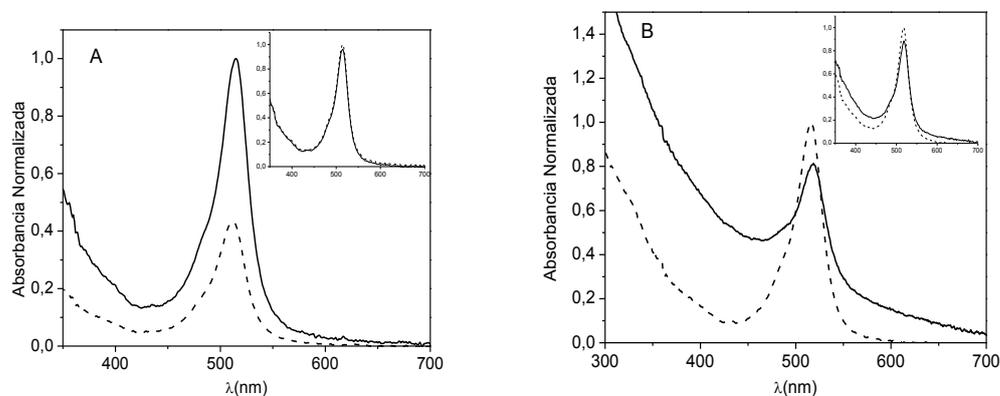


Figura 49. Espectros de absorción UV-visible de BDP-C₆₀ (A) y BDP-C₆₀²⁺ (B) en tolueno (línea continua) y DMF (línea discontinua). Inserto: Espectros de absorción en tolueno (línea continua) y tolueno/AOT (0,1 M)/agua (W₀=10) (línea discontinua).

En el medio micelar, para BDP-C₆₀ no se observaron cambios con respecto al espectro en tolueno. En cambio, para BDP-C₆₀²⁺, se observó una menor agregación, indicando que la interacción con el sistema microheterogéneo incrementa la solubilización de la díada como monómero. Este comportamiento con micelas inversas de AOT, también se encontró en los estudios espectroscópicos de una díada catiónica de porfirina-C₆₀.²²⁹

Los espectros de emisión de fluorescencia de las dos díadas se compararon con los espectros de los BODIPYs modelos (BDP1 y BDP2) en DMF y tolueno, excitando las muestras a 480 nm (Figura 50). Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) se calcularon por comparación con BDP1 como referencia (Tabla 12). Ambas díadas muestran una emisión muy débil, lo que indica una importante desactivación del estado excitado singlete del BODIPY por parte del fullereno C₆₀ unido covalentemente. La eficiencia de la desactivación para cada sistema dador-aceptor, fue mayor a 0,90 en ambos solventes. Estos valores son análogos a los reportados para otras díadas similares.^{300,396}

La emisión de BDP-C₆₀ se encuentra centrada alrededor de 545 nm en ambos solventes, evidenciando un corrimiento de Stokes de ~25 nm. En tolueno, también se observa la aparición de la banda a 710 nm, característica de estos derivados del C₆₀.¹⁸⁵ Esto sugiere, que en tolueno hay una vía de relajación principalmente desde el estado singlete excitado del BODIPY al del C₆₀ por PET. En un solvente más polar, como DMF, no se observa una emisión significativa del C₆₀. En este caso, puede que esté presente un proceso

PeT del BODIPY al C_{60} , con la generación de un estado de separación de cargas ($BDP^{+}\cdot-C_{60}^{-\cdot}$), competitivo con la PET. Las variaciones en la emisión del C_{60} , constitutivo de la díada, con la polaridad del medio también se encontró para díadas porfirina- C_{60} , con presencia de PeT favorecido en el solvente más polar.^{397,398}

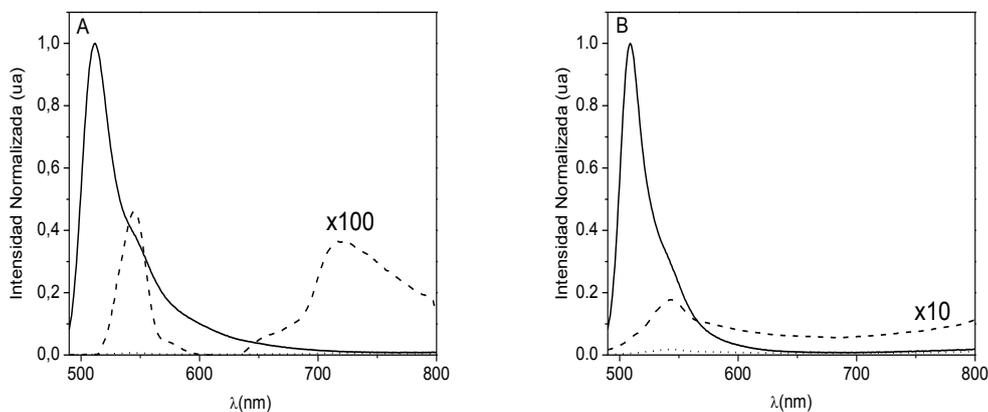


Figura 50. Espectros de emisión de fluorescencia de BDP1 (línea continua), BDP- C_{60} (línea de puntos), BDP- C_{60} (x100, x10) (línea discontinua) en tolueno (A) y DMF (B).

Para $BDP-C_{60}^{2+}$, la emisión se centra aproximadamente a 540 nm, con un corrimiento de Stokes similar al de la díada neutra. También se presenta un comportamiento análogo al de $BDP-C_{60}$, con la aparición de la emisión del C_{60} en el medio de menor polaridad, como posible indicativo de la presencia de un proceso PeT (Figura 51).

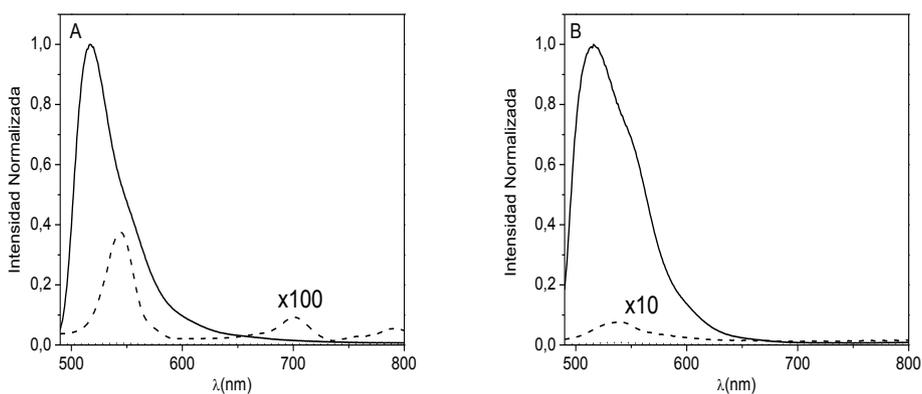


Figura 51. Espectros de emisión de fluorescencia de BDP2 (línea continua), BDP- C_{60}^{2+} (línea de puntos), BDP- C_{60}^{2+} (x100, x10) (línea discontinua) en tolueno (A) y DMF (B)

Es posible que el grupo *N,N*-dimetilanimilina del BODIPY en BDP- C_{60} facilite la transferencia de electrones al C_{60} . El rendimiento de fluorescencia de BDP1 (Tabla 12) varía con la polaridad del disolvente, siendo mucho menor en DMF ($\approx 0,03$) que en tolueno ($\approx 0,3$). Esta disminución en el disolvente más polar puede deberse a la aparición de PeT causada por la presencia del grupo dador de electrones hacia el núcleo de BODIPY.²⁸³

Para evaluar este fenómeno en BDP- C_{60} , se registraron los espectros de absorción UV-Vis y fluorescencia con adición de TFA (Figura 52). La protonación del grupo *N,N*-dimetilanimilina en la díada modifica moderadamente la absorción y la emisión de la antena.

A medida que se agregó TFA la banda de absorción a 500 nm aumenta de manera moderada, mostrando un corrimiento hipsocrómico muy pequeño. Paralelamente, se visualiza un aumento en la absorción en la región UV (Figura 52A). Por otra parte, la emisión de fluorescencia de la unidad de BODIPY aumenta proporcionalmente al volumen de ácido agregado (Figura 52B). Junto con el aumento de intensidad se observó un ensanchamiento batocrómico de la banda de emisión. Estos resultados obtenidos podrían estar indicando una disminución de la desactivación del estado singlete excitado del BODIPY por PeT, y en paralelo un aumento de la PET hacia la C_{60} cuando se produce la protonación del grupo amina. Estos resultados serán verificados y discutidos en detalle a continuación.

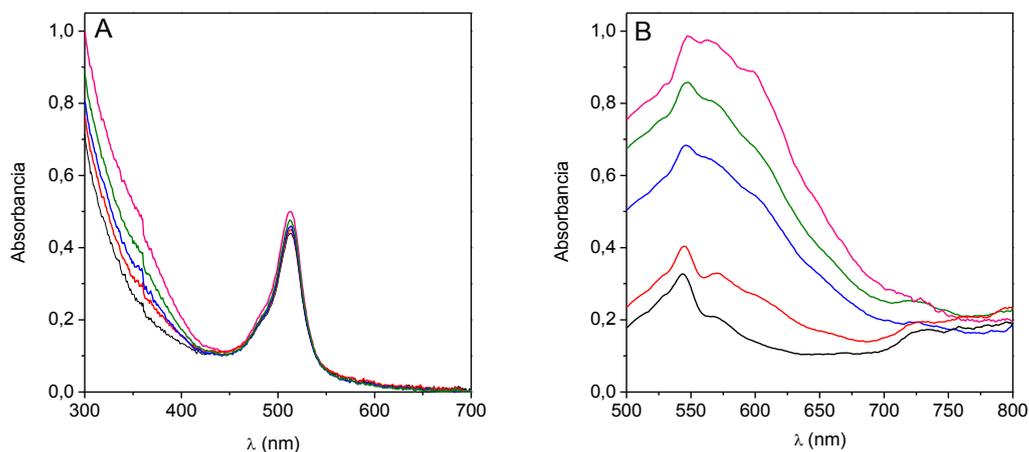


Figura 52. Espectros de absorción (A) y emisión de fluorescencia (B) de BDP- C_{60} con adición de 0 μ l (línea negra), 2 μ l (línea roja), 5 μ l (línea azul), 10 μ l (línea verde) and 20 μ l (línea fucsia) de TFA en DMF.

Tabla 12. Parámetros espectroscópicos y rendimientos cuánticos de fluorescencias (Φ_F) de BDP1, BDP2, BDP-C₆₀, BDP-C₆₀²⁺.

Parámetros	Medio	BDP1	BDP2	BDP-C ₆₀	BDP-C ₆₀ ²⁺
$\lambda_{\max}^{\text{Abs}}$ (nm)	DMF	499	502	512	516
$\lambda_{\max}^{\text{Abs}}$ (nm)	Tolueno	502	505	515	518
ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	DMF	90.000	85.000	80.000	78.000
$\lambda_{\max}^{\text{Em}}$ (nm)	DMF	509	516	544	539
Φ_F	DMF	0,03±0,02	0,30±0,02	(2,5±0,2)x10 ⁻³	(3,6±0,2)x10 ⁻³
$\lambda_{\max}^{\text{Em}}$ (nm)	Tolueno	512	517	546/718	544/700
Φ_F	Tolueno	0,23±0,02	0,24±0,02	(3,1±0,3)x10 ⁻³	(1,9±0,2)x10 ⁻³

4.22. Espectroscopía de especies transitorias resuelta en el tiempo

Con el fin de estudiar el estado triplete excitado de las díadas se realizaron mediciones de absorción de especies transitorias empleando láser flash fotólisis excitando con pulso con un láser a 532 nm. A esta longitud de onda, la absorción puede ser asignada preferentemente a la antena de BODIPY, mientras que la correspondiente a la unidad C₆₀ puede ser despreciada, como puede observarse en los estudios espectroscópicos mostrados previamente.

En tolueno, la excitación del BODIPY en BDP-C₆₀, da lugar a la formación de especies transitorias que presentan absorciones en el rango de 320-450 nm, con un máximo próximo a 360 nm, y una banda centrada alrededor de 700 nm (Figura 53A). Estas absorciones son las características del estado excitado triplete del C₆₀ (³C₆₀*).³⁹⁹

Lo observado confirma la presencia de un proceso PET del ¹BDP* al ¹C₆₀*, que por ISC produce el ³C₆₀*. Además, se observó el blanqueo del estado fundamental de la antena a 510 nm. Esto indica la formación de una mezcla en equilibrio de los estados triplete, aunque la mayor parte se localiza en la unidad del C₆₀. Los decaimientos a las longitudes de onda máximas se ajustaron mediante una función exponencial de segundo orden, obteniendo dos tiempos de vida ($\tau^3 \sim 21 \mu\text{s}$ y $4 \mu\text{s}$) (Figura 53B). El tiempo de vida más largo puede ser asignado al estado triplete de la fulleropirrolidina, debido a su cercanía con

el tiempo de vida del fullereno C_{60} .^{190,400} En estudios anteriores con un sistema BODIPY- C_{60} que presenta características espectroscópicas similares a BDP- C_{60} , también se encontró que el estado triplete no se localiza exclusivamente en el C_{60} , sino que también se encuentra en la estructura de la antena. Los investigadores encontraron que, debido a que el $^3C_{60}^*$ sobrevive un tiempo razonable, la transferencia de energía T_1-T_1 puede ocurrir aunque sea termodinámicamente desfavorable. Este comportamiento denominado mecanismo de "ping pong" también se observó en díadas C_{60} y perilenbisimida, como antena captadora de luz visible.²¹⁵

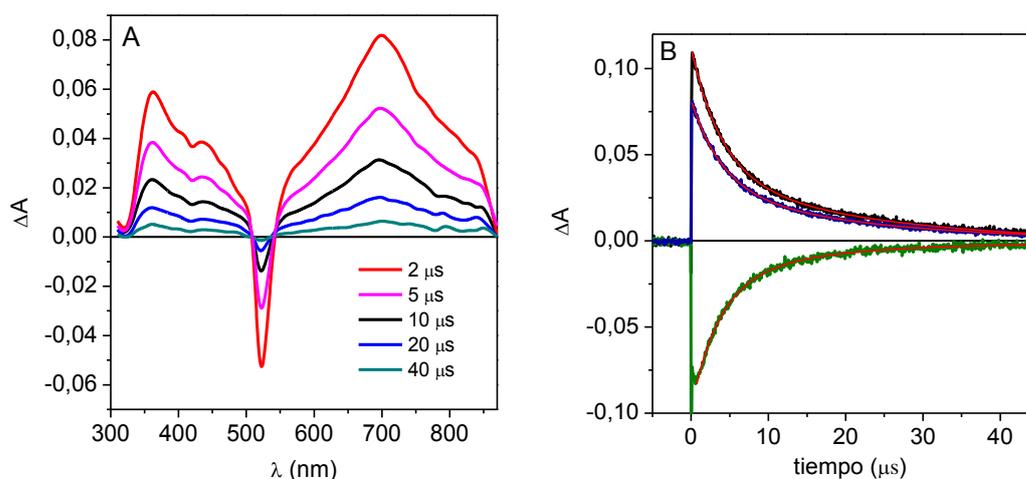


Figura 53. (A) Espectro de absorción de especies transitorias de BDP- C_{60} en solución de tolueno saturada en argón, determinado a diferentes tiempos, luego de excitación con pulso de laser a 532 nm. (B) Perfiles de decaimiento de absorción de BDP- C_{60} , a 360 nm (línea azul), 520 nm (línea verde) y 700 nm (línea negra). Ajuste exponencial de los perfiles de decaimiento (línea roja).

En DMF la absorción de los estados transitorios decae considerablemente (Figura 54), lo que podría estar indicando una preponderante formación del $BDP^{+}-C_{60}^{-}$ favorecida en el ambiente más polar y en competencia con PET.

En este caso, $^3BDP^*$ y $^3C_{60}^*$ también pueden formarse a partir del $BDP^{+}-C_{60}^{-}$ por recombinación de carga. Recientemente, una díada BODIPY- C_{60} con un puente de acetato de fenilo entre ambas unidades, mostró que en acetonitrilo el $^1BODIPY^*$ se desactiva por formación de estado de separación de carga, y que $^3C_{60}^*$ y $^3BODIPY^*$ se pueblan por recombinación de carga.⁴⁰¹

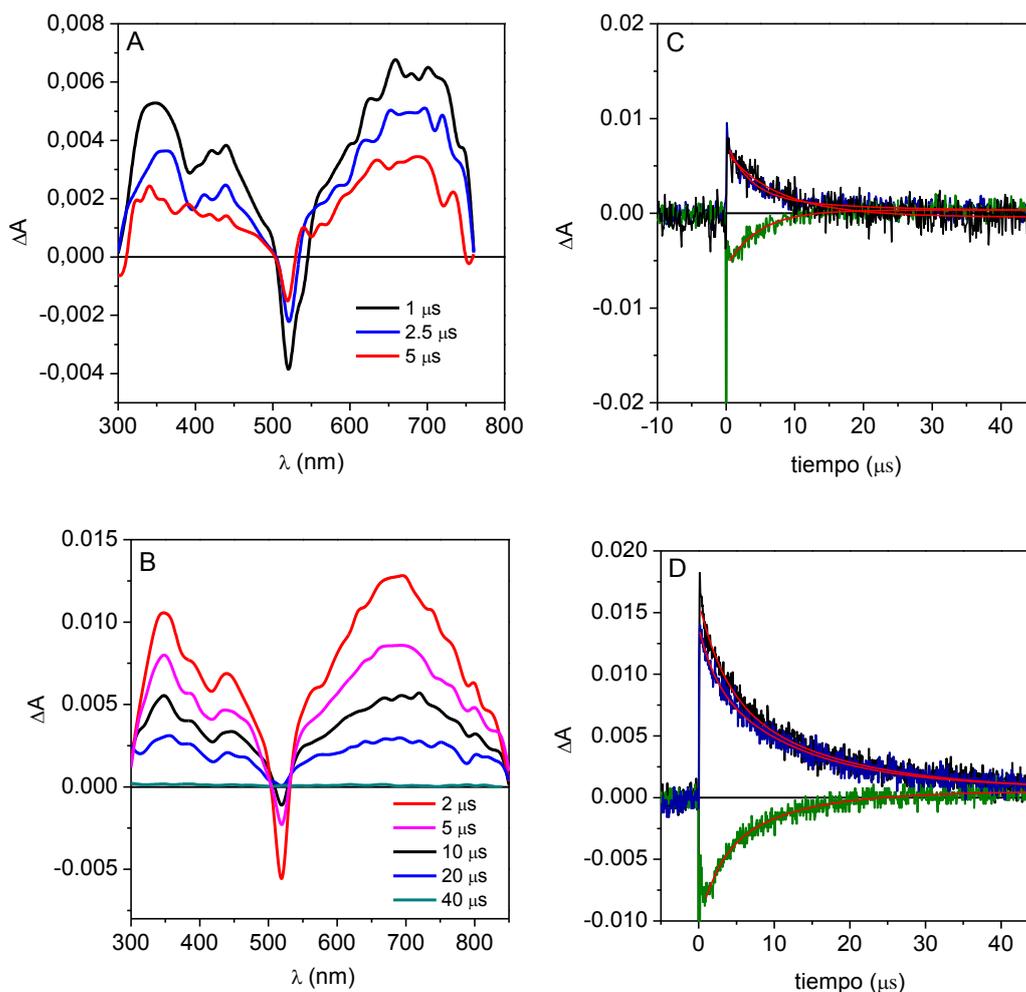


Figura 54. Espectro de absorción de transientes de BDP-C₆₀ en solución saturada en argón, determinado a diferentes tiempos luego de excitación del pulso laser a 532 nm en DMF (A) and DMF/TFA (1%) (B). Perfiles de decaimiento de absorción de BDP-C₆₀, a 350 nm (línea azul), 520 nm (línea verde) y 700 nm (línea negra). Ajuste exponencial de los perfiles de decaimiento (línea roja) en DMF (C) y DMF/TFA (1%) (D).

Para evaluar las contribuciones de cada fotoproceso en la desactivación de ¹BDP*, también se estudió la absorción de especies transitorias resuelta en el tiempo en DMF con adición de TFA (1%). En estas condiciones se produce un aumento significativo de las intensidades de absorción de triplete, observándose claramente las bandas características del C₆₀ (Figura 54B). Este fenómeno estaría indicando que por medio de la protonación del grupo amina del BODIPY, la PeT es inhibida y el proceso PET es favorecido hacia el fullereno. Anteriormente, *Huang et al* estudiaron la formación de estados triplete para diadas de *N,N*-dimetilaminostiril BODIPY-C₆₀. También encontraron que la protonación

de los grupos amina favorece la formación de ${}^3\text{C}_{60}^*$, permitiendo modificar la contribución de cada proceso fotoinducido con la variación de pH.³⁰¹

Los espectros de absorción de especies transitorias de la díada dicatiónica BDP- C_{60}^{2+} se registraron en las mismas condiciones experimentales que la díada sin carga (Figura 55A). En tolueno se observó un comportamiento similar a BDP- C_{60} , con aparición de las bandas características del ${}^3\text{C}_{60}^*$ centradas en 360 nm y 700 nm. También se observa la banda del blanqueamiento del estado fundamental del BODIPY, indicando formación de ambos estados triplete con mayor localización en el C_{60} . Los decaimientos se ajustaron a través de una función exponencial de segundo orden (Figura 55B), obteniéndose dos tiempos de vida ($\tau^3 \sim 17 \mu\text{s}$ and $7 \mu\text{s}$).

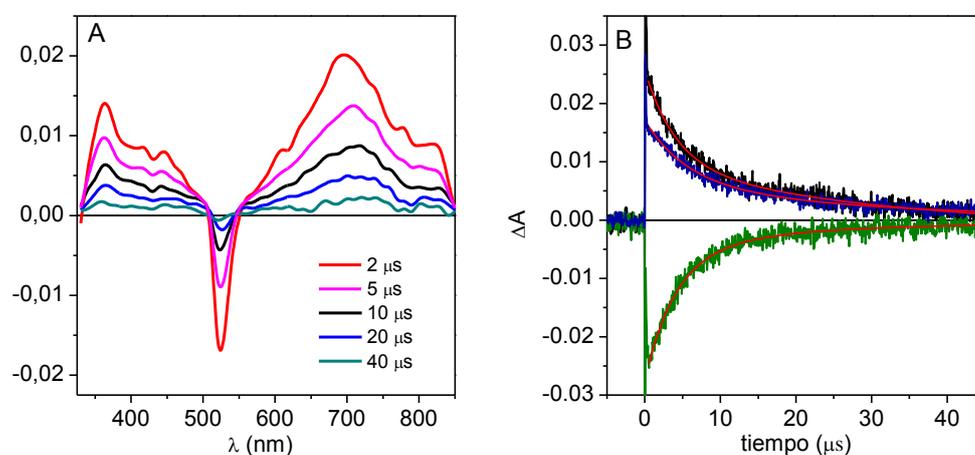


Figura 55. (A) Espectro de absorción de especies transitorias de BDP- C_{60}^{2+} en solución de tolueno saturada en argón, determinado a diferentes tiempos, luego de excitación con pulso de laser a 532 nm. (B) Perfiles de decaimiento de absorción de BDP- C_{60}^{2+} , a 360 nm (línea azul), 520 nm (línea verde) y 700 nm (línea negra). Ajuste exponencial de los perfiles de decaimiento (línea roja).

En DMF y en iguales condiciones experimentales que en tolueno, no se observó formación de especies transitorias, evidenciando una preponderancia del proceso de PeT con formación del estado de separación de carga favorecido en el medio más polar.

4.23. Cálculos Computacionales

Con el fin de visualizar las geometrías y estructuras electrónicas de ambas díadas, se realizaron cálculos computacionales mediante la base B3LYP / 3-21G (*) con Gaussian 0326.

En la Figura 56A se muestra en la estructura optimizada de la díada BDP-C₆₀. A pesar de la ausencia de un puente conector, no se observan restricciones estéricas entre las entidades BODIPY y C₆₀. La distancia encontrada de centro a centro entre el átomo de boro y el centro del fullereno es de ~9,00 Å, indicando un estrecha separación entre el dador y aceptor.

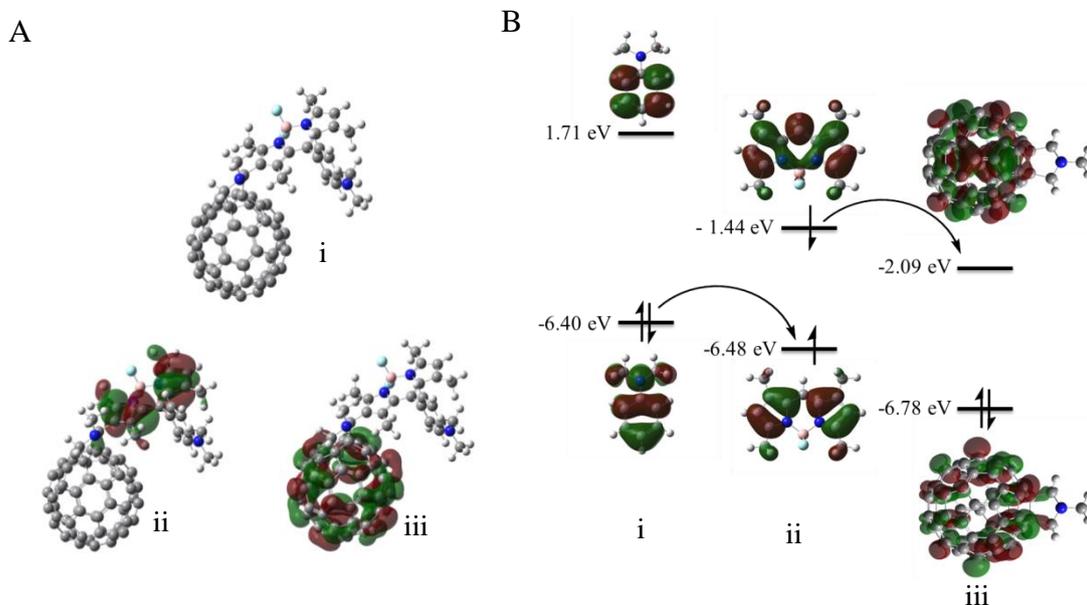


Figura 56. (A) Estructura optimizada (i) orbital molecular ocupado de menor energía, HOMO (ii) y orbital molecular ocupado de mayor energía. LUMO (iii) de BDP-C₆₀. (B) Diagrama de los orbitales moleculares y niveles de energía del estado excitado de (ii) BODIPY y estado fundamental de (i) *N,N*-dimetilanilina y (iii) *N*-metilfulleropirrolidina. Todos los cálculos se realizaron por DFT en el nivel CAM-B3LYP/6-31+G(d) utilizando Gaussian 09.

En el caso de BDP-C₆₀, los cálculos de densidad electrónica muestran que el HOMO se localizó preferentemente en la estructura del BODIPY, mientras que el LUMO se encuentra en la unidad del fullereno C₆₀, confirmando la presencia de un proceso PeT desde el BODIPY al C₆₀. Además, mediante el mismo método, se calculó la densidad electrónica de cada unidad constitutiva del BDP-C₆₀. *N,N*-dimetilanilina y *N*-metilfulleropirrolidina se calcularon en su estado fundamental y la unidad de BODIPY en su estado excitado (Figura 56B), con el objetivo de evaluar el comportamiento de la díada cuando el BODIPY es excitado selectivamente. Las densidades electrónicas y los niveles de energía encontrados muestran que el proceso PeT hacia el C₆₀ es posible que se inicie desde el grupo amina dador. Este resultado refuerza lo obtenido en los estudios espectroscópicos de especies transitorias, donde se observó una potenciación de PET en

medio ácido, indicando que la protonación del grupo amino en el BODIPY inhibe el proceso PeT. Esta inhibición puede deberse al hecho de que cuando el grupo amina se protona, la energía del estado fundamental del compuesto aumenta como se observa en el cambio hipsocrómico en los espectros de absorción. Esta nueva energía puede estar por encima del nivel de energía del grupo amina, y por lo tanto la transferencia electrónica está prohibida.⁴⁰²

Los mismos cálculos se realizaron para BDP-C₆₀²⁺ y se observó que la densidad electrónica se localiza tanto en el BODIPY como en el C₆₀ (Figura 57). Sin embargo, dicha localización se distribuye desigualmente en ambas unidades. En el HOMO se observa una mayor contribución a la densidad electrónica por parte del BODIPY, y en el LUMO de la estructura del fullereno C₆₀. Esto indica que sigue existiendo un proceso de ET de la unidad del BODIPY hacia el C₆₀, a pesar de la metilación del grupo amina. Estudios previos de estructuras similares también han demostrado que el BODIPY puede actuar como dador de electrones hacia la esfera del C₆₀.^{306,396}

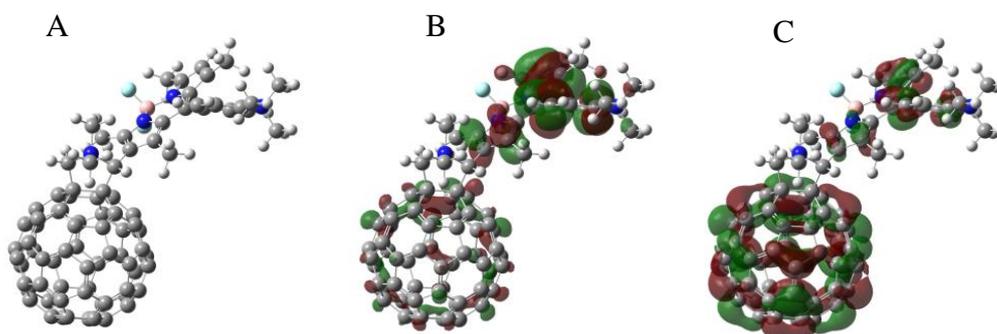


Figura 57. Estructura optimizada (A), orbital molecular ocupado de menor energía, HOMO (B) y orbital molecular no ocupado de más baja energía, LUMO (C) de BDP-C₆₀²⁺.

4.25. Estudios electroquímicos

Las propiedades electroquímicas de BDP-C₆₀ se estudiaron por voltametría cíclica (VC) en *o*-diclorobenceno (*o*-DCB) a temperatura ambiente. Vale aclarar que también se realizaron estudios electroquímicos para la díada catiónica, pero estos no arrojaron resultados satisfactorios por problemas de solubilidad de la estructura en distintos solventes.

Las curvas voltamétricas cíclicas de BDP1 (Figura 58A) y MAC₆₀ (Figura 58B) también se obtuvieron en las mismas condiciones experimentales, con el fin de utilizarlas como referencias. Los potenciales de oxidación y reducción obtenidos para cada estructura

se muestran en la Tabla 13. El voltagrama obtenido para BDP-C₆₀ se muestra en la Figura 58C.

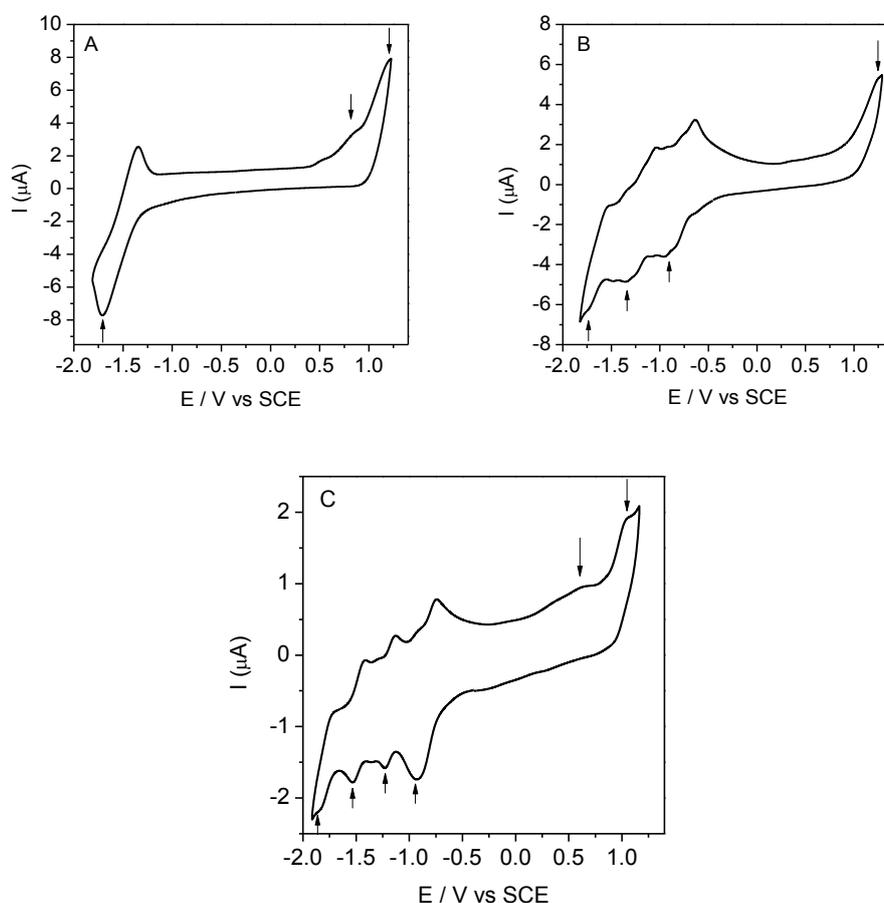


Figura 58. Curvas de voltametría cíclica de (A) BDP1, (B) MAC₆₀ y (C) BDP-C₆₀. 0.6 mM en *o*-DCB conteniendo 0,1 M de TBABF₄, usando un electrodo de trabajo de Pt. Velocidad de barrido: 100 mV/s.

Para BDP-C₆₀ pueden observarse cuatro procesos de reducción reversibles en la zona de potencial negativo. Tres de estos picos (-0,93, -1,23 y -1,53 V) pueden asignarse a las reducciones características de la *N*-metilfulleropirrolidina (Figura 58B).¹⁸⁴ El otro pico a -1,83 V puede deberse a la reducción de la unidad de BODIPY (Figura 58A). En la región anódica, se observan dos oxidaciones irreversibles a 0,64 y 1,05 V. Si se comparan con los estudios voltamétricos de BDP1, tales picos pueden asignarse a la antena de BODIPY, correspondiendo el primer potencial de oxidación al grupo dimetilamino.⁴⁰³ Esto es congruente con lo que se observó anteriormente en los cálculos computacionales (Figura 57), donde el par de electrones solitarios en el grupo amino se localiza energéticamente entre el HOMO y el LUMO del BODIPY.

Tabla 13. Potenciales redox de MAC₆₀, BDP1 and BDP-C₆₀. Los potenciales anódicos y catiónicos son reportados vs SCE.

Parámetros	E _{ox} (V) vs SCE	E _{red} (V) vs SCE
BDP1	0,80/1,12	-1,72
MAC ₆₀	1,25	-0,93/-1,32/-1,68
BDP-C ₆₀	0,64/1,05	-0,93/-1,23/-1,53/-1,83

Con el objetivo de evaluar la factibilidad de la transferencia de electrones desde el BODIPY al fullereno C₆₀, se calcularon las energías libres de separación de carga (ΔG_{CS}) y de recombinación de carga (formación de CTS) (ΔG_{CR}), utilizando las ecuaciones 19 y 20 derivadas del enfoque de Rehm-Weller:⁴⁰⁴

$$-\Delta G_{CS} = \Delta E_{0-0} - (-\Delta G_{CR}) \quad (19)$$

$$-\Delta G_{CR} = (E_{OX} - E_{RED}) + \Delta G_S \quad (20)$$

Donde, E_{ox} y E_{red} representan el primer potencial de oxidación del dador de electrones (BODIPY) y el potencial de reducción del aceptor de electrones (C₆₀), respectivamente. ΔE_{0-0} es la energía del estado excitado más bajo del fotosensibilizador (2,27 eV para ¹BDP *), y ΔG_S se refiere a la energía Coulúmbica estática en *o*-DCB, calculada utilizando el "modelo de continuo dieléctrico" de acuerdo con a la Ecuación (21):⁴⁰⁵

$$-\Delta G_S = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 R_{CC}\epsilon_S} \quad (21)$$

Donde, los símbolos ϵ_0 y ϵ_R representan la permitividad del vacío y la constante dieléctrica del disolvente utilizado, respectivamente. R_{CC} es la distancia de centro a centro entre el dador y el aceptor, calculada para la estructura optimizada en la Figura 57A (R_{CC} = 9,00 Å). Se encontró que el ΔG_S calculado presenta un valor de -0,16 eV para este sistema dador-aceptor. A partir de estos cálculos, se obtuvieron valores de -0,86 eV y -1,41 eV para ΔG_{CS} y ΔG_{CR} en DCB, respectivamente.

El valor negativo obtenido para ΔG_{CS} , sugiere que la transferencia de electrones es termodinámicamente posible en este disolvente. Además, considerando que el *o*-DCB es un disolvente con una polaridad intermedia entre el tolueno y el DMF, podría estimarse que en el solvente de mayor polaridad el proceso PeT puede potenciarse, y en tolueno podría esperarse que ocurra un comportamiento inverso, en congruencia a lo observado en la espectroscopia de especies transitorias.

4.26. Actividad fotodinámica

4.26.1. Producción de $O_2(^1\Delta_g)$

La producción de $O_2(^1\Delta_g)$ por parte de las díadas se evaluó utilizando DPBF como sustrato fotooxidable, mediante la metodología descrita en la Sección 3.9.1. Se calculó el Φ_{Δ} en dos solventes de distinta polaridad (tolueno y DMF), y en medio micelar de tolueno/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$). Los valores de Φ_{Δ} en micelas inversas de AOT se calcularon utilizando como referencia el fullereno C_{60} , el cual se solubiliza principalmente en la fase externa de tolueno. Además se calcularon los rendimientos para las moléculas individuales: MAC_{60} , MAC_{60}^+ , BDP1 y BDP2. Toda las soluciones se irradiaron en condiciones aeróbicas a 500 nm. La descomposición del DPBF se evaluó siguiendo la disminución de su banda de absorción a 415 nm (Figura 59).

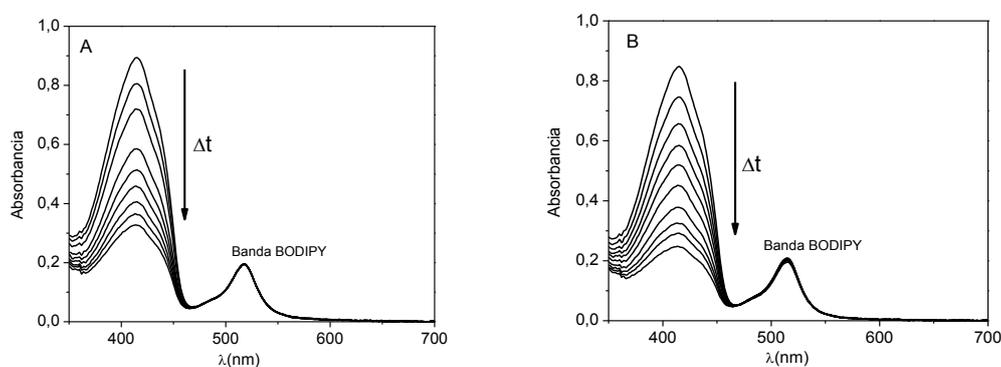


Figura 59. Descomposición de DPBF sensibilizada por BDP- C_{60} en DMF (A) y BDP- C_{60}^{2+} en tolueno/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$) (B), irradiado con luz monocromática ($\lambda_{irr}=500$ nm).

Las cinéticas obtenidas en tolueno y DMF se muestran en la Figura 60. En tolueno, la díada BDP- C_{60} descompuso a DPBF con relevante eficiencia, siendo mayor a la descomposición generada por MAC_{60} y BDP1. El $\Phi_{\Delta} \sim 0,9$ obtenido para la díada neutra es similar al reportado para otras sistemas dador-aceptor con estructuras similares.³⁰⁰ En

DMF, BDP-C₆₀ también resultó eficiente, mostrando un rendimiento de $\Phi_{\Delta} \sim 0,56$ (Tabla 14). Es importante remarcar que cuando se irradia a 500 nm donde absorbe específicamente el BODIPY, el BDP1 presenta un escasa producción de O₂(¹Δ_g), sin embargo cuando está unido al C₆₀ muestra una generación elevada de O₂(¹Δ_g), confirmando el efecto antena.

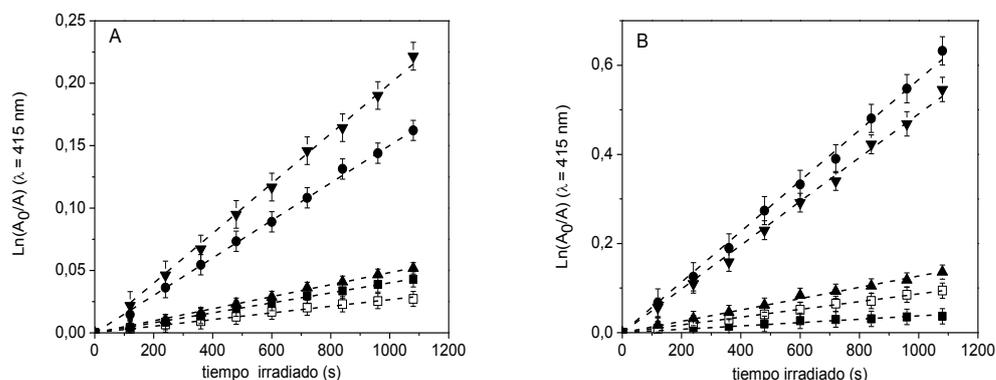


Figura 60. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de DPBF fotosensibilizada por MC₆₀ (●), BDP1 (■), BDP2 (□), BDP-C₆₀ (▼) y BDP-C₆₀²⁺ (▲), en tolueno (A) DMF (B). $\lambda_{irr}=500$ nm.

Tabla 14. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de DPBF (k_{obs}^{DPBF}) y rendimientos cuánticos de oxígeno molecular singlete (Φ_{Δ}).

Compuesto	k_{obs} (s ⁻¹) Tolueno	Φ_{Δ}	k_{obs} (s ⁻¹) DMF	Φ_{Δ}
BDP1	(4,00±0,03)x 10 ⁻⁵	0,18±0,02	(3,77±0,01)x 10 ⁻⁵	0,03±0,04
BDP2	(2,66±0,04)x 10 ⁻⁵	0,12±0,03	(8,69±0,07)x 10 ⁻⁵	0,07±0,03
MAC ₆₀	(1,50±0,02)x 10 ⁻⁴	0,68±0,01	(5,68±0,05)x 10 ⁻⁴	0,65±0,02
BDP-C ₆₀	(1,99±0,02)x 10 ⁻⁴	0,90±0,02	(4,91±0,05)x 10 ⁻⁴	0,56±0,03
BDP-C ₆₀ ²⁺	(4,82±0,04)x 10 ⁻⁵	0,22±0,02	(1,27±0,01)x 10 ⁻⁴	0,15±0,02

Φ_{Δ} (BDP1) se calculó con BDP2 como referencia.

Φ_{Δ} : MC₆₀, BDP-C₆₀, BDP-C₆₀²⁺ se calcularon con C₆₀ como referencia ($\Phi_{\Delta}=1$).¹⁸⁸

MAC₆₀⁺ no generó O₂(¹Δ_g) en tolueno y DMF.

La disminución del rendimiento cuántico de generación O₂(¹Δ_g) en DMF respecto al obtenido en tolueno, puede deberse, a la presencia del proceso de PET, favorecido en el medio más polar, desde el grupo amino del anillo aromático del BODIPY. Este proceso

fotoinducido compite con la transferencia de energía hacia el C_{60} , disminuyendo en consecuencia la producción de $O_2(^1\Delta_g)$.

La díada catiónica mostró escasa fotodescomposición del sustrato en tolueno ($\Phi_{\Delta}\sim 0,22$) y en DMF ($\Phi_{\Delta}\sim 0,15$). Sin embargo, cuando $BDP-C_{60}^{2+}$ se evaluó en el medio micelar, se observó un notorio incremento en la fotodescomposición de DPBF ($\Phi_{\Delta}\sim 0,60$) (Figura 61).

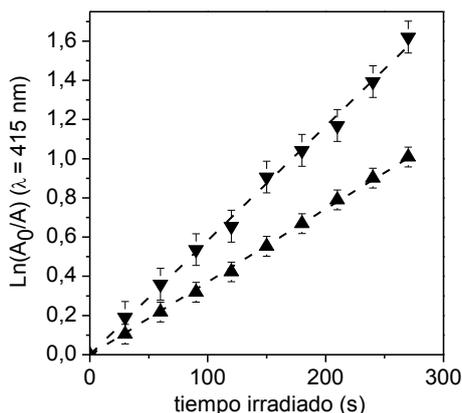


Figura 61. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de DPBF fotosensibilizada por BDP- C_{60} (▼) y BDP- C_{60}^{2+} (▲), en tolueno/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$).

Esto puede deberse, a que las micelas inversas ayudan a desagregar a la díada catiónica, aumentando la actividad fotodinámica. La díada neutra no mostró un cambio considerable del Φ_{Δ} en el medio micelar, lo cual indica que la misma no interacciona fuertemente con las micelas, localizándose principalmente en el tolueno.

En estudios anteriores, díadas de fluoreno- C_{60} se utilizaron para la fotosensibilización de $O_2(^1\Delta_g)$ pero las absorciones principales de dicha estructura se localizan más hacia el azul y presentan menor coeficientes de extinción molar ($20000-40000 M^{-1}cm^{-1}$).^{218,232} Recientemente, díadas de porfirina- C_{60} con absorción principal en la región azul también se evaluaron en la generación de $O_2(^1\Delta_g)$.²²⁹ Una díada no cargada mostró menor producción en comparación a BDP- C_{60} , presentando un rendimiento de $\Phi_{\Delta}\sim 0,56$ en tolueno y $\Phi_{\Delta}\sim 0,01$ en DMF. Para la díada catiónica se observó una escasa producción de $O_2(^1\Delta_g)$ en medios homogéneos, pero se observó un incremento en la generación en un medio microheterogéneo conformado por micelas de AOT, similar a lo encontrado para BDP- C_{60}^{2+} .

Otros sistemas BODIPY-C₆₀ se estudiaron como fotosensibilizadores en la fotooxidación de 1,5-dihidroxi-naftaleno, mostrando Φ_{Δ} similar al encontrado para BDP-C₆₀.^{298,406} Una estructura con características semejantes a BDP-C₆₀, pero con un puente de fenilo entre el BODIPY y fulleropirrolidina exhibió una producción de O₂(¹ Δ_g) análoga a nuestro sistema.³⁰⁰

Para profundizar en el estudio de las propiedades fotodinámicas de las díadas, se evaluó la fotodescomposición de DPBF en DMF conteniendo TFA (2% v/v). A partir de los gráficos semilogarítmicos obtenidos (Figura 62), se calcularon los valores de k_{obs} y Φ_{Δ} (Tabla 15).

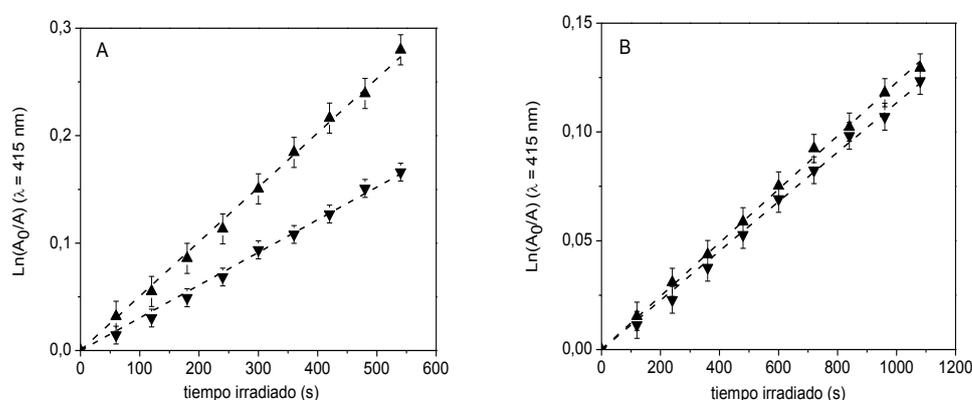


Figura 62. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de DPBF fotosensibilizada por BDP-C₆₀ (A) y BDP-C₆₀²⁺ (B) en DMF (▼) y DMF/TFA(2%) (▲).

Tabla 15. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de DPBF (k_{obs}^{DPBF}) y rendimientos cuánticos de oxígeno molecular singlete (Φ_{Δ}) en tolueno/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$) y DMF/TFA (2% v/v).

Parámetros	Medio	BDP-C ₆₀	BDP-C ₆₀ ²⁺
k_{obs}^{DPBF} (s ⁻¹)	AOT ^a	(5,83±0,03)x 10 ⁻³	(3,72±0,02)x 10 ⁻³
Φ_{Δ}^b	AOT	0,85±0,02	0,57±0,02
k_{obs}^{DPBF} (s ⁻¹)	DMF/TFA (1%)	(5,06±0,05)x 10 ⁻⁴	(1,23±0,05)x 10 ⁻⁴
Φ_{Δ}	DMF/TFA (1%)	0,93±0,02	0,15±0,02

a. Tolueno/AOT(0,1M)/agua ($W_0=10$)

b. Φ_{Δ} (AOT) se calcularon con C₆₀ en tolueno como referencia (6,83±0,02)x10⁻³, $\Phi_{\Delta}=1$)

De los resultados obtenidos puede observarse, que la presencia de TFA en el medio incrementa considerablemente la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ de la díada BDP-C₆₀. El Φ_Δ alcanza un valor similar al obtenido para esta díada en tolueno. En cambio, en la fotooxidación por parte de BDP-C₆₀²⁺ no se observan modificaciones significativas con la presencia de TFA. Lo observado es congruente con lo discutido en los estudios espectroscópicos de especies transitorias en presencia de TFA, y puede explicarse considerando la protonación del grupo *N,N*-dimetilnilina de BDP-C₆₀, ocasionada por la disminución del pH. Cuando se protona el grupo amino dador de electrones, se inhibe PeT, y paralelamente se incrementa el proceso PET, el cual desemboca en el considerable aumento de la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ observado. Un comportamiento similar se observó para otras díadas de BODIPYs y C₆₀ conjugados, que también presentan grupos aminas libres.^{301,407}

El incremento o la activación de la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ con la presencia de alguna señal externa, resulta de gran interés para potenciar la selectividad de los FS.⁴⁰⁸ Por ejemplo, en entornos tumorales, es conocido que el pH es más ácido en relación a los tejidos normales. Con lo cual, un fotosensibilizador con estas características puede activar o aumentar la generación de $O_2(^1\Delta_g)$ específicamente en el tejido objetivo, produciendo menor daño en tejidos sanos.⁴⁰⁹

4.26.2. Determinación de $O_2^{\bullet-}$ con NBT

El compuesto NBT se utilizó para determinar la formación de $O_2^{\bullet-}$ en presencia de NADH. Como se describió anteriormente, la reacción de $O_2^{\bullet-}$ con NBT produce DF, el cual puede ser monitoreado siguiendo cambios en el espectro de absorción a 560 nm.

Los fotosensibilizadores BDP-C₆₀ y BDP-C₆₀²⁺ se estudiaron en DMF/1% H₂O en condiciones aeróbicas en presencia de NBT y del reductor NADH, irradiando las soluciones a 500 nm. Ambas díadas producen radical anión superóxido, siendo mayor la producción de la díada neutra (Figura 63).

Estos resultados nos indican que existe un aporte significativo del mecanismo tipo I en presencia de NADH en la acción fotodinámica por parte de las díadas. En estudios anteriores para otra estructura BODIPY-C₆₀ también se detectó producción de $O_2^{\bullet-}$ en presencia de una molécula reductora.³⁰⁰

Es importante resaltar que las unidades estructurales de BODIPY y C₆₀ también se evaluaron a la misma concentración en solución que las díadas. Tales estructurales no

mostraron una apreciable fotooxidación de NBT. Esto indica que en las díadas la antena de BODIPY activa eficientemente la producción de $O_2^{\cdot-}$ por el mecanismo de acción tipo I en presencia de NADH. Además, la generación del estado de transferencia de carga con la formación del $C_{60}^{\cdot-}$, puede favorecer la transferencia electrónica al oxígeno y así formar el $O_2^{\cdot-}$.

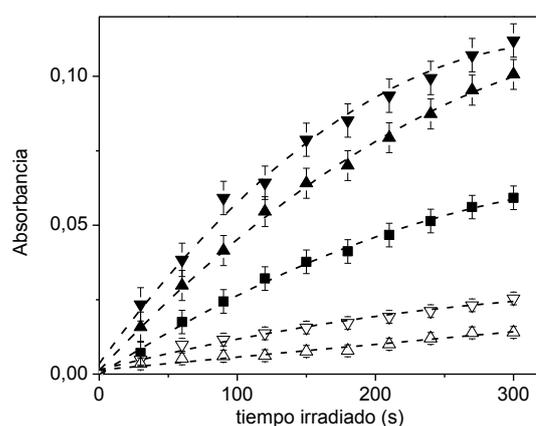


Figura 63. Detección de $O_2^{\cdot-}$ mediante la reacción con NBT (2 mM) a diferentes tiempos de irradiación con luz visible. NBT + NADH (■); NBT + BDP-C₆₀ (▽); NBT + BDP-C₆₀²⁺ (△); NBT + NADH + BDP-C₆₀ (▼) NBT + NADH + BDP-C₆₀²⁺ (▲) en DMF/1% H₂O.

4.26.3. Fotooxidación de Trp

La fotooxidación del Trp sensibilizada por las díadas y sus unidades precursoras se evaluó en DMF irradiando con luz monocromática ($\lambda_{irr} = 500$ nm). Como se describió previamente, Trp puede ser fotooxidado por ambos mecanismos de acción fotodinámica (tipo I y tipo II) y puede ser un objetivo potencial de la ROS generado por el fotosensibilizador en las células.

En todos los casos, la fotooxidación siguió una cinética de pseudo primer orden con respecto a la concentración de Trp (Figura 64). A partir del ajuste lineal se calcularon los valores de k_{obs}^{Trp} mostrados en la Tabla 16. Puede observarse que la díada BDP-C₆₀ muestra mayor eficiencia para en la fotooxidación del sustrato en relación a las estructuras individuales de MAC₆₀ y BDP1, cuando la antena de BODIPY del sistema dador-aceptor se irradia selectivamente (Figura 64A). Esto indica que la presencia del BODIPY en la díada como antena captadora de luz visible potencia la acción fotodinámica del fullereno C₆₀ en la fotooxidación del aminoácido. Además, para las estructuras catiónicas se observó un comportamiento similar al obtenido para los compuestos sin carga (Figura 64B). Si bien

la k_{obs}^{Trp} obtenida para BDP-C₆₀²⁺ resultó ser menor en comparación a la obtenida para BDP-C₆₀, en congruencia con lo encontrado en los demás estudios fotodinámicos, es mayor a las k_{obs}^{Trp} recogidas para MAC₆₀⁺ y BDP2, evidenciando nuevamente, que la presencia de la antena de BODIPY en la díada dicatiónica optimiza el efecto fotodinámico.

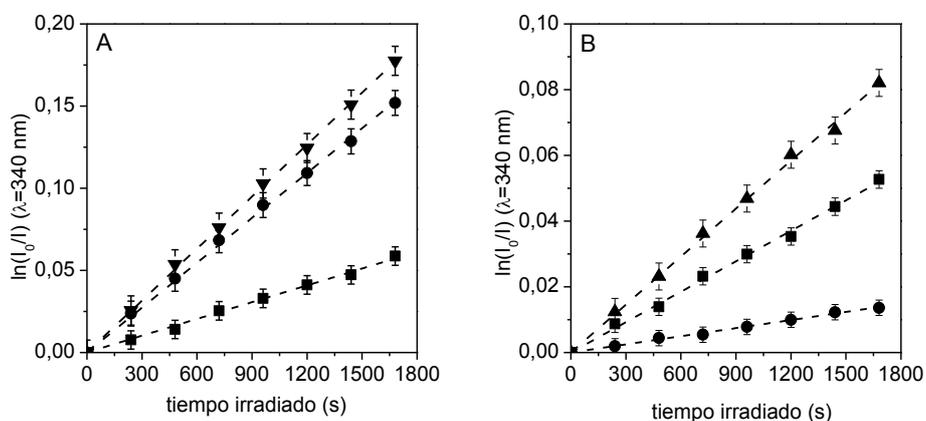


Figura 64. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de Trp en DMF fotosensibilizada por (A) MAC₆₀ (●), BDP1 (■) BDP-C₆₀ (▼) y (B) MAC₆₀⁺ (●), BDP2 (■) y BDP-C₆₀²⁺ (▲).

Tabla 16. Parámetros cinéticos para la reacción de Trp (k_{obs}^{Trp}) de las díadas BDP-C₆₀, BDP-C₆₀²⁺ y sus unidades estructurales (BDP1, BDP2, MAC₆₀ y MAC₆₀⁺) en DMF.

Compuesto	Medio	k_{obs}^{TRP} (s ⁻¹) DMF
BDP1	DMF	(3,40±0,04)x 10 ⁻⁵
BDP2	DMF	(3,09±0,04)x 10 ⁻⁵
MAC ₆₀	DMF	(9,10±0,03)x 10 ⁻⁵
MAC ₆₀ ⁺	DMF	(8,24±0,02)x 10 ⁻⁶
BDP-C ₆₀	DMF	(1,05±0,05)x 10 ⁻⁴
BDP-C ₆₀ ²⁺	DMF	(4,87±0,04)x 10 ⁻⁵

Además, el mismo estudio de fotooxidación de Trp se realizó partiendo de iguales concentraciones de los compuestos (1 μM), a diferencia de lo anterior en donde se partió de absorbancias iguales a la longitud de onda de irradiación (A=0,1 a 500 nm). A las mismas concentraciones, sólo se observó fotooxidación del Trp en presencia de BDP-C₆₀ y BDP-C₆₀²⁺. Esto indica que la presencia del BODIPY como antena captadora de luz incrementa la acción fotodinámica del fullereno C₆₀.

Con el fin de obtener información sobre la contribución de los mecanismos fotodinámicos en la fotooxidación de Trp medíada por ambas díadas, se evaluó la fotodescomposición del aminoácido en presencia de DABCO y D-manitol. Al igual que lo descrito en la Sección 4.15.2., las cinéticas de reacción se estudiaron en DMF/H₂O 5%, dado que los supresores de ROS se agregaron de una solución stock preparada en agua.

En la Tabla 17, puede observarse que los valores de k_{obs} son menores en DMF/H₂O 5% que en DMF. Como se describió previamente, esto puede deberse al menor tiempo de vida menor del O₂(¹Δ_g) en el medio más polar.³³² En las Figura 65 se muestran los gráficos semilogarítmicos de fotooxidación del Trp en presencia de DABCO y D-manitol. Puede verse que la presencia de ambos atrapadores específicos de ROS disminuye considerablemente la velocidad de fotooxidación del aminoácido (Tabla 17). Esto estaría evidenciando que fotodescomposición del sustrato biológico inducida por ambas díadas puede estar medíada por una importante contribución del mecanismo tipo I en conjunción con el mecanismo tipo II.

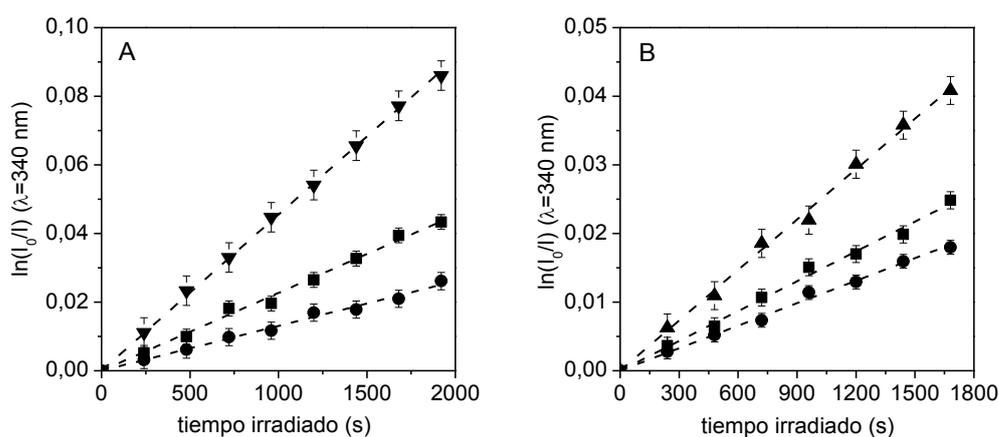


Figura 65. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de Trp en DMF/H₂O 5% fotosensibilizada por (A) BDP-C₆₀ (▼) y (B) BDP4 (▲) con adición de DABCO (50 mM) (●) y D-manitol (50 mM) (■), $\lambda_{irr}=500$ nm.

Tabla 17. Parámetros cinéticos para la reacción de Trp ($k_{\text{obs}}^{\text{Trp}}$) de las díadas BDP-C₆₀ y BDP-C₆₀²⁺ en DMF/H₂O 5% y en presencia de DABCO y D-manitol.

Parámetros	Medio	BDP-C ₆₀	BDP-C ₆₀ ²⁺
$k_{\text{obs}}^{\text{Trp}}$ (s ⁻¹)	DMF/H ₂ O 5%	(4,55±0,03)x10 ⁻⁵	(2,55±0,03)x10 ⁻⁵
$k_{\text{obs}}^{\text{Trp+DABCO (50 mM)}}$ (s ⁻¹)	DMF/H ₂ O 5%	(1,31±0,02)x10 ⁻⁵	(1,09±0,02)x10 ⁻⁵
$k_{\text{obs}}^{\text{Trp+D-manitol(50 mM)}}$ (s ⁻¹)	DMF/H ₂ O 5%	(2,27±0,03)x10 ⁻⁵	(1,45±0,02)x10 ⁻⁵

4.27. PDI de díadas

Las díadas BDP-C₆₀ y BDP-C₆₀²⁺ se evaluaron como FS en la inactivación de *S. aureus*. La capacidad fotoinactivante de estos sistemas se comparó con la correspondiente a los fullerenos individuales, MAC₆₀ y MAC₆₀⁺, con el fin de evaluar el grado de optimización de la PDI por la presencia de la antena de BODIPY.

Primeramente se estudió la acción fotodinámica de la díada neutra BDP-C₆₀, junto con el MAC₆₀. Ambas moléculas no resultaron tóxicas en la oscuridad con 5 μM de concentración. Las curvas de inactivación obtenidas se muestran en la Figura 66. Para BDP-C₆₀ se observó una inactivación de ~4,5 log (99,9961 %), partiendo de una densidad celular de 10⁸ UFC/ml de *S. aureus*, y con 30 min de irradiación. El fullereno neutro, MAC₆₀, bajo las mismas condiciones, generó un decrecimiento en la viabilidad celular de ~3,5 log. Esto indica que el efecto antena en la díada produce una potenciación en la acción fotodinámica de aproximadamente ~1 log. Si se comparan las inactivaciones, en tiempos de irradiación más cortos, se visualiza una potenciación aún más relevante. Puede observarse, que a los 15 min la PDI se potencia alrededor de 1 log con la presencia de la antena dador. A los 5 min, la díada generó una PDI de ~3,5 log, mientras que el fullereno sólo produjo una disminución de la supervivencia celular de ~1 log, evidenciando un considerable incremento en la PDI de aproximadamente 2,5 log. Estos resultados indican que la presencia de la antena de BODIPY, permite optimizar eficientemente la acción fotodinámica del fullereno neutro.

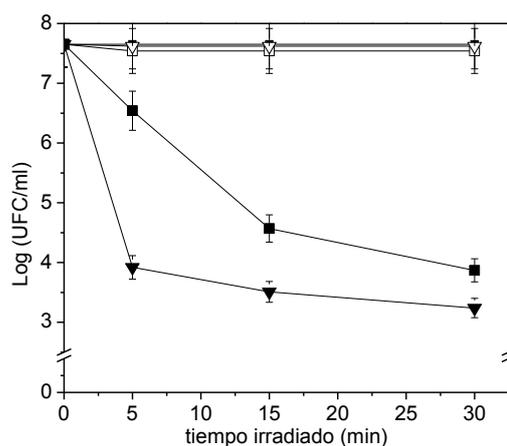


Figura 66. Supervivencia de *S. aureus* ($\sim 10^8$ UFC/ml) incubadas con $5 \mu\text{M}$ de MAC_{60} (■) y $5 \mu\text{M}$ BDP-C_{60} (▼) durante 30 min a 37°C en la oscuridad y expuestas a la luz visible durante diferentes tiempos de irradiación. Controles: células sin tratar en la oscuridad (o), células tratadas con $5 \mu\text{M}$ MAC_{60} (□) y BDP-C_{60} (▽) en la oscuridad.

Posteriormente se estudió la actividad fotoinactivante de la díada dicatiónica, y se comparó con la acción del fullereno catiónico, MC_{60}^+ (Figura 67). Se utilizaron concentración de $5 \mu\text{M}$ de ambos fotosensibilizadores. Estos compuestos no resultaron tóxicos en la oscuridad en dicha concentración. Como se describió anteriormente, las moléculas catiónicas son las que despiertan mayor interés como fotosensibilizador para PDI, debido a que han resultado ser las estructuras más eficientes para inactivar un amplio espectro de microorganismos. Esto se debe a que las cargas positivas presentes en las estructuras generan una interacción más eficaz con las membranas externas de los microorganismos cargadas negativamente.

La díada BDP-C_{60}^{2+} mostró una relevante eficacia en el tratamiento de *S. aureus* ($\sim 10^8$ UFC/ml), presentando una inactivación de ~ 5 log (99,999%) a los 30 min de irradiación con luz visible (Figura 67). Este resultado puede compararse con otros sistemas dador-aceptor evaluados como FS en *S. aureus*. La díada porfirina- C_{60} con cuatro cargas positivas mostrada en el Esquema 24 (Sección 1.5.7.), mostró una PDI de $\sim 4,5$ log a 30 minutos de irradiación, $5 \mu\text{M}$ de concentración y partiendo de una densidad celular de 10^6 UFC/ml.²²⁹ Por otro lado, la díada del Esquema 26 (Sección 1.5.7.), que contiene diez cargas positivas y un grupo difenilaminofluoreno como antena, exhibió una PDI de 5 log con $50 \mu\text{M}$ e irradiado con luz blanca por 20 minutos.⁸⁸ Estas comparaciones indican que

la díada BDP-C₆₀²⁺ puede resultar en una arquitectura fotosensibilizadora eficiente para PDI de *S. aureus*.

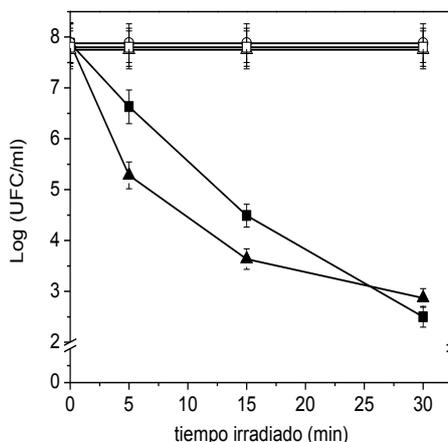


Figura 67. Supervivencia de *S. aureus* ($\sim 10^8$ UFC/ml) incubadas con $5 \mu\text{M}$ de MAC_{60}^+ (■) y $5 \mu\text{M}$ BDP-C₆₀²⁺ (▲) durante 30 min a 37°C en la oscuridad y expuestas a la luz visible durante diferentes tiempos de irradiación. Controles: células sin tratar (○), células tratadas con $5 \mu\text{M}$ MC_{60}^+ (□) y BDP-C₆₀²⁺ (Δ) en la oscuridad.

Cuando comparamos la eficiencia de la díada con respecto a MAC_{60}^+ , se observa que BDP-C₆₀²⁺ resulta más eficiente hasta los 20 min de irradiación aproximadamente. A 30 minutos de irradiación, el fullereno alcanza una inactivación similar a la díada.

Si bien se observa una mayor PDI a tiempos cortos de irradiación para BDP-C₆₀²⁺ con respecto al fullereno monocatiónico, esta diferencia no es de gran magnitud si se tiene en cuenta que la díada presenta una carga positiva más. Esta escasa diferencia en la capacidad fotoinactivante observada, puede deberse posiblemente a las intensas absorciones en las regiones violeta y azul del espectro electromagnético presentadas por el fullereno (Figura 48). Sin embargo, como se explicó previamente, la penetración en los tejidos de la irradiación a longitudes de onda en estas zonas del espectro, es muy escasa. Esto indicaría, que la eficiencia de MAC_{60}^+ podría disminuir cuando el tratamiento se produzca en un medio con composición similar a la de tejidos celulares. En este sentido, evaluamos la PDI de este fullereno catiónico y de BDP-C₆₀²⁺ irradiando con un filtro óptico de corte que permite seleccionar un rango de longitud de onda entre 455-800 nm. Elegimos este rango de longitud de onda, considerando la absorción de la hemoglobina de la sangre. La banda principal del grupo hemo se encuentra entre 350-450 nm, como se muestra en la Figura 68.⁴¹⁰ Además, en esta región también absorben un gran número de

proteínas, ácidos nucleicos y pigmentos como la melanina, que pueden ser estructuras constituyentes de tejidos biológicos. Así, utilizamos este filtro con el fin de simular la posible absorción de la hemoglobina y otras estructuras presentes en un medio biológico.

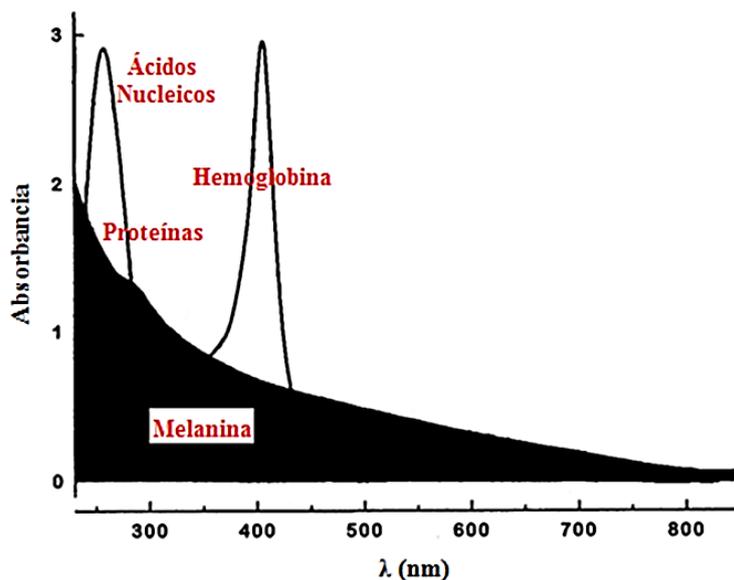


Figura 68. Espectro de absorción de hemoglobina y otros componentes de los tejidos biológicos.

En la Figura 69 pueden observarse los resultados obtenidos. En los tratamientos de irradiación sin filtro los cultivos se irradiaron por 30 min (90 mW/cm^2), y con el filtro, se irradió por 45 min, debido a la disminución de la potencia de la lámpara con la filtración de la luz (60 mW/cm^2). Así, en ambos casos se utiliza una fluencia de irradiación de 162 J/cm^2 .

Al visualizar las PDI alcanzadas por los fotosensibilizadores cuando se irradió con el filtro de corte por 45 min, observamos que la inactivación para ambos compuestos disminuyó. Sin embargo, la díada BDP-C_{60}^{2+} presenta una mayor inactivación, alrededor de $\sim 4 \text{ log}$, mientras que el fullereno catiónico sólo logró una PDI de $\sim 1,5 \text{ log}$. Estos resultados nos indican la importancia de la presencia de la antena captadora de luz unida covalentemente al C_{60} , la cual permite alcanzar intensas absorciones de luz en rangos del espectro en donde la penetración de la irradiación en los tejidos celulares es mayor. Esta potenciación mediante la irradiación con luz de mayores longitudes de onda también se observó en los estudios de la díada representada en el Esquema 26 (Sección 1.5.7.).⁸⁸

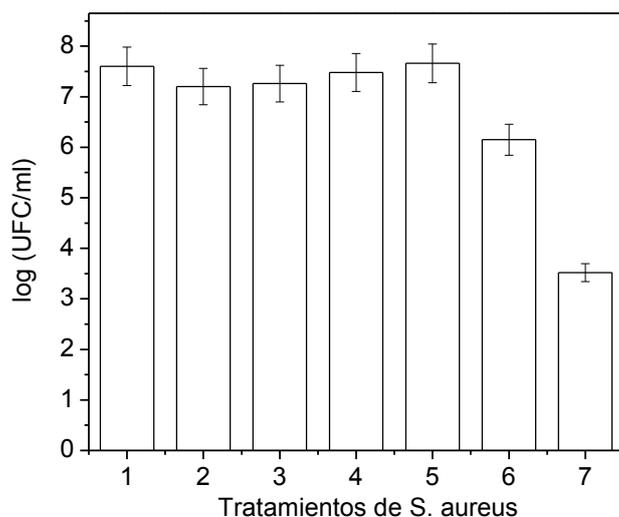


Figura 69. Supervivencia de *S. aureus* ($\sim 10^8$ UFC/ml) bajo las siguientes condiciones: (1) cultivo de control sin tratar en la oscuridad, (2) sin tratar irradiado 45 min sin filtro, (3) sin tratar irradiado 45 min con filtro 455-800 nm, (4) tratado con BDP-C₆₀²⁺ sin irradiar, (5) tratado con MAC₆₀⁺ sin irradiar, (6) tratado con MAC₆₀⁺ irradiado 45 min con filtro 455-800 nm, y (7) tratado con BDP-C₆₀²⁺ irradiado 45 min con filtro. [FS] = 5 μ M.

Estos resultados obtenidos son los primeros en indicar que sistemas dador-aceptor conformados por estructuras de BODIPYs unidas covalentemente a derivados del fullereno C₆₀ pueden actuar como fotosensibilizadores eficientes para la PDI de *S. aureus*, permitiendo potenciar la acción fotodinámica del C₆₀, mediante el incremento y desplazamiento hacia mayores longitudes de onda de la absorción de la luz irradiada. Además, la presencia de más cargas positivas en la díada dicatiónica con respecto al fullereno monocatiónico permite aumentar la selectividad del fotosensibilizador por las células bacterianas.

4.28. Mecanismo de acción fotodinámico *in vitro* de BDP-C₆₀²⁺

Dado que BDP-C₆₀²⁺ es la díada de mayor interés para aplicarla como estructura fotosensibilizadora, se realizaron los estudios mecanísticos con el fin de evaluar la contribución de cada proceso fotodinámico en la PDI de *S. aureus* (Figura 70). En tal sentido, se realizaron estudios de fotoinactivación en presencia de D₂O, azida, DABCO y D-manitol. En todos los ensayos se empleó una concentración de 5 μ M y el tiempo de irradiación de los cultivos fue de 30 min. Durante este tiempo de iluminación se produce

una reducción de ~5 log (Figura 70, columna 6), lo que permite observar una disminución o un aumento en la inactivación al cambiar las condiciones del experimento.

Las suspensiones tratadas con BDP-C₆₀²⁺ en D₂O, mantenidas en la oscuridad durante 30 min y también irradiadas no vieron afectada su viabilidad (Figura 70, columna 2). La irradiación de *S. aureus* en D₂O tratada con BDP-C₆₀²⁺ produjo una potenciación de la acción fotodinámica de ~1,5 log, señalando que existe una contribución del mecanismo tipo II de producción de O₂(¹Δ_g) en la PDI (Figura 70, columna 7).

La presencia del ion azida generó una disminución casi total de la PDI (Figura 70, columna 8). Como se dijo previamente este sustrato puede desactivar al O₂(¹Δ_g) pero también al estado triplete excitado del FS.⁹¹

Cuando se realizaron los estudios en presencia de un sustrato más específico de O₂(¹Δ_g) como el DABCO, se observó una disminución de la PDI de 3 log (Figura 70, columna 9), generándose en estas condiciones una inactivación cercana a 2 log. Esto confirma la presencia de una contribución del mecanismo tipo II en la acción fotodinámica de *S. aureus*.

Sin embargo, cuando se evaluó la acción fotodinámica en presencia de D-manitol se observó una mayor inhibición de la PDI en comparación a lo observado para DABCO. En presencia del sustrato atrapador de radicales, se observó una disminución de 4,6 log en la inactivación (Figura 70, columna 10). Esto demuestra que existe una importante contribución del mecanismo tipo I.

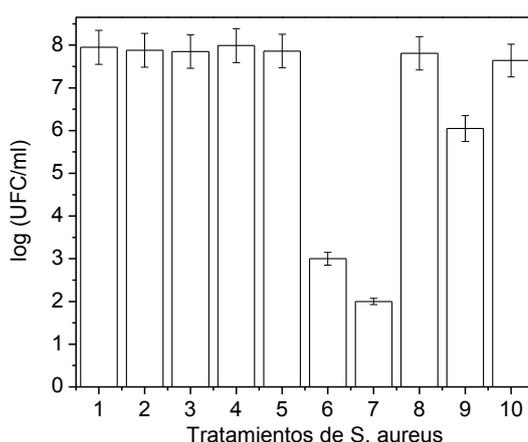
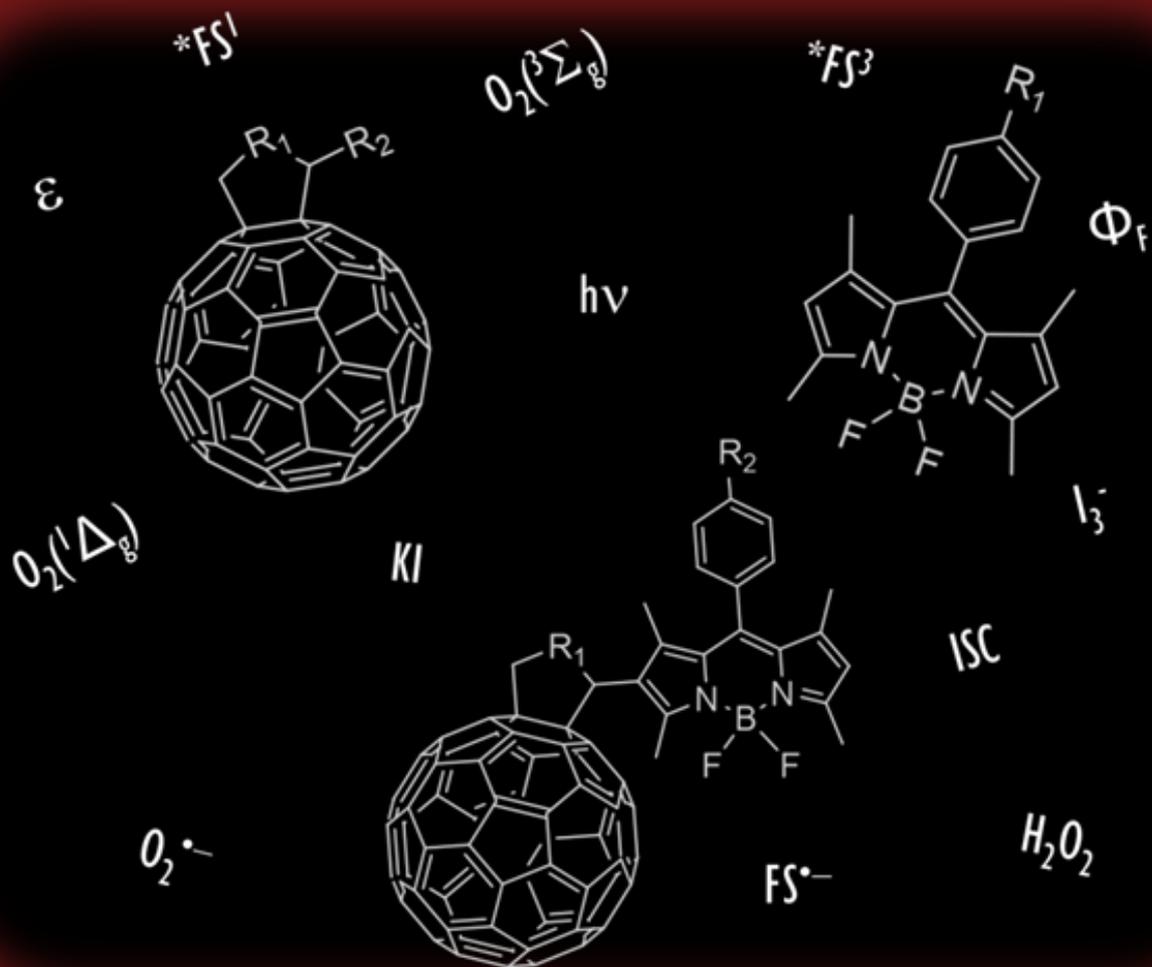


Figura 70. Supervivencia de células de *S. aureus* (0,2 ml, ~10⁸ UFC/ml) incubadas con 5 μM BDP-C₆₀²⁺ en la oscuridad por 30 min a 37 °C e irradiadas con luz visible durante 30 min en policubeta de poliestireno de 96 pocillos: (1) cultivo control en oscuridad; 2) cultivo control con D₂O e irradiado; 3) cultivo control con azida e irradiado; 4) cultivo control con DABCO e

irradiado; 5) cultivo control con D-manitol e irradiado; 6) cultivo tratado con BDP-C₆₀²⁺ e irradiado; 7) cultivo tratado con BDP-C₆₀²⁺ en D₂O e irradiado; 8) cultivo tratado con BDP-C₆₀²⁺, 50 mM azida e irradiado; 9) cultivo tratado con BDP-C₆₀²⁺, 50 mM de DABCO e irradiado; 10) cultivo tratado con BDP-C₆₀²⁺, 50 mM de D-manitol e irradiado.

Así podemos concluir que la PDI *in vitro* de *S. aureus* por fotosensibilización con luz visible de BDP-C₆₀²⁺, es producida por ROS generadas por ambos mecanismos de acción fotodinámica. El resultado encontrado resulta importante ya que la mayoría de los estructuras fotosensibilizadoras estudiadas generan la PDI preponderantemente por el mecanismo tipo II de producción de O₂(¹Δ_g), mostrando a menudo escasa contribución en la acción fototóxica de radicales producidos por el mecanismos tipo I.⁴¹¹



CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES

Cuando iniciamos el estudio de los derivados del fullereno C_{60} , con el fin de aplicarlos como fotosensibilizadores en PDI de bacterias debido a sus interesantes propiedades, tuvimos presente, principalmente, las desventajas que estos presentan en aplicaciones biológicas. Una de ellas, relacionada al alto carácter hidrofóbico que estas estructuras presentan, lo que dificulta la solubilización y vehiculización de los fullerenos en medios acuosos. Para disminuir este inconveniente, planteamos el diseño de derivados del C_{60} con grupos que puedan incorporar mayor polaridad al fotosensibilizador. En este sentido, primeramente sintetizamos un fullereno dicatiónico, presentando un alto carácter anfifílico, necesario no sólo, para aumentar la solubilidad y vehiculización en medio biológico, sino que también, para lograr una unión eficaz a la envoltura celular de los microorganismos.

Este nuevo derivado de fullerenopirrolidina se sintetizó convenientemente utilizando un procedimiento de dos etapas, que implicó una cicloadición 1,3-dipolar de iluros de azometino a C_{60} , a partir de 4-(3-*N,N*- dimetilamino)propoxilbenzaldehído y *N*-metilglicina, para obtener MPC_{60} , y una posterior metilación exhaustiva con un exceso de sulfato de dimetilo, para generar el derivado dicatiónico DPC_{60}^{2+} .

Los estudios espectroscópicos nos muestran que el fullereno MPC_{60} presenta un alto grado de monomerización en distintos medios. Sin embargo, el DPC_{60}^{2+} forma agregados en disolventes de diferente polaridad, aunque incrementa su monomerización en medios microheterogéneos, como en micelas inversas de tolueno/AOT/agua, probablemente debido a la interacción con la interfaz micelar del medio biomimético. Además, los estudios de fluorescencia indicaron que estos derivados muestran bajos rendimientos de emisión en congruencia con las propiedades fotofísicas del C_{60} . La producción de $O_2(^1\Delta_g)$ se evaluó usando DPBF y DMA en DMF, con valores de 0,4 y 0,8 para DPC_{60}^{2+} y MPC_{60} , respectivamente. El menor rendimiento para el derivado dicatiónico se debe probablemente a su incompleta monomerización en el solvente orgánico. Asimismo la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ se evaluó a partir de la fotooxidación de DMA en el microentorno biomimético formado por micelas inversas de tolueno/AOT/agua. Se observó una leve disminución en la formación del $O_2(^1\Delta_g)$ para ambos fullerenos, debido a la reacción más lenta de DMA con $O_2(^1\Delta_g)$ en solventes no

polares como tolueno o a la distribución del $O_2(^1\Delta_g)$ entre las diferentes pseudo fases micelares.

Por otro lado, se evaluó la producción del radical anión superóxido de ambos derivados del fullereno en DMF. La producción del $O_2^{\cdot-}$ se siguió por la aparición de DF debido al producto de la fotooxidación del NBT en presencia de NADH. Se pudo observar que ambos fotosensibilizadores producen $O_2^{\cdot-}$. Por otro lado, ambos fullerenos sensibilizan la descomposición eficientemente el Trp en DMF, siendo levemente mayor para MPC₆₀. Los resultados obtenidos indican que el mecanismo tipo I interviene junto al tipo II en la fotooxidación de Trp. Sin embargo, la eficiencia fotodinámica de los fotosensibilizadores en los sistemas biológicos, no es directamente predecible sobre la base de investigaciones fotofísicas en solución o que las estructuras fotosensibilizadoras pueden generar diferentes especies de ROS dependiendo principalmente de la polaridad del microambiente donde se localicen.

Los ensayos biológicos *in vitro* de fotoinactivación se realizaron en *S. aureus*. La inactivación fotosensibilizada de las suspensiones celulares ($\sim 10^6$ UFC/ml) por DPC₆₀²⁺ presentó una disminución de $\sim 4,5$ log de la supervivencia celular (99,99% de inactivación celular), cuando los cultivos se trataron con 0,5 μ M de fotosensibilizador y se irradiaron durante 30 min con luz visible. Mientras que, MPC₆₀ mostró una fotocitotoxicidad menor. Además, la actividad fotodinámica generada por DPC₆₀²⁺ resultó eficaz para inactivar *S. aureus* a mayor densidad celular ($\sim 10^8$ UFC/ml), mostrando una PDI de 4,8 log. Este resultado representa un valor mayor a 99,998% de inactivación celular. Sin embargo, se logró una inactivación menos efectiva de la bacteria Gram negativa *E. coli*. Este tipo de microorganismo es más difícil de erradicar debido a la compleja estructura de su pared celular.

Estudios *in vitro* en presencia de diferentes sustratos se utilizaron para dilucidar el mecanismo de acción fotodinámica que está implicado en la PDI de células de *S. aureus* fotosensibilizada por DPC₆₀²⁺. En presencia de D₂O se produjo una reducción considerable de la viabilidad celular. Como este sustrato aumenta el tiempo de vida del $O_2(^1\Delta_g)$, el resultado obtenido indica que existe una contribución del mecanismo de fotosensibilización Tipo II en la inactivación de *S. aureus*. Por otro lado, se observó una protección de las células microbianas en presencia de azida y DABCO, dos sustratos que desactivan el $O_2(^1\Delta_g)$. La adición de D-manitol, el cual es un atrapador de radicales producidos por el mecanismo Tipo I, también produjo una relevante disminución de la

PDI. El análisis completo de estos resultados indican que existe una contribución de ambos mecanismos en la PDI, con una mayor preponderancia del Tipo II de producción de $O_2(^1\Delta_g)$.

Cuando se evaluó la PDI en presencia de NADH, se encontró una inhibición de la PDI, lo que estaría indicando una desactivación del $O_2(^1\Delta_g)$ producido, sin contribución relevante del mecanismo Tipo I. En cambio, cuando la inactivación fotodinámica de *S. aureus* se estudió en presencia de la sal no tóxica de KI, se encontró una importante potenciación de la PDI. Este aumento de la inactivación celular dependió de la concentración de yoduro en el medio. Cuando se evaluó a 25 y 50 mM de I^- , la potenciación de la PDI permitió una erradicación prácticamente completa de las células microbianas. Tal potenciación puede deberse a la producción de especies reactivas de yodo, que en conjunto con las ROS, permiten potenciar la acción fotodinámica. Además, cuando se estudió la PDI en condiciones anóxicas y presencia de azida se observó una PDI de aproximadamente 2 log, evidenciando una importante presencia de acción fotodinámica independiente del oxígeno, posiblemente debido a la producción de radicales de azida.

Posteriormente, y con el objetivo de diseñar un fullereno eficiente para inactivar bacterias Gram negativas, se sintetizó un derivado tricatiónico del C_{60} . Por la cicloadición 1,3-dipolar se obtuvo el derivado sin carga MAC_{60} . La metilación exhaustiva permitió generar el derivado tricatiónico DMC_{60}^{3+} .

Los estudios espectroscópicos exhibieron comportamientos similares a los derivados sintetizados previamente, mostrando que el fullereno tricatiónico incrementa su monomerización en medio micelar. La producción de $O_2(^1\Delta_g)$ se evaluó en DMF usando DPBF, dando valores de 0,20 y 0,61 para DMC_{60}^{3+} y MMC_{60} , respectivamente. También, estudios con NBT en presencia de un agente reductor biológico y Trp indican que los nuevos fullerenos pueden ejercer una acción fotodinámica por ambos mecanismos de sensibilización.

La inactivación fotodinámica para los nuevos fullerenos sintetizados, MMC_{60} y DMC_{60}^{3+} , se evaluó en *S. aureus* y *E. coli* a dos densidades celulares (10^6 UFC/ml y 10^8 UFC/ml). En *S. aureus*, el derivado sin carga MMC_{60} mostró escasa eficiencia, mostrando sólo una PDI de ~1,3 log, cuando se partió de una densidad celular de 10^8 UFC/ml y a una concentración de 0,5 μ M. Sin embargo, el DMC_{60}^{3+} mostró una eficiencia mucho mayor a igual concentración, evidenciando una PDI de 5,3 log (99,9994 %) y 4,90 log (99,9987 %) para 10^6 UFC/ml y $\sim 10^8$ UFC/ml, respectivamente. En la bacteria Gram negativa *E. coli*,

DMC₆₀³⁺ mostró una PDI significativa cuando se utilizó una concentración de 1 μM. Cuando se partió de 10⁶ CFU/ml, se generó una disminución en la supervivencia celular de ~3 log a los 30 min de irradiación, lo que significa un 99,90 % de inactivación bacteriana. Cuando se utilizó una densidad celular de 10⁸ CFU/ml se observó una PDI de 3,6 log, que representa un 99,97 % de inactivación. Estos resultados indican que al aumentar la carga positiva intramolecular del fotosensibilizador aumenta la PDI. Esto podría explicarse considerando que se incrementa la interacción electrostática del fullereno con los residuos aniónicos constituyentes de la envoltura celular, permitiendo un mayor efecto fotocitotóxico.

Los mecanismos de acción fotodinámica se evaluaron *in vitro* para DMC₆₀³⁺ en ambas bacterias. Los resultados obtenidos en estos microorganismos indican que la fotoinactivación mediada por DMC₆₀³⁺ puede estar mediada por contribuciones de ambos mecanismos fotodinámicos, observándose una mayor contribución del mecanismo tipo I en la bacteria Gram positiva, y del tipo II en la Gram negativa. Tal comportamiento puede explicarse considerando el microentorno donde se localiza el FS en cada bacteria que influye en el tipo de ROS que se genera mediante el proceso de fotosensibilización. Además, se observó nuevamente un importante incremento de la acción fotodinámica mediada DMC₆₀³⁺ con la presencia del ion yoduro. También se observó PDI independiente del oxígeno con presencia del anión azida.

Luego del estudio y evaluación de los nuevos derivados del C₆₀, nos propusimos sintetizar y estudiar estructuras que aporten a la disminución de otra desventaja que presenta el C₆₀, relacionada con la baja absorción en la región visible del espectro. Estas características espectroscópicas de absorción disminuyen la eficiencia de los fullerenos como FS para el tratamiento de infecciones en tejidos biológicos. Para tal fin, se pensó en el diseño de díadas conformadas por una antena captadora de luz en el centro de la región visible y dadora de energía, unida covalentemente a derivados del C₆₀, como aceptores de tal energía. Como antenas captadoras de luz, se propusieron fluoróforos derivados del BODIPY. Por lo tanto, en primera instancia se realizó la síntesis de dos derivados del BODIPYs para el posterior estudio de sus propiedades espectroscópicas y fotodinámicas. La ruta sintética consistió de una condensación directa entre pirroles y aldehídos aromáticos. Esta síntesis permitió obtener los BODIPYs deseados (BDP2 y BDP4) mediante reacciones sucesivas en un mismo balón de reacción, y con una sola etapa de purificación. Con el fin de evaluarlos como fotosensibilizadores, incorporamos una carga

positiva a cada estructura mediante metilación exhaustiva para obtener las correspondientes sales de amonio cuaternarias.

Los estudios espectroscópicos de absorción indican que estos compuestos presentan una absorción importante en la región verde del espectro, la cual resulta de gran utilidad para la funcionalidad como antenas captadoras. Teniendo en cuenta, se observó que sus grados de monomerización se incrementan en el medio micelar. Con respecto a las propiedades de emisión se observó una disparidad en las magnitudes de los rendimientos cuánticos, siendo mucho menor el correspondiente a BDP4. Esto se debe a las diferencias estructurales que presentan los BODIPYs, que influyen en la rotación del grupo en la posición *meso* y en la rigidez general del BODIPY.

La producción de $O_2(^1\Delta_g)$ en DMF arrojó valores de 0,07 y 0,03 para los rendimientos de BDP2 y BDP4, respectivamente. Se observó un aumento de la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ en el medio micelar de *n*-heptano/AOT/agua, congruente con lo que indicaron los espectros de absorción. La fotooxidación de Trp en presencia de atrapadores de ROS específicos nos indicó que es factible una contribución del mecanismo tipo I en la acción fotodinámica de estos BODIPYs en solución.

El efecto del anión ioduro, observado en las propiedades espectroscópicas de especies transitorias y en la acción fotodinámica en solución, indica un incremento en el ISC por efecto de átomo pesado externo que permite aumentar la producción de ROS, y además, generar especies reactivas de iodo. Tales procesos permiten potenciar la acción fotodinámica de ambos BODIPYs.

Los estudios de PDI *in vitro* indicaron que ambos BODIPYs inactivan eficientemente *S. aureus*, alcanzando una PDI completa con 1 μ M y 5 min de irradiación. En *E. coli*, se observó una mayor inactivación con 5 μ M de BDP4. En presencia de I^- se potenció sustancialmente la inactivación de ambos BODIPYs, alcanzando una total PDI para BDP2 y BDP4, a los 30 y 15 min de irradiación, respectivamente. Además la microscopía de fluorescencia en bacterias mostró que ambos BODIPYs exhiben una intensa fluorescencia verde en las células bacterianas, presentando una alta afinidad para la unión con tales microorganismos. Estos resultados indican, que los BODIPYs sintetizados pueden resultar fotosensibilizadores prometedores en la PDI de bacterias sin la necesidad de unir covalentemente un átomo de halógeno, ya que la adición del anión I^- potencia notoriamente esta acción fotodinámica. Además, la importante emisión que muestran en el

medio biológico permite pensar la utilización dual de estos compuestos como agentes teranósticos.

Luego de la investigación detallada de las propiedades de BODIPYs, se procedió a realizar la síntesis de dos nuevas díadas, utilizando como antenas captadoras los BODIPYs BDP1 y BDP2. El proceso sintético constó de dos etapas. Una de formilación en la posición β del BODIPY, mediante la reacción de Vilsmeier-Haack, obteniéndose el producto BDP5 con un rendimiento del 87%. Luego, se realizó la unión covalente al C_{60} mediante la cicloadición 1,3-dipolar para sintetizar BPD- C_{60} , y por último la metilación para obtener la díada catiónica BPD- C_{60}^{2+} .

Los estudios espectroscópicos de absorción son esencialmente una combinación lineal de los espectros de las estructuras individuales correspondientes mostrando sólo diferencias pequeñas en los máximos de absorción. Ambas díadas exhiben una emisión muy débil, lo que indica una importante desactivación del estado excitado singlete del BODIPY por parte del fullereno C_{60} unido covalentemente. La eficiencia del *quenching* para cada sistema dador-aceptor, fue mayor a 0,90 en tolueno y DMF. Los espectros de emisión para la díada neutra en distintos solventes indican una posible presencia de un proceso PeT. Por otro lado, la espectroscopía de especies transitorias con excitación selectiva de la antena de BODIPY, mostró que en tolueno existe un preponderante proceso PET hacia el fullereno para ambas díadas. Los resultados obtenidos en DMF indican la preponderancia del proceso de PeT favorecido en el medio más polar. En presencia de TFA, el cual se utilizó para protonar el grupo amina en BDP- C_{60} , exhibió una potenciación del PET y consecuente disminución de la transferencia electrónica. Los resultados electroquímicos de los procesos de oxidación y reducción y los estudios computacionales confirmaron la factibilidad del proceso PeT de la antena de BODIPY hacia el C_{60} .

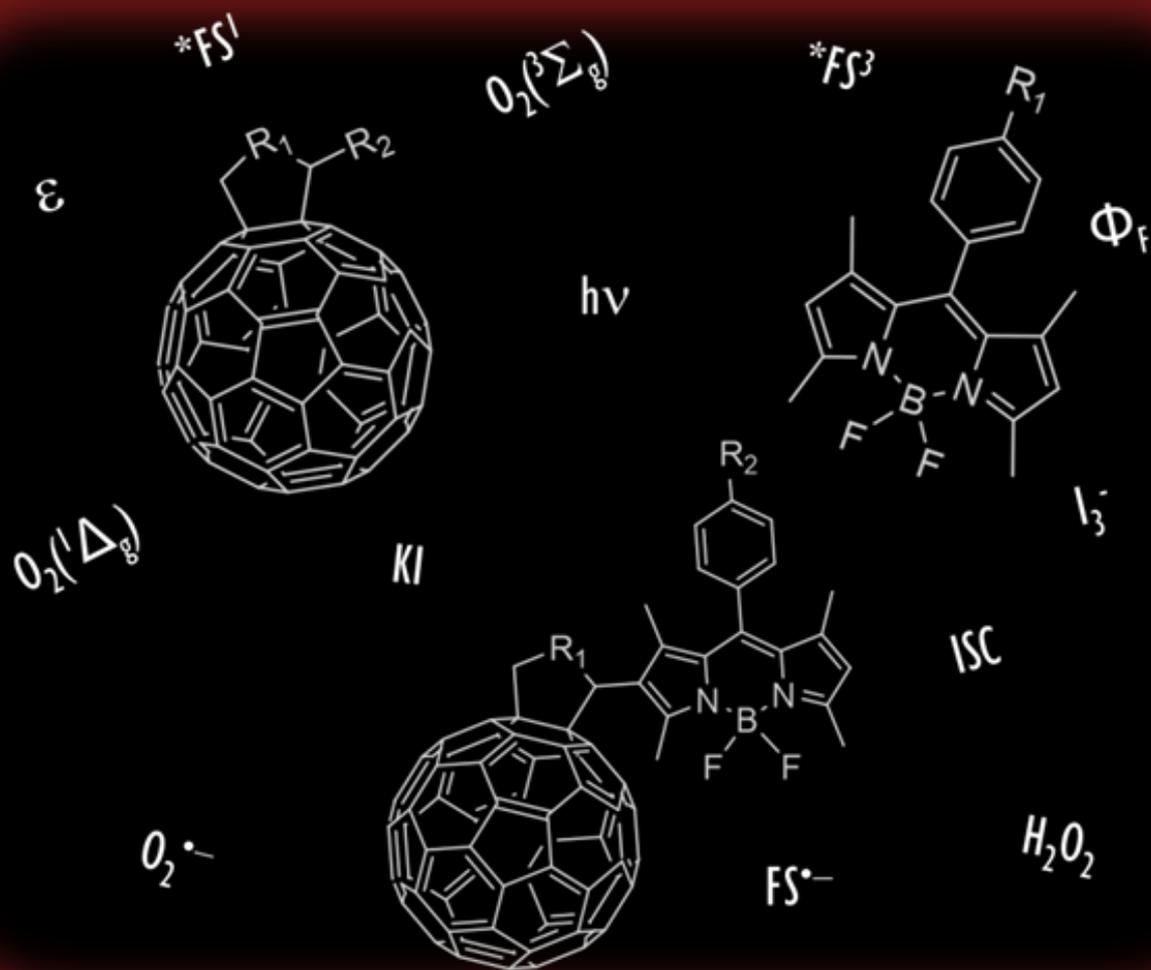
El análisis de los procesos de fotooxidación mostraron que BDP- C_{60} genera $O_2(^1\Delta_g)$ eficientemente en tolueno, y en menor medida en DMF. Esto último podría deberse al proceso PeT, favorecido en el medio más polar. Además, en presencia de TFA, el rendimiento cuántico aumentó considerablemente, indicando la inhibición de PeT mediante la protonación de los grupos aminos, favoreciendo el proceso PET. Para BDP- C_{60}^{2+} se observó un incremento en la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ en el medio micelar. Ambas díadas producen $O_2^{\bullet-}$ en solución, y fotodescomponen eficientemente Trp. Estudios de fotooxidación del aminoácido en presencia de DABCO y D-manitol indican una importante contribución del mecanismo tipo I en medio homogéneo para ambas díadas. Al

comparar los resultados obtenidos para BDP-C₆₀ y BDP-C₆₀²⁺ con sus respectivas unidades estructurales de BODIPY y C₆₀ en iguales condiciones experimentales, se encontró una mayor producción de ROS por parte de ambos sistemas dador-aceptor.

Los estudios de PDI *in vitro* indicaron que la díada catiónica es un fotosensibilizador más efectivo para la fotoinactivación de *S. aureus*, presentando una inactivación de ~5 log (99,999%) a los 30 min de irradiación con luz visible. La díada neutra mostró mayor eficiencia como que MAC₆₀, lo que estaría indicando una potenciación mediada por el efecto antena generado por la presencia del BODIPY. Para BDP-C₆₀²⁺ se observa un ensanchamiento de la PDI con respecto al MAC₆₀⁺ hasta los 25 min de irradiación aproximadamente. Además, cuando se irradia a mayores longitudes de onda, zona en donde absorbe preferentemente la antena de BODIPY, se observa que la díada genera una mayor inactivación que el fullereno. Esto último nos brinda un indicativo de lo que podría ocurrir en la PDI llevada a cabo en un medio de composición similar a los tejidos reales, en donde la penetración de la luz a menores longitudes de onda es escasa.

Estos resultados obtenidos son los primeros en indicar que sistemas dador-aceptor conformados por estructuras de BODIPYs unidas covalentemente a derivados del fullereno C₆₀, pueden actuar como fotosensibilizadores eficientes para la PDI de *S. aureus*, permitiendo potenciar la acción fotodinámica del C₆₀, mediante el incremento, y desplazamiento hacia mayores longitudes de onda, de la absorción de la luz irradiada.

Por último, cabe destacar que las principales ventajas de los fullerenos para actuar como agente fototerapéutico en PDI, radican en la elevada estabilidad fotoquímica, la alta eficiencia para formar estado excitado triplete y la capacidad de actuar como aceptor de energía y electrones. Estas propiedades potencian la capacidad de los fullerenos para generar ROS, principalmente por un proceso tipo II en un medio poco polar y mediante un mecanismo tipo I a medida que aumenta la polaridad del medio. De esta manera, en el trabajo de Tesis se trataron de resolver dos de las principales desventajas de los fullerenos como fotosensibilizadores para PDI, las cuales abarcan una baja interacción con los microorganismos y la falta de absorción intensa en la región visible. Así, estos inconvenientes pudieron ser resueltos mediante la adición de grupos catiónicos covalentemente unidos a la estructura del fullereno C₆₀ para aumentar la interacción con los medios biológicos y por la formación de díadas moleculares con BODIPY, el cual actúa mediante efecto antena como receptor de radiación visible en zonas espectrales donde la penetración de la luz en los tejidos es mayor.



CAPÍTULO VI

REFERENCIAS

CAPÍTULO VI

6. REFERENCIAS

1. Fleming, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.*, **1929**, *10*, 226-236.
2. Shears, P. Resistance as a Worldwide Problem. In *Bacterial Resistance to Antimicrobials, Second Edition*, CRC Press: 2007; pp 363-375.
3. Theuretzbacher, U. Global antibacterial resistance: The never-ending story. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, **2013**, *1*, 63-69.
4. Spellberg, B.; Bartlett, J. G.; Gilbert, D. N. The future of antibiotics and resistance. *N. Engl. J. Med.*, **2013**, *368*, 299-302.
5. Who, Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. In *Drug Resistance* [Online] France ed.; Organization, W. H., Ed. Switzerland, 2014.
6. Smith, T. L.; Pearson, M. L.; Wilcox, K. R.; Cruz, C.; Lancaster, M. V.; Robinson-Dunn, B.; Tenover, F. C.; Zervos, M. J.; Band, J. D.; White, E.; Jarvis, W. R. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Engl. J. Med. N.*, **1999**, *340* (7), 493-501.
7. Berendonk, T. U.; Manaia, C. M.; Merlin, C.; Fatta-Kassinos, D.; Cytryn, E.; Walsh, F.; Burgmann, H.; Sorum, H.; Norstrom, M.; Pons, M. N.; Kreuzinger, N.; Huovinen, P.; Stefani, S.; Schwartz, T.; Kisand, V.; Baquero, F.; Martinez, J. L. *Tackling antibiotic resistance: the environmental framework*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015 May;13(5):310-7. .
8. Dai, T.; Huang, Y. Y.; Hamblin, M. R. Photodynamic therapy for localized infections-state of the art. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2009**, *6*, 170-188.
9. Diaz Granados, C. A.; Cardo, D. M.; McGowan, J. E. Antimicrobial resistance: international control strategies, with a focus on limited-resource settings. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, **2008**, *32*, 1-9.
10. Rodríguez-Rojas, A.; Rodríguez-Beltrán, J.; Couce, A.; Blázquez, J. Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *Int. J. Med. Microbiol.*, **2013**, *303*, 293– 297.
11. Safdar, N.; Maki, D. G. The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus*, *enterococcus*, gram-

negative bacilli, *Clostridium difficile*, and *Candida*. *Ann. Intern. Med.*, **2002**, *136*(11), 834-844.

12. Hwang, T. J.; Gibbs, K. A.; Podolsky, S. H.; Linder, J. A. Antimicrobial stewardship and public knowledge of antibiotics. *Lancet Infect. Dis.*, *15*, 1000-1001.

13. Ventola, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 2: Management Strategies and New Agents. *Pharmacy and Therapeutics*, **2015**, *40*, 344-352.

14. Abbott, A. *Medics braced for fresh superbug*. *Nature*. 2005 Aug 11;436(7052):758.

15. O'Neill, J. *Tackling Drug-resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations*; 2016.

16. Wainwright, M.; Maisch, T.; Nonell, S.; Plaetzer, K.; Almeida, A.; Tegos, G. P.; Hamblin, M. R. Photoantimicrobials-are we afraid of the light? *Lancet Infect. Dis.*, **2017**, *17*, e49-e55.

17. Hamblin, M. R.; Jori, G., Comprehensive series in photochemistry and photobiology. In *Photodynamic Inactivation of microbial pathogens: medical and environmental applications* [Online] Photobiology, E. S. F., Ed. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2011.

18. Friedrich, C. L.; Moyles, D.; Beveridge, T. J.; Hancock, R. E. W. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on Gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Ch.*, **2000**, *44* (8), 2086-2092.

19. Jori, G.; Fbris, C.; Soncin, M.; Ferro, S.; Coppellotti, O.; Dei, D.; Fantetti, L.; Chiti, G.; Roncucci, G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg. Med.*, **2006**, *38*, 468-481.

20. Nikaido, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*, **1994**, *44*, 382-388.

21. Leive, L. The barrier function of the Gram-negative envelope. *Ann. NY Acad. Sci.*, **1974**, *235* (1), 109-129.

22. 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.

23. Klaenhammer, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **1993**, *12*, 39-85.

24. Stiles, M. E.; Hastings, J. W. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Food Sci. Technol.*, **1991**, *2*, 235-263.

25. Jori, G.; Brown, S. B. Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2004**, 3 (5), 403-405.
26. Merchat, M.; Bertolini, G.; Giacomini, P.; Villaneuva, A.; Jori, G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B*, **1996**, 32(3), 153-157.
27. Bhatti, M.; Nair, S. P.; McRobert, A. J.; Henderson, B.; Shepherd, P.; Cridland, J.; Wilson, M. Identification of photolabile outer membrane proteins of *Porphyromonas gingivalis*. *Curr. Microbiol.*, **2001**, 43, 96-99.
28. Lambrechts, S. a. G.; Aalders, M. C. G.; Marle, J. V. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2005**, 49, 2026-2034.
29. Salmon-Divon, M.; Nitzan, Y.; Malik, Z. Mechanistic aspects of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by cationic tetra-meso(*N*-methyl-pyridyl)porphine. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2004**, 3, 423-429.
30. Tavares, A.; Carvalho, C. M. B.; Faustino, M. A.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, J. P. C.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. a. S.; Cunha, Â.; Gomes, N. C. M.; Alves, E.; Almeida, A. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Mar. Drugs*, **2010**, 8(1), 91-105.
31. Costa, L.; Tomé, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. a. S.; Faustino, M. a. F.; Cunha, Â.; Gomes, N. C. M.; Almeida, A. Evaluation of resistance development and viability recovery by a non-enveloped virus after repeated cycles of aPDT. *Antiviral Res.*, **2011**, 91, 278-282.
32. Koneman, E. W. A., S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C.; Winn, W. C. *Diagnóstico Microbiológico*. Quinta Edición ed.; Panamericana, M. Ed. Bs.As, Argentina, 1999.
33. Kluytmans, J.; Van Belkum, A.; Verbrugh, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.*, **1997**, 10, 505-520.
34. Iwase, T.; Uehara, Y.; Shinji, H. *Staphylococcus epidermidis* inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*, **2010**, 465, 346-349.
35. Deleo, F. R.; Otto, M.; Kreiswirth, B. N.; Chambers, H. F. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **2010**, 375, 1557-1568.

36. Chambers, H. F.; Deleo, R. F. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2009**, *7*, 629-641.
37. Stefani, S.; Goglio, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. *Int. J. Infect. Dis.*, **2010**, *14*, 19-22.
38. Williams, C.; Davis, D. L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* fomite survival. *Clin. Lab. Sci.*, **2009**, *22*, 34-38.
39. Huang, L.; Terakawa, M.; Zhiyentayev, T.; Huang, Y.-Y.; Sawayama, Y.; Jahnke, A.; Tegos, G. P.; Wharton, T.; Hamblin, M. R. Novel cationic fullerenes as broad spectrum light activated antimicrobials. *Nanomedicine*, **2010**, *6*, 442-452.
40. Ganz, R. A.; Viveiros, J.; Ahmadi, A.; Khalil, A.; Tolkoﬀ, M. J.; Nishioka, N. S.; Hamblin, M. R. Helicobacter pylori in patients can be killed by visible light. *Lasers Surg. Med.*, **2005**, *36*, 260-265.
41. Nitzan, Y.; Salmon-Divon, M.; Shporen, E.; Malik, Z. ALA-induced photodynamic effects on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2004**, *3*, 430-435.
42. Guffey, J. S.; Wilborn, J. Effects of combined 405 nm and 880 nm light on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Photomed. Laser Surg.* **2006**, *6*, 680-683.
43. Guffey, J. S.; Wilborn, J. In vitro bactericidal effects of 405 nm and 470 nm blue light. *Photomed. Laser Surg.* **2006**, *6*, 684-688.
44. Maclean, M.; Macgregor, S. J.; Anderson, J. G.; Woolsey, G. A. The role of oxygen in the visible light inactivation of *Staphylococcus aureus*. *J. Photochem. Photobiol. B*, **2008**, *92*, 180-184.
45. Blattner, F. R.; Plunkett, I. G.; Bloch, C. A.; Perna, N. T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J. D.; Rode, C. K.; Mayhew, G. F.; Gregor, J.; Davis, N. W.; Kirkpatrick, H. A.; Goeden, M. A.; Rose, D. J.; Mau, B.; Shao, Y. The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science*, **1997**, *277*, 1453-1462.
46. Papadopoulos, D.; Scheinder, D. S.; Meier-Eiss, J.; Arber, W.; Lenski, R.; Blot, M. Genomic evolution during a 10.000 generation experiment with bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1999**, *96*, 3807-3812.
47. Hernández, A. L.; Valdés, M. M.; Vivanco, D.; Silva, J. L. Z., Microbiología y parasitología médicas. In *Capítulo 26 - Enterobacterias* [Online] Médicas, C., Ed. El Vedado, Ciudad de la Habana, Cuba, 2001; pp. 251-280.

48. Brenner. B. , Manual of Systematic Bacteriology. Wilkins, W., Ed. Baltimore, USA, 1984.
49. Theuretzbacher, U. Global antibacterial resistance: the never-ending story. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, **2013**, *1* (2), 63-69.
50. Hamblin, M. R.; Hasan, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2004**, *3*(5), 436-450.
51. Nigam, A.; Gupta, D.; Sharma, A. Treatment of infectious disease: antibiotics and beyond. *Microbiol. Res.*, **2014**, *169*, 643-651.
52. Rios, A. C.; Moutinho, C. G.; Pinto, F. C.; Del Fiol, F. S.; Jozala, A.; Chaud, M. V.; Vila, M. M. D. C.; Teixeira, J. A.; Balcão, V. M. Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. *Microbiol. Res.*, **2016**, *191*, 51-80.
53. Chiosis, G.; Boneca, I. G. Selective cleavage of D-ala-D-lac by small molecules: re-sensitizing resistant bacteria to vancomycin. *Science*, **2001**, *293*, 1484-1487.
54. Sulakvelidze, A.; Alavidze, A. Z.; Morris, J. G. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2001**, *45*, 649-659.
55. Cleveland, J.; Montville, T. J.; Nes, I. F.; Chikindas, M. L. Bacteriocins safe, natural antimicro-bials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, **2001**, *71*, 1-20.
56. Williams, J. D. The Garrod lecture. Selective toxicity and concordant pharmacodynamics of antibiotics and other drugs. *J. Antimicrob. Chemother.*, **1995**, *35*, 721-737.
57. Jones, G. R. N. Successful cancer therapy with promethazine: the rationale. *Med. Hypotheses*, **1996**, *46*, 25-29.
58. Kristiansen, J. E.; Amaral, L. The potential management of resistant infections with non-antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.*, **1997**, *40*, 319-327.
59. Kristiansen, J. E. Antimicrobial activity of psychotherapeutic drugs and stereo-isomeric analogues. *Dan. Med. Bull.*, **1990**, *37*, 165-82.
60. Stockert, J. C.; Juarranz, A.; Villanueva, A.; Nonell, S.; Horobin, R. W.; Soltermann, A. T.; Durantini, E. N.; Rivarola, V.; Colombo, L. L.; Espada, J.; Cañete, M. Photodynamic Therapy: selective uptake of photosensitizing drugs into tumor cells. *Curr. Topics Pharmacol.*, **2004**, *8*, 185-217.
61. Villanueva, A.; Vidania, R.; Stockert, J. C.; Cañete, M.; Juarrans, A. Photodynamic effects on cultured tumor cells. Cytoskeleton alterations and cell death mechanisms. In

Handbook of Photochemistry and Photobiology., Publishers, A. S., Ed. 2002; Vol. 4, pp 79-117.

62. Yin, H.; Ye, X.; Li, Y.; Niu, Q.; Wang, C.; Ma, W. Evaluation of the effects of systemic photodynamic therapy in a rat model of acute myeloid leukemia. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2015**, *153*, 13-19.

63. Cisáriková, A.; Barbieriková, Z.; Janovec, L.; Imrich, J.; Hunáková, L.; Bacová, Z.; Paulíková, H. Acridin-3,6-dialkyldithiourea hydrochlorides as new photosensitizers for photodynamic therapy of mouse leukemia cells. *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, *24*, 2011-2022.

64. Oruba, Z.; Łabuz, P.; Macyk, W.; Chomyszyn-Gajewska, M. Antimicrobial photodynamic therapy-A discovery originating from the pre-antibiotic era in a novel periodontal therapy. *Photodiag. Photodyn. Ther.*, **2015**, *12*, 612-618.

65. Bonnett, R., Chemical aspects of photodynamic therapy. Gordon, Ed. Breach Science: Amsterdam, 2000.

66. Wainwright, W. Photoantimicrobials - a PACT against resistance and infection. *Drugs Future*, **2004**, *29*, 85-93.

67. Smith, K. M., Porphyrins and metalloporphyrins. Elsevier: Amsterdam, 1975.

68. Wilson, M.; Burns, T.; Pratten, J.; Pearson, G. J. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low power laser light in the presence of a photosensitizer. *J. Appl. Bacteriol.*, **1995**, *78* (5), 569-574.

69. Minnock, A.; Vernon, D. I.; Schofield, J.; Griffiths, J. J. H. P.; Brown, S. B. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B*, **1996**, *32* (3), 159-164.

70. Maisch, T.; Szeimies, R.; Jori, G.; Abels, C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2004**, *3*, 907-917.

71. O'riordan, K.; Akilov, O. E.; Hasan, T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiag. Photodyn. Therapy*, **2005**, *2*, 247-262.

72. Maisch, T.; Szeimies, R.-M.; Jori, G.; Abels, C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2004**, *3*, 907-917.

73. Oleinick, N.; Morris, R. L.; Belichenko, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2002**, *1*, 1-21.

74. Nowak-Ste Pniowska, A.; Maleki, M.; Wiktorska, K.; Romiszewska, A.; Padzik-Graczc, A. Inhibition of cell growth induced by photosensitizer PP(Arg)2-mediated photodynamic therapy in human breast and prostate cancer. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2011**, *8*, 39-48.
75. Freitas, L. F.; Hamblin, M. R., Antimicrobial photoinactivation with functionalized fullerenes. In *Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy*, Elsevier Inc.: 2016.
76. Soncin, M.; Fabris, C.; Buseti, A.; Dei, D.; Nistri, D.; Roncucci, G. Approaches to selectivity in the n(II)-phthalocyanine photosensitised inactivation of wild type and antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2002**, *1*, 815-819.
77. Gad, F.; Zahra, T.; Francis, K. P.; Hasan, T.; Hamblin, M. R. Targeted photodynamic therapy of established soft tissue infections in mice. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2004**, *3*, 451-458.
78. Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; R., H. M.; A., J.; Kessel, D.; Korbek, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J. Clin.*, **2011**, *61*, 250-281.
79. Yin, R.; Dai, T.; Avci, P.; Serafim, A. E.; Melo, W.; Vecchio, D.; Huang, Y. Y.; Gupta, A.; Hamblin, M. R. Light based anti-infectives: ultraviolet C irradiation, photodynamic therapy, blue light, and beyond. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2013**, *13*, 731-762.
80. Alves, E.; Faustino, M. a. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Cunha, A.; Nadais, H.; Almeida, A. Potencial applications of porphyrins un photodynamic inactivation beyond the medical scope. *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.*, **2015**, *22*, 34-57.
81. Maisch, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med. Sci.*, **2007**, *22*, 83-91.
82. Durantini, E. N. Photodynamic inactivation of bacteria. *Curr. Bioact. Compd.*, **2006**, *2*, 127-142.
83. O'riordan, K.; Akilov, O. E.; Hasan, T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiag. Photodyn. Therapy*, **2005**, *2* (4), 247-262.
84. Lauro, F. M.; Pretto, P.; Covolo, L.; Jori, G.; Bertoloni, G. Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycenepolylysine conjugates. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2002**, *1*, 468-470.

85. Huang, L.; Terakawa, M.; Zhiyentayev, T.; Huang, Y. Y.; Sawayama, Y.; Jahnke, A.; Tegos, G. P.; Wharton, T.; Hamblin, M. R. Innovative cationic fullerenes as broadspectrum light-activated antimicrobials. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.*, **2010**, *6*, 442-452.
86. Mora, S. J.; Cormick, M. P.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N. The photodynamic activity of a novel porphyrin derivative bearing a fluconazole structure in different media and against *Candida albicans*. *Dyes Pigm.*, **2010**, *87*, 234-240.
87. Simonetti, O.; Cirioni, O.; Orlando, F.; Alongi, C.; Lucarini, G.; Silvestri, C.; Zizzi, A.; Fantetti, L.; Roncucci, G.; Giacometti, A.; Offidani, A.; Provinciali, M. Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy with a single treatment of RLP068/Cl in an experimental model of *Staphylococcus aureus* wound infection. *Br. J. Dermatol.*, **2011**, *164*, 987-995.
88. Yin, R.; Wang, M.; Huang, Y.-Y.; Landi, G.; Vecchio, D.; Chiang, L. Y.; Hamblin, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation with decacationic functionalized fullerenes: Oxygen-independent photokilling in presence of azide and new mechanistic insights. *Free Radic. Biol. Med.*, **2015**, *79*, 14-27.
89. Bae, B.-C.; Yang, S.-G.; Jeong, S.; Lee, D. H.; Na, K.; Kim, J. M.; Costamagna, G.; Kozarek, R. A.; Isayama, H.; Deviere, J.; Seo, D. W.; Reddy, D. N. Polymeric photosensitizer-embedded self-expanding metal stent for repeatable endoscopic photodynamic therapy of cholangiocarcinoma. *Biomaterials* **2014**, *35*, 8487-8495.
90. Szacilowski, K.; Macyk, W.; Drzewiecka-Matuszek, A.; Brindell, M.; Stochel, G. Bioinorganic photochemistry: frontiers and mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *105*, 2647-2694.
91. Ochsner, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol. B*, **1997**, *39*, 1-18.
92. Vakrat-Haglili, Y.; Weiner, L.; Brumfeld, V.; Brandis, A.; Salomon, Y.; McIlroy, B.; Wilson, B. C.; Pawlak, A.; Rozanowska, M.; Sarna, T.; Scherz, A. The microenvironment effect on the generation of reactive oxygen species by Pd-bacteriopheophorbide. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 6487-6497.
93. Tanielian, C.; Mechin, R.; Seghrouchni, R.; Schweitzer, C. Mechanistic and kinetic aspects of photosensitization in the presence of oxygen. *Photochem. Photobiol.*, **2000**, *71*, 12-19.
94. Petroselli, G.; Dántola, M. L.; Cabrerizo, F. M.; Capparelli, A. L.; Lorente, C.; Oliveros, E.; Thomas, A. H. Oxidation of 2'-Deoxyguanosine 5'-Monophosphate

- photoinduced by pterin: Type I versus Type II mechanism. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 3001-3011.
95. Zhang, X.-F.; Guo, W. Imidazole functionalized magnesium phthalocyanine photosensitizer: modified photophysics, singlet oxygen generation and photooxidation mechanism. *J. Phys. Chem. A*, **2012**, *116*, 7651-7657.
96. Huang, L.; Xuan, Y.; Koide, Y.; Zhiyentayev, T.; Tanaka, M.; Hamblin, M. R. Type I and type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in-vitro study on Gram-negative and gram-positive bacteria. *Lasers Surg. Med.*, **2012**, *44*, 490-499.
97. Castano, A.; Demidova, T.; Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiag. Photodyn. Ther.*, **2004**, *1*, 279-293.
98. Singleton, D. A.; Hang, C.; Szymanski, M. J.; Meyer, M. P.; Leach, A. G.; Kuwata, K. T.; Chen, J. S.; Greer, A.; Foote, C. S.; Houk, K. N. Mechanism of ene reactions of singlet oxygen. A two step no intermediate mechanism. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 1319 - 1328.
99. Wu, L.; Hong, T. Y.; Vogt, F. G. Structural analysis of photo-degradation in thiazole containing compounds by LC-MS/MS and NMR. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2007**, *44*, 763-772.
100. Davis, M. J. Singlet oxygen mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2003**, *305*, 761-770.
101. Silvester, J. A.; Timmins, G. S.; Davies, M. J. Protein hydroperoxides and carbonyl groups generated by porphyrin induced photo-oxidation of bovine serum albumin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1998**, *350*, 249-258.
102. Lledias, F.; Hansberg, W. Oxidation of Human Catalase by Singlet Oxygen in Myeloid Leukemia Cells. *Photochem. Photobiol.*, **1999**, *70*, 887-892.
103. Korytowski, W.; Girotti, A. W. Singlet oxygen adducts of cholesterol: photogeneration and reductive turnover in membrane systems. *Photochem. Photobiol.*, **1999**, *70*, 484-489.
104. Cadet, J.; Ravanat, J. L.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. Singlet oxygen oxidation of isolated and cellular DNA: product formation and mechanistic insights. *Photochem. Photobiol.*, **2006**, *82*, 1219-1225.
105. Stockert, J. C.; Juarranz, A.; Villanueva, A.; Nonell, S.; Horobin, R. W.; Soltermann, A. T.; Durantini, E. N.; Rivarola, V.; Colombo, L. L.; Espada, J.; Cañete, M.

- Photodynamic Therapy: selective uptake of photosensitizing drugs into tumor cells. *Curr. Topics Pharmacol.*, **2004**, 8, 185-217.
106. Leach, A. G.; Houk, K. N. Diels-Alder and ene reactions of singlet oxygen, nitroso compounds and triazolinediones: transition states and mechanisms from contemporary theory. *Chem. Commun.*, **2002**, 0, 1243-1255.
107. Fudickar, W.; Linker, T. Remote substituent effects on the photooxygenation of 9,10-diarylanthracenes: strong evidence for polar intermediates. *Chem. Commun.*, **2008**, 15, 1771-1773.
108. Fudickar, W.; Linker, T. Intermediates in the formation and thermolysis of peroxides from oxidations with singlet oxygen. *Aust. J. Chem.*, **2013**, 67, 320-327.
109. McCallum, J. E. B.; Kuniyoshi, C. Y.; Foote, C. S. Characterization of 5-hydroxy-8-oxo-7,8-dihydroguanosine in the photosensitized oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine and its rearrangement to spiroiminodihydantoin. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 16777-16782.
110. Yin, R.; Dai, T.; Avci, P.; Jorge, A. E. S.; De Melo, W. C.; Vecchio, D.; Huang, Y.-Y.; Gupta, A.; Hamblin, M. R. Light based anti-infectives: ultraviolet C irradiation, photodynamic therapy, blue light, and beyond. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2013**, 13, 731-762.
111. Durantini, E. N. New insights into the antimicrobial blue light inactivation of *Candida albicans*. *Virulence*, **2016**, 7, 493-494.
112. Bonett, R. *Chemical aspects of photodynamic therapy*. Gordon and Breach Science Publishers. Amsterdam, 2000.
113. Wainwright, M.; Crossley, K. B. Photosensitising agents—circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **2004**, 53, 119-126.
114. Ogilby, P. R. Singlet oxygen: there is still something new under the sun, and it is better than ever. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2010**, 9, 1543-1560.
115. Meng, S.; Xu, Z.; Hong, G.; Zhao, L.; Zhao, Z.; Guo, J.; Ji, H.; Liu, T. Synthesis, characterization and in vitro photodynamic antimicrobial activity of basic amino acid porphyrin conjugates. *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, 92, 35-48.
116. Hunter, C. A.; Sanders, J. K. M. The nature of π - π interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 5525-5534.

117. Hotze, E. M.; Labille, J.; Alvarez, P.; Wiesner, M. R. Mechanisms of photochemistry and reactive oxygen production by fullerene suspensions in water. *Environ. Sci. Technol.*, **2008**, *42*, 4175-4180.
118. Akhtar, N.; Khan, R. A. Liposomal systems as viable drug delivery technology for skin cancer sites with an outlook on lipid-based delivery vehicles and diagnostic imaging inputs for skin conditions'. *Prog. Lipid Res.*, **2016**, *64*, 192-230.
119. Villa, C. H.; Anselmo, A. C.; Mitragotri, S.; Muzykantov, V. Red blood cells: Supercarriers for drugs, biologicals, and nanoparticles and inspiration for advanced delivery systems. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **2016**, *106*, 88-103.
120. Mora, S. J.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N. Spectroscopic and photodynamic properties of 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-N,N-dimethylaminopropoxy)phenyl]porphyrin and its tetracationic derivative in different media. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **2013**, *270*, 75-84.
121. Hanakova, A.; Bogdanova, K.; Tomankova, K.; Pizova, K.; Malohlava, J.; Binder, S.; Bajgar, R.; Langova, K.; Kolar, M.; Mosinger, J.; Kolarova, H. The application of antimicrobial photodynamic therapy on *S. aureus* and *E. coli* using porphyrin photosensitizers bound to cyclodextrin. *Microbiol. Res.*, **2014**, *169*, 163-170.
122. Lim, M. E.; Lee, Y. L.; Zhang, Y.; Chu, J. J. Photodynamic inactivation of viruses using upconversion nanoparticles. *Biomaterials*, **2012**, *33*, 1912-20.
123. Ochoa, A. L.; Tempesti, T. C.; Spesia, M. B.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N. Synthesis and photodynamic properties of adamantylethoxy Zn(II) phthalocyanine derivatives in different media and in human red blood cells. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, *50*, 280-287.
124. Li, K.; Lei, W.; Jiang, G.; Hou, Y.; Zhang, B.; Zhou, Q.; Wang, X. Selective Photodynamic Inactivation of Bacterial Cells over Mammalian Cells by New Triarylmethanes. *Langmuir*, **2014**, *30(48)*, 14573-14580.
125. Ferreyra, D. D.; Reynoso, E.; Cordero, P.; Spesia, M. B.; Alvarez, M. G.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N. Synthesis and properties of 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-N,N-dimethylaminopropoxy)phenyl] chlorin as potential broad-spectrum antimicrobial photosensitizers. *J Photochem Photobiol B*, **2016**, *158*, 243-51.
126. Gad, F.; Zahra, T.; Francis, K. P.; Hasan, T.; Hamblin, M. R. Targeted photodynamic therapy of established soft-tissue infections in mice. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2004**, *3*, 451-458.

127. Kim, J.; Santos, O. A.; Park, J. H. Selective photosensitizer delivery into plasma membrane for effective photodynamic therapy. *J. Control. Release.*, **2014**, *191*, 98-104.
128. Minnock, A.; Vernon, D. I.; Schofield, J.; Griffiths, J.; Parish, J. H.; Brown, S. B. Mechanism of uptake of a cationic water soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2000**, *44*, 522-527.
129. Sharma, S. K.; Dai, T.; Kharkwal, G. B.; Huang, Y.-Y.; Huang, L.; Bil De Arce, V. J.; Tegos, G. P.; Hamblin, M. R. Drug discovery of antimicrobial photosensitizers using animal models. *Curr. Pharm. Des.*, **2011**, *17*, 1303-1319.
130. Simões, C.; Gomes, M. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Cunha, Â.; Tomé, J. P. C.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. a. S.; Almeida, A.; Faustino, M. a. F. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* with cationic meso-tetraarylporphyrins – The charge number and charge distribution effects. *Catal. Today*, **2016**, *266*, 197-204.
131. Hamblin, M. R.; O'donnell, D. A.; Murthy, N.; Rajagopalan, K.; Michaud, N.; Sherwood, M. E.; Hasan, T. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2002**, *49*, 941-951.
132. Tegos, G. P.; Anbe, M.; Yang, C.; Demidova, T. N.; Satti, M.; Mroz, P.; Janjua, S.; Gad, F.; Hamblin, M. R. Protease stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorin(e6) for broad spectrum antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2006**, *50*, 1402-1410.
133. Bombelli, C.; Bordi, F.; Ferro, S.; Giansanti, L.; Jori, G.; Mancini, G.; Mazzuca, C.; Monti, D.; Ricchelli, F.; Sennato, S.; Venanzi, M. New cationic liposomes as vehicles of m-tetrahydroxyphenylchlorin in photodynamic therapy of infectious diseases. *Mol. Pharm.*, **2008**, *5*, 672-679.
134. Perni, S.; Piccirillo, C.; Pratten, J.; Prokopovich, P.; Chrzanowski, W.; Parkin, I. P.; Wilson, M. The antimicrobial properties of light-activated polymers containing methylene blue and gold nanoparticles. *Biomaterials*, **2009**, *30*, 89-93.
135. Gualdesi, M. S.; Alvarez Igarzabal, C. I.; Vara, J.; Ortiz, C. S. Synthesis and physicochemical properties of polyacrylamide nanoparticles as photosensitizer carriers. *Int. J. Pharm.*, **2016**, *512*, 213-218.

136. Rout, B.; Liu, C.-H.; Wu, W.-C. Enhancement of photodynamic inactivation against *Pseudomonas aeruginosa* by a nano-carrier approach. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2016**, *140*, 472-480.
137. Milanesio, M. E.; Spesia, M. B.; Cormick, M. P.; Durantini, E. N. Mechanistic studies on the photodynamic effect induced by a dicationic fullerene C₆₀ derivative on *Escherichia coli* and *Candida albicans* cells. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2013**, *10*, 320-327.
138. Ferreyra, D. D.; Spesia, M. B.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N. Synthesis and photodynamic properties of 5,10,15,20-tetrakis[3-(*N*-ethyl-*N*-methylcarbazoyl)]chlorin and its analogous porphyrin in solution and in human red blood cells. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, **2014**, *282*, 16-24.
139. Wainwright, M.; Phoenix, D. A.; Marland, J.; Wareing, D. R.; Bolton, F. J. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. *Immunol. Med. Microbiol.*, **1997**, *19*, 75-80.
140. Maisch, T. Strategies to optimize photosensitizers for photodynamic inactivation of bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2015**, *150*, 2-10.
141. Alvarez, M. G.; Montes De Oca, M. N.; Milanesio, M. E.; Ortiz, C. S.; Durantini, E. N. Photodynamic properties and photoinactivation of *Candida albicans* mediated by brominated derivatives of triarylmethane and phenothiazinium dyes. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **2014**, *11*, 148-155.
142. Huang, L.; Krayerd, M.; Roubilb, J. G. S.; Huang, Y.-Y.; Holtene, D.; Lindsey, J. S.; Hamblin, M. R. Stable synthetic mono-substituted cationic bacteriochlorins mediate selective broad-spectrum photoinactivation of drug-resistant pathogens at nanomolar concentrations. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2014**, *141*, 119-127.
143. Cieplik, F.; Späth, A.; Regensburger, J.; Gollmer, A.; Tabenski, A.; Hiller, K.-A.; Bäuml, W.; Maisch, T. Photodynamic biofilm inactivation by SAPYR—An exclusive singlet oxygen photosensitizer. *Free Radic. Biol. Med.*, **2013**, *65*, 477-487.
144. Maisch, T.; Eichner, A.; Späth, A.; Gollmer, A.; König, B.; Regensburger, J.; Bäuml, W. Fast and effective photodynamic inactivation of multiresistant bacteria by cationic riboflavin derivatives. *PLoS One*, **2014**, *9*, 111792.
145. Winter, S.; Tortik, N.; Kubin, A.; Krammer, B.; Plaetzer, K. Back to the roots: photodynamic inactivation of bacteria based on water-soluble curcumin bound to polyvinylpyrrolidone as a photosensitizer. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2013**, *12*, 1795-1802.

146. Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. C₆₀: Buckminsterfullerene Environmental Science and Technology. *Nature* **1985**, *318*, 162.
147. Kratschmer, W.; Lamb, L. D.; Fostiropoulos, K.; Huffman, D. R. Solid C₆₀: a new form of carbon. *Nature*, **1990**, *347*, 354.
148. Diederich, F.; Isaacs, L.; Philp, D. Syntheses, structures, and properties of methanofullerenes. *Chem. Soc. Rev.*, **1994**, *23*, 243-255.
149. Prato, M. [60]Fullerene chemistry for materials science applications. *J. Mater. Chem.*, **1997**, *7*, 1097-1109.
150. Da Ros, T.; Prato, M. Medicinal chemistry with fullerenes and fullerene derivatives. *Chem. Commun.*, **1999**, 663-669.
151. El-Khouly, M. E.; Ito, O.; Smith, P. M.; D'souza, F. Intermolecular and supramolecular photoinduced electron transfer processes of fullerene-porphyrin/phthalocyanine systems. *J. Photochem. Photobio. C*, **2004**, *5*, 79-104.
152. Castro, E.; Garcia, A. H.; Zavala, G.; Echegoyen, L. Fullerenes in biology and medicine. *J. Mat. Chem. B*, **2017**, *5*, 6523-6535.
153. Prato, M.; Maggini, M. Fulleropyrrolidines: A family of full-fledged fullerene derivatives. *Acc. Chem. Res.*, **1998**, *31*, 519-526.
154. Cataldo, F.; Da Ros, T. Medicinal chemistry and pharmacological potential of fullerenes and carbon nanotubes. In *Carbon Materials: Chemistry and Physics*, Springer Science+Business Media: 2008; Vol. 1.
155. Sharma, S. K.; Chiang, L. Y.; Hamblin, M. R. Photodynamic therapy with fullerenes in vivo: reality or a dream? *Nanomedicine*, **2011**, *6*, 1813-1825.
156. Tegos, G. P.; Demidova, T. N.; Arcila-Lopez, D.; Lee, H.; Wharton, T.; Gali, H.; Hamblin, M. R. Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers. *Chem. Biol.*, **2005**, *12*, 1127-1135.
157. Milanesio, M. E.; Durantini, E. N. Fullerene derivatives as antimicrobial photosensitizing agents. In *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications*, The Royal Society of Chemistry: 2011; Vol. 11, pp 161-184.
158. Spesia, M. B.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N. Synthesis, properties and photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel cationic fullerene C₆₀ derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, *43*, 853-861.

159. Huang, L.; Terakawa, M.; Zhiyentayev, T.; Huang, Y.-Y.; Sawayama, Y.; Jahnke, A.; Tegos, G. P.; Wharton, T.; Hamblin, M. R. Innovative cationic fullerenes as broad-spectrum light-activated antimicrobials. *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.*, **2010**, *6*, 442-452.
160. Alargova, R. G.; Deguchi, S.; Tsujii, K. Stable colloidal dispersions of fullerenes in polar organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 10460-10467.
161. Brant, J. A.; Labille, J.; Bottero, J.-Y.; Wiesner, M. R. Characterizing the impact of preparation method on fullerene cluster structure and chemistry. *Langmuir*, **2006**, *22*, 3878-3885.
162. Oberdörster, E.; Zhu, S.; Blickley, T. M.; McClellan-Green, P.; Haasch, M. L. Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C₆₀) on aquatic organisms. *Carbon*, **2006**, *44*, 1112-1120.
163. Deguchi, S.; Alargova, R. G.; Tsujii, K. Stable dispersions of fullerenes, C₆₀ and C₇₀, in water. Preparation and characterization. *Langmuir*, **2001**, *17*, 6013-6017.
164. Andrievsky, G. V.; Kosevich, M. V.; Vovk, O. M.; Shelkovsky, V. S.; Vashchenko, L. A. On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 1281-1282.
165. Braun, T.; Buvári-Barcza, Á.; Barcza, L.; Konkoly-Thege, I.; Fodor, M.; Migali, B. Mechanochemistry: a novel approach to the synthesis of fullerene compounds. Water soluble buckminsterfullerene - γ -cyclodextrin inclusion complexes via a solid-solid reaction. *Solid State Ionics*, **1994**, *74*, 47-51.
166. Janot, J.-M.; Bienvenue, E.; Seta, P.; Bensasson, R. V.; Tome, A. C.; Enes, R. F.; Cavaleiro, J. a. S.; Leach, S.; Camps, X.; Hirsch, A. [60]Fullerene and three [60]fullerene derivatives in membrane model environments. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2000**, 301-306.
167. Makha, M.; Purich, A.; Raston, C. L.; Sobolev, A. N. Structural diversity of host-guest and intercalation complexes of fullerene C₆₀. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2006**, *2006*, 507-517.
168. Ikeda, A.; Mae, T.; Ueda, M.; Sugikawa, K.; Shigeto, H.; Funabashi, H.; Kuroda, A.; Akiyama, M. Improved photodynamic activities of liposome-incorporated [60]fullerene derivatives bearing a polar group. *Chem. Commun.*, **2017**, *53*, 2966-2969.
169. Chiang, L. Y.; Wang, L.-Y.; Swirczewski, J. W.; Soled, S.; Cameron, S. Efficient synthesis of polyhydroxylated fullerene derivatives via hydrolysis of polycyclosulfated precursors. *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 3960-3968.

170. Da Ros, T.; Prato, M.; Novello, F.; Maggini, M.; Banfi, E. Easy access to water-soluble fullerene derivatives via 1,3-dipolar cycloadditions of azomethine ylides to C₆₀. *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 9070-9072.
171. Brettreich, M. H., Andreas. A highly water-soluble dendro[60]fullerene. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 2731-2734.
172. Milanesio, M. E.; Alvarez, M. G.; Silber, J. J.; Rivarola, V.; Durantini, E. N. Photodynamic activity of monocationic and non-charged methoxyphenylporphyrin derivatives in homogeneous and biological media. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2003**, *2*, 926-933.
173. Katz, E. A., Fullerene thin films as photovoltaic material. In *Nanostructured Materials for Solar Energy Conversion*, Soga, T., Ed. Elsevier B. V.: 2006.
174. Krätschmer, W.; Lamb, L. D.; Fostiropoulos, K.; Huffman, D. R. Solid C₆₀: a new form of carbon. *Nature*, **1990**, *347*.
175. Otero, G.; Biddau, G.; Sánchez-Sánchez, C.; Caillard, R.; López, M. F.; Rogero, C.; Palomares, F. J.; Cabello, N.; Basanta, M. A.; Ortega, J.; Méndez, J.; Echavarren, A. M.; Pérez, R.; Gómez-Lor, B.; Martín-Gago, J. A. Fullerenes from aromatic precursors by surface-catalysed cyclodehydrogenation. *Nature*, **2008**, *454*, 865-869.
176. Gómez-Lor, B.; Echavarren, A. M. Synthesis of a triaza analogue of crushed-fullerene by intramolecular palladium-catalyzed arylation. *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 2993-2996.
177. Hirsch, A. *The Chemistry of the Fullerenes*. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, Germany, 1994.
178. Wudl, F. The chemical properties of buckminsterfullerene (C₆₀) and the birth and infancy of fullerooids. *Acc. Chem. Res.*, **1992**, *25*, 157-161.
179. Maggini, M.; Scorrano, G.; Prato, M. Addition of azomethine ylides to C₆₀: synthesis, characterization, and functionalization of fullerene pyrrolidines. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 9798-9799.
180. Wilson, S. R.; Lu, Q. 1,3-dipolar cycloaddition of n-methylazomethine ylide to C₇₀. *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 6496-6498.
181. Mroz, P.; Tegos, G. P.; Gali, H.; Wharton, T.; Sarna, T.; Hamblin, M. R. Photodynamic therapy with fullerenes. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2007**, *6*, 1139-1149.
182. Prato, M.; Maggini, M.; Scorrano, G. Synthesis and applications of fulleropyrrolidines. *Synth. Met.*, **1996**, *77*, 89-91.

183. Guldi, D. M.; Prato, M. Excited-state properties of C₆₀ fullerene derivatives. *Acc. Chem. Res.*, **2000**, *33*, 695-703.
184. Guldi, D. M.; Asmus, K.-D. Photophysical properties of mono- and multiply-functionalized fullerene derivatives. *J. Phys. Chem. A*, **1997**, *101*, 1472-1481.
185. Sun, Y. P.; Wang, P.; Hamilton, N. B. Fluorescence spectra and quantum yields of buckminsterfullerene (C₆₀) in room-temperature solutions. No excitation wavelength dependence. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 6378-6381.
186. Guldi, D. M.; Maggini, M.; Scorrano, G.; Prato, M. Intramolecular electron transfer in fullerene/ferrocene based donor-bridge-acceptor dyads. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 974-980.
187. Eckert, J.-F.; Nicoud, J.-F.; Nierengarten, J.-F.; Liu, S.-G.; Echegoyen, L.; Barigelletti, F.; Armaroli, N.; Ouali, L.; Krasnikov, V.; Hadziioannou, G. Fullerene-oligophenylenevinylene hybrids: Synthesis, electronic properties, and incorporation in photovoltaic devices. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 7467-7479.
188. Thomas, K. G.; Biju, V.; George, M. V.; Guldi, D. M.; Kamat, P. V. Excited-state interactions in pyrrolidinofullerenes. *J. Phys. Chem. A*, **1998**, *102*, 5341-5348.
189. Yamakoshi, Y.; Sueyoshi, S.; Fukuhara, K.; Miyata, N.; Masumizu, T.; Kohno, M. [•]OH and O₂^{-•} generation in aqueous C₆₀ and C₇₀ solutions by photoirradiation: An EPR study. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 12363-12364.
190. Arbogast, J. W.; Darmany, A. P.; Foote, C. S.; Diederich, F. N.; Whetten, R. L.; Rubin, Y.; Alvarez, M. M.; Anz, S. J. Photophysical properties of sixty atom carbon molecule (C₆₀). *J. Phys. Chem.*, **1991**, *95*, 11-12.
191. Hamano, T.; Okuda, K.; Mashino, T.; Hirobe, M.; Arakane, K.; Ryu, A.; Mashiko, S.; Nagano, T. Singlet oxygen production from fullerene derivatives: effect of sequential functionalization of the fullerene core. *Chem. Commun.*, **1997**, 21-22.
192. Hung, R. R.; Grabowski, J. J. A precise determination of the triplet energy of carbon (C₆₀) by photoacoustic calorimetry. *J. Phys. Chem.*, **1991**, *95*, 6073-6075.
193. Yamakoshi, Y.; Umezawa, N.; Ryu, A.; Arakane, K.; Miyata, N.; Goda, Y.; Masumizu, T.; Nagano, T. Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C₆₀) as potential medicines: O₂^{-•} versus ¹O₂. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 12803-12809.
194. Koeppe, R.; Sariciftci, N. S. Photoinduced charge and energy transfer involving fullerene derivatives. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2006**, *5*, 1122-1131.

195. Arbogast, J. W.; Foote, C. S.; Kao, M. Electron transfer to triplet fullerene C₆₀. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 2277-2279.
196. Milanesio, M. E.; Spesia, M. B.; Cormick, M. P.; Durantini, E. N. Mechanistic studies on the photodynamic effect induced by a dicationic fullerene C₆₀ derivative on Escherichia coli and Candida albicans cells. *Photodiag. Photodyn. Therapy*, **2013**, *10*, 320-327.
197. Kasimova, K. R.; Sadasivam, M.; Landi, G.; Sarna, T.; Hamblin, M. R. Potentiation of photoinactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria mediated by six phenothiazinium dyes by addition of azide ion. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2014**, *13*, 1541-1548.
198. Huang, L.; Xuan, Y.; Koide, Y.; Zhiyentayev, T.; Tanaka, M.; Hamblin, M. R. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Lasers. Surg. Med.*, **2012**, *44*, 490-499.
199. Zhang, Y.; Dai, T.; Wang, M.; Vecchio, D.; Chiang, L. Y.; Hamblin, M. R. Potentiation of antimicrobial photodynamic inactivation mediated by a cationic fullerene by added iodide: in vitro and in vivo studies. *Nanomedicine*, **2015**, *10*, 603-614.
200. St Denis, T. G.; Vecchio, D.; Zadlo, A.; Rineh, A.; Sadasivam, M.; Avci, P.; Huang, L.; Kozinska, A.; Chandran, R.; Sarna, T.; Hamblin, M. R. Thiocyanate potentiates antimicrobial photodynamic therapy: In situ generation of the sulfur trioxide radical anion by singlet oxygen. *Free Radical Biol. Med.*, **2013**, *65*, 800-810.
201. Kashef, N.; Huang, Y.-Y.; Hamblin Michael, R., Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale. In *Nanophotonics*, 2017; Vol. 6, pp 853- 879.
202. Huang, L.; St. Denis, T. G.; Xuan, Y.; Huang, Y.-Y.; Tanaka, M.; Zadlo, A.; Sarna, T.; Hamblin, M. R. Paradoxical potentiation of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic inactivation by sodium azide: Role of ambient oxygen and azide radicals. *Free Radical Biol. Med.*, **2012**, *53*, 2062-2071.
203. De Freitas, L. F.; Hamblin, M. R. Chapter 1 - Antimicrobial photoinactivation with functionalized fullerenes A2 - Grumezescu, Alexandru Mihai. In *Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy*, William Andrew Publishing: 2016; pp 1-27.
204. Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2005**, *49*, 2329-2335.
205. Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.;

- Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J. Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: a cancer journal for clinicians*, **2011**, *61*, 250-281.
206. Burgess, D. J. Nanotechnology: Tissue penetration of photodynamic therapy. *Nat. Rev. Cancer*, **2012**, *12*, 737-737.
207. Jacques, S. L. Optical properties of biological tissues: a review. *Phys. Med. Biol.*, **2013**, *58*, 0031-9155.
208. Allison, R. R.; Sibata, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiag. Photodyn. Therapy*, **2010**, *7*, 61-75.
209. Tuchin, V. V.; Wang, R. K.; Yeh, A. T. Optical Clearing of Tissues and Cells. *J. Biomed. Opt.*, **2008**, *13*, 021101.
210. Jiang, J.; Boese, M.; Turner, P.; Wang, R. K. Penetration kinetics of dimethyl sulphoxide and glycerol in dynamic optical clearing of porcine skin tissue in vitro studied by Fourier transform infrared spectroscopic imaging. *J. Biomed. Opt.*, **2008**, *13*, 021105-7.
211. Karotki, A.; Khurana, M.; Lepock, J. R.; Wilson, B. C. Simultaneous Two-photon Excitation of Photofrin in Relation to Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.*, **2006**, *82*, 443-452.
212. Tang, C.; Hu, P.; Ma, E.; Huang, M.; Zheng, Q. Heavy atom enhanced generation of singlet oxygen in novel indenofluorene-based two-photon absorbing chromophores for photodynamic therapy. *Dyes Pigm.*, **2015**, *117*, 7-15.
213. Kachynski, A. V.; Plissa; Kuzmin, A. N.; Ohulchanskyy, T. Y.; Baeva; Quj; Prasad, P. N. Photodynamic therapy by in situ nonlinear photon conversion. *Nat. Photon.*, **2014**, *8*, 455-461.
214. Zaragoza-Galán, G.; Ortíz-Palacios, J.; Valderrama, B.; Camacho-Dávila, A.; Chávez-Flores, D.; Ramos-Sánchez, V.; Rivera, E. Pyrene-Fullerene C60 Dyads as Light-Harvesting Antennas. *Molecules*, **2014**, *19*, 352.
215. Liu, Y.; Zhao, J. Visible light-harvesting perylenebisimide-fullerene (C60) dyads with bidirectional "ping-pong" energy transfer as triplet photosensitizers for photooxidation of 1,5-dihydroxynaphthalene. *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 3751-3753.
216. Wu, W.; Zhao, J.; Sun, J.; Guo, S. Light-Harvesting Fullerene Dyads as Organic Triplet Photosensitizers for Triplet-Triplet Annihilation Upconversions. *J. Org. Chem.*, **2012**, *77*, 5305-5312.
217. Baffreau, J.; Leroy-Lhez, S.; Nguyen, V. A.; Williams, R. M.; Hudhomme, P. Fullerene C60-perylene-3,4:9,10-bis(dicarboximide) light-harvesting dyads: spacer-length

and bay-substituent effects on intramolecular singlet and triplet energy transfer. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, **2008**, *14*, 4974-92.

218. Chiang, L. Y.; Padmawar, P. A.; Rogers-Haley, J. E.; So, G.; Canteenwala, T.; Thota, S.; Tan, L.-S.; Pritzker, K.; Huang, Y.-Y.; Sharma, S. K.; Kurup, D. B.; Hamblin, M. R.; Wilson, B.; Urbas, A. Synthesis and characterization of highly photoresponsive fullereryl dyads with a close chromophore antenna–C(60) contact and effective photodynamic potential. *J. Mater. Chem.*, **2010**, *20*, 5280-5293.

219. Maligaspe, E.; Tkachenko, N. V.; Subbaiyan, N. K.; Chitta, R.; Zandler, M. E.; Lemmetyinen, H.; D'souza, F. Photosynthetic Antenna–Reaction Center Mimicry: Sequential Energy- and Electron Transfer in a Self-assembled Supramolecular Triad Composed of Boron Dipyrin, Zinc Porphyrin and Fullerene. *J. Phys. Chem. A*, **2009**, *113*, 8478-8489.

220. D'souza, F.; Wijesinghe, C. A.; El-Khouly, M. E.; Hudson, J.; Niemi, M.; Lemmetyinen, H.; Tkachenko, N. V.; Zandler, M. E.; Fukuzumi, S. Ultrafast excitation transfer and charge stabilization in a newly assembled photosynthetic antenna-reaction center mimic composed of boron dipyrin, zinc porphyrin and fullerene. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, *13*, 18168-18178.

221. Kuciauskas, D.; Liddell, P. A.; Lin, S.; Johnson, T. E.; Weghorn, S. J.; Lindsey, J. S.; Moore, A. L.; Moore, T. A.; Gust, D. An Artificial Photosynthetic Antenna-Reaction Center Complex. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 8604-8614.

222. Price, S. C.; Stuart, A. C.; Yang, L.; Zhou, H.; You, W. Fluorine Substituted Conjugated Polymer of Medium Band Gap Yields 7% Efficiency in Polymer–Fullerene Solar Cells. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 4625-4631.

223. Otero, M.; Dittrich, T.; Rappich, J.; Heredia, D. A.; Fungo, F.; Durantini, E.; Otero, L. Photoinduced charge separation in organic-inorganic hybrid system: C60-containing electropolymer / CdSe-quantum dots. *Electrochim. Acta*, **2015**, *173*, 316-322.

224. Boyd, P. D. W.; Reed, C. A. Fullerene–Porphyrin Constructs. *Acc. Chem. Res.*, **2004**, *38*, 235-242.

225. Durantini, J.; Suarez, M. B.; Santo, M.; Durantini, E.; Dittrich, T.; Otero, L.; Gervaldo, M. Photoinduced Charge Separation in Organic–Organic Heterojunctions Based on Porphyrin Electropolymers. Spectral and Time Dependent Surface Photovoltage Study. *J. Phys. Chem. C*, **2015**, *119*, 4044-4051.

226. Fungo, F.; Otero, L.; Borsarelli, C. D.; Durantini, E. N.; Silber, J. J.; Sereno, L. Photocurrent generation in thin SnO₂ nanocrystalline semiconductor film electrodes from photoinduced charge separation state in porphyrin-C₆₀ dyad. *J. Phys. Chem. B*, **2002**, *106*, 4070-4078.
227. Milanesio, M. E.; Alvarez, M. G.; Rivarola, V.; Silber, J. J.; Durantini, E. N. Porphyrin-fullerene C₆₀ dyads with high ability to form photoinduced charge-separated state as novel sensitizers for photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, **2005**, *81*, 891-7.
228. Alvarez, M. G.; Prucca, C.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N.; Rivarola, V. Photodynamic activity of a new sensitizer derived from porphyrin-C₆₀ dyad and its biological consequences in a human carcinoma cell line. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2006**, *38*, 2092-2101.
229. Ballatore, M. B.; Spesia, M. B.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N. Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of porphyrin-fullerene C₆₀ dyads with application in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**.
230. Padmawar, P. A.; Canteenwala, T.; Verma, S.; Tan, L.-S.; Chiang, L. Y. Synthesis and characterization of photoresponsive diphenylaminofluorene chromophore adducts of [60]fullerene. *J. Mater. Chem.*, **2006**, *16*, 1366-1378.
231. El-Khouly, M. E.; Padmawar, P.; Araki, Y.; Verma, S.; Chiang, L. Y.; Ito, O. Photoinduced Processes in a Tricomponent Molecule Consisting of Diphenylaminofluorene–Dicyanoethylene–Methano[60]fullerene. *J. Phys. Chem. A*, **2006**, *110*, 884-891.
232. Yin, R.; Wang, M.; Huang, Y.-Y.; Huang, H.-C.; Avci, P.; Chiang, L. Y.; Hamblin, M. R. Photodynamic therapy with decacationic [60]fullerene monoadducts: effect of a light absorbing electron-donor antenna and micellar formulation. *Nanomedicine: NBM*, **2014**, *10*, 795-808.
233. Treibs, A.; Kreuzer, F.-H. Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, **1968**, *718*, 208-223.
234. Moss, G. P. Nomenclature of tetrapyrroles. *Eur. J. Biochem.*, **1988**, *178*, 277-328.
235. Tram, K.; Yan, H.; Jenkins, H. A.; Vassiliev, S.; Bruce, D. The synthesis and crystal structure of unsubstituted 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY). *Dyes Pigm.*, **2009**, *82*, 392-395.

236. Schmitt, A.; Hinkeldey, B.; Wild, M.; Jung, G. Synthesis of the core compound of the BODIPY dye class: 4,4'-difluoro-4-bora-(3a,4a)-diazas-indacene. *J. Fluoresc.*, **2009**, *19*, 755-8.
237. Benniston, A. C.; Copley, G. Lighting the way ahead with boron dipyrromethene (Bodipy) dyes. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2009**, *11*, 4124-4131.
238. Zhang, D.; Martin, V.; Garcia-Moreno, I.; Costela, A.; Perez-Ojeda, M. E.; Xiao, Y. Development of excellent long-wavelength BODIPY laser dyes with a strategy that combines extending [small pi]-conjugation and tuning ICT effect. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, *13*, 13026-13033.
239. Krumova, K.; Greene, L. E.; Cosa, G. Fluorogenic α -Tocopherol Analogue for Monitoring the Antioxidant Status within the Inner Mitochondrial Membrane of Live Cells. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 17135-17143.
240. Lee, J.-J.; Lee, S.-C.; Zhai, D.; Ahn, Y.-H.; Yeo, H. Y.; Tan, Y. L.; Chang, Y.-T. Bodipy-diacrylate imaging probes for targeted proteins inside live cells. *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 4508-4510.
241. Kowada, T.; Maeda, H.; Kikuchi, K. BODIPY-based probes for the fluorescence imaging of biomolecules in living cells. *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, *44*, 4953-4972.
242. Maindron, N.; Ipuy, M.; Bernhard, C.; Lhenry, D.; Moreau, M.; Carme, S.; Oudot, A.; Collin, B.; Vringaud, J. M.; Provent, P.; Bruntte, F.; Denat, F.; Goze, C. NIR emitting BODIPY-based Monomolecular Multifunctional Imaging Probes: from synthesis to in vivo investigations. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, **2016**.
243. Lakshmi, V.; Ravikanth, M. Boron-dipyrromethene based multi-anionic sensor and a specific cationic sensor for Fe³⁺. *J. Mater. Chem. C*, **2014**, *2*, 5576-5586.
244. Boens, N.; Leen, V.; Dehaen, W. Fluorescent indicators based on BODIPY. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 1130-1172.
245. Teknikel, E.; Unaleroglu, C. Colorimetric and fluorometric pH sensor based on bis(methoxycarbonyl)ethenyl functionalized BODIPY. *Dyes Pigm.*, **2015**, *120*, 239-244.
246. Deniz, E.; Ray, S.; Tomasulo, M.; Impellizzeri, S.; Sortino, S.; Raymo, F. M. Photoswitchable Fluorescent Dyads Incorporating BODIPY and [1,3]Oxazine Components. *J. Phys. Chem. A*, **2010**, *114*, 11567-11575.
247. Chen, J. J.; Conron, S. M.; Erwin, P.; Dimitriou, M.; Mcal ahney, K.; Thompson, M. E. High-Efficiency BODIPY-Based Organic Photovoltaics. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2015**, *7*, 662-669.

248. Nepomnyashchii, A. B.; Bard, A. J. Electrochemistry and Electrogenenerated Chemiluminescence of BODIPY Dyes. *Acc. Chem. Res.*, **2012**, *45*, 1844-1853.
249. Kamkaew, A.; Lim, S. H.; Lee, H. B.; Kiew, L. V.; Chung, L. Y.; Burgess, K. BODIPY Dyes In Photodynamic Therapy. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 77-88.
250. Loudet, A.; Burgess, K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 4891-4932.
251. Li, Z.; Mintzer, E.; Bittman, R. First Synthesis of Free Cholesterol-BODIPY Conjugates. *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 1718-1721.
252. Baruah, M.; Qin, W.; Basarić, N.; De Borggraeve, W. M.; Boens, N. BODIPY-Based Hydroxyaryl Derivatives as Fluorescent pH Probes. *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 4152-4157.
253. Moon, S. Y.; Cha, N. R.; Kim, Y. H.; Chang, S.-K. New Hg²⁺-Selective Chromo- and Fluoroionophore Based upon 8-Hydroxyquinoline. *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 181-183.
254. Bartelmess, J.; Weare, W. W. Preparation and characterization of multi-cationic BODIPYs and their synthetically versatile precursors. *Dyes Pigm.*, **2013**, *97*, 1-8.
255. Bañuelos-Prieto, J.; Agarrabeitia, A. R.; Garcia-Moreno, I.; Lopez-Arbeloa, I.; Costela, A.; Infantes, L.; Perez-Ojeda, M. E.; Palacios-Cuesta, M.; Ortiz, M. J. Controlling Optical Properties and Function of BODIPY by Using Asymmetric Substitution Effects. *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 14094-14105.
256. Arsenault, G. P.; Bullock, E.; Macdonald, S. F. Pyrromethanes and Porphyrins Therefrom. *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, *82*, 4384-4389.
257. Al-Sheikh-Ali, A.; Cameron, K. S.; Cameron, T. S.; Robertson, K. N.; Thompson, A. Highly Diastereoselective Templated Complexation of Dipyrromethenes. *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 4773-4775.
258. Ulrich, G.; Ziessel, R.; Harriman, A. The Chemistry of Fluorescent Bodipy Dyes: Versatility Unsurpassed. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 1184-1201.
259. Ziessel, R.; Ulrich, G.; Harriman, A. The chemistry of Bodipy: A new El Dorado for fluorescence tools. *New J. Chem.*, **2007**, *31*, 496-501.
260. Benstead, M.; Mehl, G. H.; Boyle, R. W. 4,4'-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenes (BODIPYs) as components of novel light active materials. *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 3573-3601.
261. Esnal, I.; Banuelos, J.; Lopez Arbeloa, I.; Costela, A.; Garcia-Moreno, I.; Garzon, M.; Agarrabeitia, A. R.; Jose Ortiz, M. Nitro and amino BODIPYS: crucial substituents to modulate their photonic behavior. *RSC Adv.*, **2013**, *3*, 1547-1556.

262. Krumova, K.; Cosa, G. Bodipy Dyes with Tunable Redox Potentials and Functional Groups for Further Tethering: Preparation, Electrochemical, and Spectroscopic Characterization. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 17560-17569.
263. Ye, J.-H.; Hu, Z.; Wang, Y.; Zhang, W.; Zhang, Y. A new practical and highly efficient iodination of BODIPY derivatives with hypervalent iodine reagent. *Tetrahedron Lett.*, **2012**, *53*, 6858-6860.
264. Gibbs, J. H.; Robins, L. T.; Zhou, Z.; Bobadova-Parvanova, P.; Cottam, M.; Mccandless, G. T.; Fronczek, F. R.; Vicente, M. G. H. Spectroscopic, computational modeling and cytotoxicity of a series of meso-phenyl and meso-thienyl-BODIPYs. *Biorg. Med. Chem.*, **2013**, *21*, 5770-5781.
265. Jiao, L.; Yu, C.; Li, J.; Wang, Z.; Wu, M.; Hao, E. β -Formyl-BODIPYs from the Vilsmeier–Haack Reaction. *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 7525-7528.
266. Li, L.; Han, J.; Nguyen, B.; Burgess, K. Syntheses and Spectral Properties of Functionalized, Water-Soluble BODIPY Derivatives. *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 1963-1970.
267. Jiao, L.; Pang, W.; Zhou, J.; Wei, Y.; Mu, X.; Bai, G.; Hao, E. Regioselective Stepwise Bromination of Boron Dipyrromethene (BODIPY) Dyes. *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 9988-9996.
268. Yu, C.; Jiao, L.; Yin, H.; Zhou, J.; Pang, W.; Wu, Y.; Wang, Z.; Yang, G.; Hao, E. α -/ β -Formylated Boron–Dipyrin (BODIPY) Dyes: Regioselective Syntheses and Photophysical Properties. *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, *2011*, 5460-5468.
269. Rohand, T.; Qin, W.; Boens, N.; Dehaen, W. Palladium-Catalyzed Coupling Reactions for the Functionalization of BODIPY Dyes with Fluorescence Spanning the Visible Spectrum. *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, *2006*, 4658-4663.
270. Wang, H.; Fronczek, F. R.; Vicente, M. G. H.; Smith, K. M. Functionalization of 3,5,8-Trichlorinated BODIPY Dyes. *J. Org. Chem.*, **2014**, *79*, 10342-10352.
271. Heyer, E.; Ziesel, R. Mono-functionalized dibenzo[g,p]-chrysenes for cascade energy transfer. *Tetrahedron Lett.*, **2013**, *54*, 3388-3393.
272. Han, J.; Gonzalez, O.; Aguilar-Aguilar, A.; Pena-Cabrera, E.; Burgess, K. 3- and 5-Functionalized BODIPYs via the Liebeskind-Srogl reaction. *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 34-36.
273. Ziesel, R.; Ulrich, G.; Haefele, A.; Harriman, A. An Artificial Light-Harvesting Array Constructed from Multiple Bodipy Dyes. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 11330-11344.

274. Sánchez-Carnerero, E. M.; Moreno, F.; Maroto, B. L.; Agarrabeitia, A. R.; Ortiz, M. J.; Vo, B. G.; Muller, G.; Moya, S. D. L. Circularly Polarized Luminescence by Visible-Light Absorption in a Chiral O-BODIPY Dye: Unprecedented Design of CPL Organic Molecules from Achiral Chromophores. *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 3346-3349.
275. Chen, J.; Mizumura, M.; Shinokubo, H.; Osuka, A. Functionalization of Boron Dipyrin (BODIPY) Dyes through Iridium and Rhodium Catalysis: A Complementary Approach to α - and β -Substituted BODIPYs. *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 5942-5949.
276. Verbelen, B.; Boodts, S.; Hofkens, J.; Boens, N.; Dehaen, W. Radical C-H arylation of the BODIPY core with aryldiazonium salts: synthesis of highly fluorescent red-shifted dyes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2015**, *54*, 4612-6.
277. Luo, L.; Wu, D.; Li, W.; Zhang, S.; Ma, Y.; Yan, S.; You, J. Regioselective Decarboxylative Direct C-H Arylation of Boron Dipyrromethenes (BODIPYs) at 2,6-Positions: A Facile Access to a Diversity-Oriented BODIPY Library. *Org. Lett.*, **2014**, *16*, 6080-6083.
278. Zhang, X.; Xiao, Y.; Qi, J.; Qu, J.; Kim, B.; Yue, X.; Belfield, K. D. Long-Wavelength, Photostable, Two-Photon Excitable BODIPY Fluorophores Readily Modifiable for Molecular Probes. *J. Org. Chem.*, **2013**, *78*, 9153-9160.
279. Bura, T.; Retailleau, P.; Ulrich, G.; Ziessel, R. Highly Substituted Bodipy Dyes with Spectroscopic Features Sensitive to the Environment. *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 1109-1117.
280. He, H.; Lo, P.-C.; Yeung, S.-L.; Fong, W.-P.; Ng, D. K. P. Preparation of unsymmetrical distyryl BODIPY derivatives and effects of the styryl substituents on their in vitro photodynamic properties. *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 4748-4750.
281. Banfi, S.; Caruso, E.; Zaza, S.; Mancini, M.; Gariboldi, M. B.; Monti, E. Synthesis and photodynamic activity of a panel of BODIPY dyes. *J. Photochem. Photobiol. B*, **2012**, *114*, 52-60.
282. Graf, K.; Korzdorfer, T.; Kummel, S.; Thelakkat, M. Synthesis of donor-substituted meso-phenyl and meso-ethynylphenyl BODIPYs with broad absorption. *New J. Chem.*, **2013**, *37*, 1417-1426.
283. Hoogendoorn, S.; Blom, A. E. M.; Willems, L. I.; Van Der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S. Synthesis of pH-Activatable Red Fluorescent BODIPY Dyes with Distinct Functionalities. *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 5656-5659.
284. Kee, H. L.; Kirmaier, C.; Yu, L.; Thamyongkit, P.; Youngblood, W. J.; Calder, M. E.; Ramos, L.; Noll, B. C.; Bocian, D. F.; Scheidt, W. R.; Birge, R. R.; Lindsey, J. S.; Holten,

- D. Structural Control of the Photodynamics of Boron–Dipyrrin Complexes. *J. Phys. Chem. B*, **2005**, *109*, 20433-20443.
285. Yogo, T.; Urano, Y.; Ishitsuka, Y.; Maniwa, F.; Nagano, T. Highly Efficient and Photostable Photosensitizer Based on BODIPY Chromophore. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 12162-12163.
286. Wang, X.-Z.; Meng, Q.-Y.; Zhong, J.-J.; Gao, X.-W.; Lei, T.; Zhao, L.-M.; Li, Z.-J.; Chen, B.; Tung, C.-H.; Wu, L.-Z. The singlet excited state of BODIPY promoted aerobic cross-dehydrogenative-coupling reactions under visible light. *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 11256-11259.
287. Gorman, A.; Killoran, J.; O'shea, C.; Kenna, T.; Gallagher, W. M.; O'shea, D. F. In Vitro Demonstration of the Heavy-Atom Effect for Photodynamic Therapy. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 10619-10631.
288. Atilgan, S.; Ekmekci, Z.; Dogan, A. L.; Guc, D.; Akkaya, E. U. Water soluble distyryl-boradiazaindacenes as efficient photosensitizers for photodynamic therapy. *Chem. Commun.*, **2006**, 4398-4400.
289. Adarsh, N.; Avirah, R. R.; Ramaiah, D. Tuning Photosensitized Singlet Oxygen Generation Efficiency of Novel Aza-BODIPY Dyes. *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 5720-5723.
290. Caruso, E.; Banfi, S.; Barbieri, P.; Leva, B.; Orlandi, V. T. Synthesis and antibacterial activity of novel cationic BODIPY photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol. B*, **2012**, *114*, 44-51.
291. Orlandi, V. T.; Rybtke, M.; Caruso, E.; Banfi, S.; Tolker-Nielsen, T.; Barbieri, P. Antimicrobial and anti-biofilm effect of a novel BODIPY photosensitizer against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Biofouling*, **2014**, *30*, 883-891.
292. Lim, S. H.; Thivierge, C.; Nowak-Sliwinska, P.; Han, J.; Van Den Bergh, H.; Wagnières, G.; Burgess, K.; Lee, H. B. In Vitro and In Vivo Photocytotoxicity of Boron Dipyrrromethene Derivatives for Photodynamic Therapy. *J. Med. Chem.*, **2010**, *53*, 2865-2874.
293. Zou, J.; Yin, Z.; Ding, K.; Tang, Q.; Li, J.; Si, W.; Shao, J.; Zhang, Q.; Huang, W.; Dong, X. BODIPY Derivatives for Photodynamic Therapy: Influence of Configuration versus Heavy Atom Effect. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, *13*.
294. Cakmak, Y.; Kolemen, S.; Duman, S.; Dede, Y.; Dolen, Y.; Kilic, B.; Kostereli, Z.; Yildirim, L. T.; Dogan, A. L.; Guc, D.; Akkaya, E. U. Designing Excited States: Theory-

Guided Access to Efficient Photosensitizers for Photodynamic Action. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 11937-11941.

295. Watley, R. L.; Awuah, S. G.; Bio, M.; Cantu, R.; Gobeze, H. B.; Nesterov, V. N.; Das, S. K.; D'souza, F.; You, Y. Dual Functioning Thieno-Pyrrole Fused BODIPY Dyes for NIR Optical Imaging and Photodynamic Therapy: Singlet Oxygen Generation without Heavy Halogen Atom Assistance. *Chem. Asian J.*, **2015**, *10*, 1335-1343.

296. Shivran, N.; Tyagi, M.; Mula, S.; Gupta, P.; Saha, B.; Patro, B. S.; Chattopadhyay, S. Syntheses and photodynamic activity of some glucose-conjugated BODIPY dyes. *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**, *122*, 352-365.

297. Rice, D. R.; Gan, H.; Smith, B. D. Bacterial Imaging and Photodynamic Inactivation Using Zinc(II)-Dipicolylamine BODIPY Conjugates. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2015**, *14*, 1271-1281.

298. Huang, L.; Yu, X.; Wu, W.; Zhao, J. Styryl Bodipy-C60 Dyads as Efficient Heavy-Atom-Free Organic Triplet Photosensitizers. *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 2594-2597.

299. Huang, D.; Zhao, J.; Wu, W.; Yi, X.; Yang, P.; Ma, J. Visible-Light-Harvesting Triphenylamine Ethynyl C60-BODIPY Dyads as Heavy-Atom-Free Organic Triplet Photosensitizers for Triplet-Triplet Annihilation Upconversion. *Asian J. Org. Chem.*, **2012**, *1*, 264-273.

300. Huang, L.; Zhao, J. C60-Bodipy dyad triplet photosensitizers as organic photocatalysts for photocatalytic tandem oxidation/[3+2] cycloaddition reactions to prepare pyrrolo[2,1-a]isoquinoline. *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 3751-3753.

301. Huang, L.; Zhao, J. Switching of the triplet excited state of the C60-dimethylaminostyryl BODIPY dyads/triads. *J. Mater. Chem. C*, **2015**, *3*, 538-550.

302. McDonnell, S. O.; Hall, M. J.; Allen, L. T.; Byrne, A.; Gallagher, W. M.; O'shea, D. F. Supramolecular Photonic Therapeutic Agents. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 16360-16361.

303. Ünlü, H.; Okutan, E. Preparation of BODIPY- fullerene and monostyryl BODIPY- fullerene dyads as heavy atom free singlet oxygen generators. *Dyes Pigm.*, **2017**, *142*, 340-349.

304. Liu, J.-Y.; El-Khouly, M. E.; Fukuzumi, S.; Ng, D. K.; P. Photoinduced Electron Transfer in a Distyryl BODIPY–Fullerene Dyad. *Chem. Asian J.*, **2011**, *6*, 174-179.

305. Zhao, J.; Wu, W.; Sun, J.; Guo, S. Triplet photosensitizers: from molecular design to applications. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 5323-5351.

306. Bandi, V.; Gobeze, H. B.; Lakshmi, V.; Ravikanth, M.; D'souza, F. Vectorial Charge Separation and Selective Triplet-State Formation during Charge Recombination in a Pyrrolyl-Bridged BODIPY–Fullerene Dyad. *J. Phys. Chem. C*, **2015**, *119*, 8095-8102.
307. Crosby, G. a. D., James N. Measurement of photoluminescence quantum yields. Review. *J. Phys. Chem.*, **1971**, *75*, 991-1024.
308. Schmidt, R.; Afshari, E. Comment on "Effect of solvent on the phosphorescence rate constant of singlet molecular oxygen (1.DELTA.g)". *J. Phys. Chem.*, **1990**, *94*, 4377-4378.
309. GarcíA, E.; Texter, J. Electrochemical Oxidation of Primary Amides in Water/AOT/Toluene Reverse Microemulsions. *J. Colloid Interface Sci.*, **1994**, *162*, 262-264.
310. Ninham, B. W.; Larsson, K.; Lo Nostro, P. Two sides of the coin. Part 1. Lipid and surfactant self-assembly revisited. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2017**, *152*, 326-338.
311. Spesia, M. B.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N. Synthesis, properties and photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel cationic fullerene C₆₀ derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* , **2008**, *43*, 853-861.
312. Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T.; Williams, S. T.; Hensyl, W. R., Manual of determinative bacteriology. Ninth ed.; Bergey´S, Ed. Baltimore, MD, 1994.
313. Herigstad, B.; Hamilton, M.; Heersink, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J. Microbiol. Methods*, **2001**, *44*, 121-129.
314. Rio, Y.; Nicoud, J.-F.; Rehspringer, J.-L.; Nierengarten, J.-F. Fullerodendrimers with peripheral triethyleneglycol chains. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 10207-10210.
315. Bianco, A.; Da Ros, T.; Prato, M.; Toniolo, C. Fullerene-based amino acids and peptides. *J. Pept. Sci.*, **2001**, *7*, 208-219.
316. Carano, M.; Ceroni, P.; Paolucci, F.; Roffia, S.; Da Ros, T.; Prato, M.; Sluch, M. I.; Pearson, C.; Petty, M. C.; Bryce, M. R. Novel fulleropyrrolidinium-based materials. *J. Mater. Chem.*, **2000**, *10*, 269-273.
317. 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*, 170-184.
318. Scrivens, W. A.; Tour, J. M.; Creek, K. E.; Pirisi, L. Synthesis of 14c-labeled C₆₀, its suspension in water, and its uptake by human keratinocytes. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 4517-4518.

319. Foley, S.; Crowley, C.; Smaih, M.; Bonfils, C.; Erlanger, B. F.; Seta, P.; Larroque, C. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2002**, *294*, 116-119.
320. Porter, A. E.; Gass, M.; Muller, K.; Skepper, J. N.; Midgley, P.; Welland, M. Visualizing the uptake of C₆₀ to the cytoplasm and nucleus of human monocyte-derived macrophage cells using energy-filtered transmission electron microscopy and electron tomography. *Environ. Sci. Technol.*, **2007**, *41*, 3012-3017.
321. Gomes, A.; Fernandes, E.; Lima, J. L. F. C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2005**, *65*, 45-80.
322. Wessels, J. M.; Foote, C. S.; Ford, W. E.; Rodgers, M. a. J. Photooxidation of Tryptophan: O₂(¹Δ_g) versus Electron-Transfer Pathway. *Photochem. Photobiol.*, **1997**, *65*, 96-102.
323. 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.
324. Wozniak, M.; Tanfani, F.; Bertoli, E.; Zolese, G.; Antosiewicz, J. A new fluorescence method to detect singlet oxygen inside phospholipid model membranes. *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.*, **1991**, *1082*, 94-100.
325. Scalise, I.; Durantini, E. N. Synthesis, properties, and photodynamic inactivation of Escherichia coli using a cationic and a noncharged Zn(II) pyridyloxypthalocyanine derivatives. *Biorg. Med. Chem.*, **2005**, *13*, 3037-3045.
326. Borsarelli, C. D.; Durantini, E. N.; Garcia, N. A. Singlet molecular oxygen-mediated photooxidation of nitrophenolic compounds in water-in-oil microemulsions. A kinetic study. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1996**, 2009-2013.
327. Gomes, A.; Fernandes, E.; Lima, J. L. F. C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **2005**, *65*, 45-80.
328. Yamakoshi, Y.; Umezawa, N.; Ryu, A.; Arakane, K.; Miyata, N.; Goda, Y.; Masumizu, T.; Nagano, T. Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C₆₀) as potential medicines: O₂⁻ versus ¹O₂. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 12803-12809.
329. 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.

330. 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.

331. La Penna, M.; Alvarez, M. G.; Yslas, E. I.; Rivarola, V.; Durantini, E. N. Characterization of photodynamic effects of meso-tetrakis-(4-methoxyphenyl) porphyrin: biological consequences in a human carcinoma cell line. *Dyes Pigm.*, **2001**, *49*, 75-82.

332. Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution An expanded and revised compilation. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **1995**, *24*, 663-1021.

333. Yu, C.; Canteenwala, T.; El-Khouly, M. E.; Araki, Y.; Pritzker, K.; Ito, O.; Wilson, B. C.; Chiang, L. Y. Efficiency of singlet oxygen production from self-assembled nanospheres of molecular micelle-like photosensitizers FC4S. *J. Mater. Chem.*, **2005**, *15*, 1857-1864.

334. Mashino, T.; Usui, N.; Okuda, K.; Hirota, T.; Mochizuki, M. Respiratory chain inhibition by fullerene derivatives: hydrogen peroxide production caused by fullerene derivatives and a respiratory chain system. *Biorg. Med. Chem.*, **2003**, *11*, 1433-1438.

335. Spesia, M. B.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N. Chapter 18 - Fullerene Derivatives in Photodynamic Inactivation of Microorganisms A2 - Fikai, Anton. In *Nanostructures for Antimicrobial Therapy*, Grumezescu, A. M., Ed. Elsevier: 2017; pp 413-433.

336. Kharkwal, G. B.; Sharma, S. K.; Huang, Y.-Y.; Dai, T.; Hamblin, M. R. Photodynamic therapy for infections: Clinical applications. *Lasers. Surg. Med.*, **2011**, *43*, 755-767.

337. Huang, L.; St. Denis, T. G.; Xuan, Y.; Huang, Y.-Y.; Tanaka, M.; Zadlo, A.; Sarna, T.; Hamblin, M. R. Paradoxical potentiation of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic inactivation by sodium azide: Role of ambient oxygen and azide radicals. *Free Radic. Biol. Med.*, **2012**, *53*, 2062-2071.

338. Ouannes, C.; Wilson, T. Quenching of singlet oxygen by tertiary aliphatic amines. Effect of DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane). *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, *90*, 6527-6528.

339. Petrat, F.; Pindiur, S.; Kirsch, M.; De Groot, H. NAD(P)H, a Primary Target of 1O₂ in Mitochondria of Intact Cells. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 3298-3307.

340. Agazzi, M. L.; Spesia, M. B.; Gsponer, N. S.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N. Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of a fulleropyrrolidine bearing a basic amino group and its dicationic analog against *Staphylococcus aureus*. *J. Photochem. Photobiol. A*, **2015**, *310*, 171-179.
341. Nakanishi, I.; Fukuzumi, S.; Konishi, T.; Ohkubo, K.; Fujitsuka, M.; Ito, O.; Miyata, N. DNA Cleavage via Superoxide Anion Formed in Photoinduced Electron Transfer from NADH to γ -Cyclodextrin-Bicapped C60 in an Oxygen-Saturated Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. B*, **2002**, *106*, 2372-2380.
342. Kamat, J. P.; Devasagayam, T. P. A.; Priyadarsini, K. I.; Mohan, H. Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivatives and its possible biological implications. *Toxicology*, **2000**, *155*, 55-61.
343. Zhao, B.; He, Y.-Y.; Bilski, P. J.; Chignell, C. F. Pristine (C60) and Hydroxylated [C60(OH)24] Fullerene Phototoxicity towards HaCaT Keratinocytes: Type I vs Type II Mechanisms. *Chem. Res. Toxicol.*, **2008**, *21*, 1056-1063.
344. Vecchio, D.; Gupta, A.; Huang, L.; Landi, G.; Avci, P.; Rodas, A.; Hamblin, M. R. Bacterial photodynamic inactivation mediated by methylene blue and red light is enhanced by synergistic effect of potassium iodide. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2015**.
345. Texier, I.; Berberan-Santos, M. N.; Fedorov, A.; Brettreich, M.; Schönberger, H.; Hirsch, A.; Leach, S.; Bensasson, R. V. Photophysics and Photochemistry of a Water-Soluble C60 Dendrimer: Fluorescence Quenching by Halides and Photoinduced Oxidation of I⁻. *J. Phys. Chem. A*, **2001**, *105*, 10278-10285.
346. Gupta, A. K.; Rohatgi-Mukherjee, K. K. Solvent effect on photosensitized oxidation of iodide ion by anthracene sulphonates. *Photochem. Photobiol.*, **1978**, *27*, 539-543.
347. Chmyrov, A.; Sandén, T.; Widengren, J. Iodide as a Fluorescence Quencher and Promoter—Mechanisms and Possible Implications. *J. Phys. Chem. B*, **2010**, *114*, 11282-11291.
348. Sherer, T. T.; Thrall, K. D.; Bull, R. J. Comparison of toxicity induced by iodine and iodide in male and female rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, **1991**, *32*, 89-101.
349. Weiss, J. F.; Landauer, M. R. History and development of radiation-protective agents. *Int. J. Radiat Biol.*, **2009**, *85*, 539-73.
350. Costa, R. O.; De Macedo, P. M.; Carvalhal, A.; Bernardes-Engemann, A. R. Use of potassium iodide in Dermatology: updates on an old drug. *An. Bras. Dermatol.*, **2013**, *88*, 396-402.

351. Sterling, J. B.; Heymann, W. R. Potassium iodide in dermatology: A 19th century drug for the 21st century—uses, pharmacology, adverse effects, and contraindications. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **43**, 691-697.
352. Hall, H. K. Correlation of the Base Strengths of Amines¹. *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, *79*, 5441-5444.
353. Khalili, F.; Henni, A.; East, A. L. L. pKa Values of Some Piperazines at (298, 303, 313, and 323) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, **2009**, *54*, 2914-2917.
354. Mizuno, K.; Zhiyentayev, T.; Huang, L.; Khalil, S.; Nasim, F.; Tegos, G. P.; Gali, H.; Jahnke, A.; Wharton, T.; Hamblin, M. R. Antimicrobial Photodynamic Therapy with Functionalized Fullerenes: Quantitative Structure-activity Relationships. *J. Nanomed. Nanotechnol.*, **2011**, *2*, 1-9.
355. George, S.; Hamblin, M. R.; Kishen, A. Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2009**, *8*, 788-795.
356. Caminos, D. A.; Durantini, E. N. Synthesis of asymmetrically meso-substituted porphyrins bearing amino groups as potential cationic photodynamic agents. *J. Porphyr. Phthalocya.*, **2005**, *09*, 334-342.
357. Minnock, A.; Vernon, D. I.; Schofield, J.; Griffiths, J.; Howard Parish, J.; Brown, S. B. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J. Photochem. Photobiol.B*, **1996**, *32*, 159-164.
358. Gottenbos, B.; Grijpma, D. W.; Van Der Mei, H. C.; Feijen, J.; Busscher, H. J. Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2001**, *48*, 7-13.
359. Durantini, E. N.; Silber, J. J. Synthesis of 5-(4-Acetamidophenyl)-10,15,20-tris(4-Substituted Phenyl) Porphyrins using Dipyrromethanes. *Synth. Commun.*, **1999**, *29*, 3353-3368.
360. Durantini, E. N. Synthesis of meso-nitrophenylporphyrins covalently linked to a polyphenylene chain bearing methoxy groups. *J. Porphyr. Phthalocyanines*, **2000**, *4*, 233-242.
361. Hedley, G. J.; Ruseckas, A.; Harriman, A.; Samuel, I. D. W. Conformational Effects on the Dynamics of Internal Conversion in Boron Dipyrromethene Dyes in Solution. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 6634-6637.

362. Harriman, A.; Mallon, L. J.; Ulrich, G.; Ziesel, R. Rapid Intersystem Crossing in Closely-Spaced but Orthogonal Molecular Dyads. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, **2007**, *8*, 1207-1214.
363. Novaira, M.; Cormick, M. P.; Durantini, E. N. Spectroscopic and time-resolved fluorescence emission properties of a cationic and an anionic porphyrin in biomimetic media and *Candida albicans* cells. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **2012**, *246*, 67-74.
364. Zhang, M.; Hao, E.; Zhou, J.; Yu, C.; Bai, G.; Wang, F.; Jiao, L. Synthesis of pyrrolyldipyrinato BF₂ complexes by oxidative nucleophilic substitution of boron dipyrromethene with pyrrole. *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 2139-45.
365. Chen, Y.; Wan, L.; Zhang, D.; Bian, Y.; Jiang, J. Modulation of the spectroscopic property of Bodipy derivatives through tuning the molecular configuration. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2011**, *10*, 1030-1038.
366. Kuimova, M. K.; Yahioglu, G.; Levitt, J. A.; Suhling, K. Molecular Rotor Measures Viscosity of Live Cells via Fluorescence Lifetime Imaging. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 6672-6673.
367. Wang, J.; Hou, Y.; Lei, W.; Zhou, Q.; Li, C.; Zhang, B.; Wang, X. DNA photocleavage by a cationic BODIPY dye through both singlet oxygen and hydroxyl radical: new insight into the photodynamic mechanism of BODIPYs. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, **2012**, *13*, 2739-47.
368. Zhang, X.-F.; Yang, X. Photosensitizer That Selectively Generates Singlet Oxygen in Nonpolar Environments: Photophysical Mechanism and Efficiency for a Covalent BODIPY Dimer. *J. Phys. Chem. B*, **2013**, *117*, 9050-9055.
369. Laine, M.; Barbosa, N. A.; Kochel, A.; Osiecka, B.; Szewczyk, G.; Sarna, T.; Ziółkowski, P.; Wieczorek, R.; Filarowski, A. Synthesis, structural, spectroscopic, computational and cytotoxic studies of BODIPY dyes. *Sens. Actuators B Chem.*, **2017**, *238*, 548-555.
370. Zhao, J.; Xu, K.; Yang, W.; Wang, Z.; Zhong, F. The triplet excited state of Bodipy: formation, modulation and application. *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, *44*, 8904-8939.
371. Liu, Y.; Li, Z.; Chen, L.; Xie, Z. Near infrared BODIPY-Platinum conjugates for imaging, photodynamic therapy and chemotherapy. *Dyes Pigm.*, **2017**, *141*, 5-12.
372. Üçüncü, M.; Karakuş, E.; Kurulgan Demirci, E.; Sayar, M.; Dartar, S.; Emrulloğlu, M. BODIPY–Au(I): A Photosensitizer for Singlet Oxygen Generation and Photodynamic Therapy. *Org. Lett.*, **2017**, *19*, 2522-2525.

373. Wu, W.; Cui, X.; Zhao, J. Hetero Bodipy-dimers as heavy atom-free triplet photosensitizers showing a long-lived triplet excited state for triplet-triplet annihilation upconversion. *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 9009-9011.
374. Awuah, S. G.; Das, S. K.; D'souza, F.; You, Y. Thieno–Pyrrole-Fused BODIPY Intermediate as a Platform to Multifunctional NIR Agents. *Chem. Asian J.*, **2013**, *8*, 3123-3132.
375. Sun, J.; Zhong, F.; Yi, X.; Zhao, J. Efficient Enhancement of the Visible-Light Absorption of Cyclometalated Ir(III) Complexes Triplet Photosensitizers with Bodipy and Applications in Photooxidation and Triplet–Triplet Annihilation Upconversion. *Inorg. Chem.*, **2013**, *52*, 6299-6310.
376. Chen, K.; Yang, W.; Wang, Z.; Iagatti, A.; Bussotti, L.; Foggi, P.; Ji, W.; Zhao, J.; Di Donato, M. Triplet Excited State of Bodipy Accessed by Charge Recombination and Its Application in Triplet-Triplet Annihilation Upconversion. *J. Phys. Chem. A*, **2017**, *4*.
377. Widengren, J.; Mets, U.; Rigler, R. Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study. *J. Phys. Chem.*, **1995**, *99*, 13368-13379.
378. Chmyrov, A.; Sandén, T.; Widengren, J. Iodide as a Fluorescence Quencher and Promoter—Mechanisms and Possible Implications. *J. Phys. Chem. B*, **2010**, *114*, 11282-11291.
379. Widengren, J.; Schwille, P. Characterization of Photoinduced Isomerization and Back-Isomerization of the Cyanine Dye Cy5 by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *J. Phys. Chem. A*, **2000**, *104*, 6416-6428.
380. Gsponer, N. S.; Agazzi, M. L.; Spesia, M. B.; Durantini, E. N. Approaches to unravel pathways of reactive oxygen species in the photoinactivation of bacteria induced by a dicationic fulleropyrrolidinium derivative. *Methods*.
381. Zhang, X.-F.; Yang, X. Singlet Oxygen Generation and Triplet Excited-State Spectra of Brominated BODIPY. *J. Phys. Chem. B*, **2013**, *117*, 5533-5539.
382. Wu, W.; Guo, H.; Wu, W.; Ji, S.; Zhao, J. Organic Triplet Sensitizer Library Derived from a Single Chromophore (BODIPY) with Long-Lived Triplet Excited State for Triplet–Triplet Annihilation Based Upconversion. *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 7056-7064.
383. Mourier, G.; Moroder, L. Prevention of Tryptophan Oxidation During Iodination of Tyrosyl Residues in Peptides. *Zeitschrift für Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences*, **1984**, *39*, 101-104.

384. Carvalho, D. P.; Ferreira, A. C.; Coelho, S. M.; Moraes, J. M.; Camacho, M. A.; Rosenthal, D. Thyroid peroxidase activity is inhibited by amino acids. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **2000**, *33*, 355-61.
385. Rowley, J. G.; Farnum, B. H.; Ardo, S.; Meyer, G. J. Iodide Chemistry in Dye-Sensitized Solar Cells: Making and Breaking I–I Bonds for Solar Energy Conversion. *J. Phys. Chem. Lett.*, **2010**, *1*, 3132-3140.
386. Mosinger, J.; Janošková, M.; Lang, K.; Kubát, P. Light-induced aggregation of cationic porphyrins. *J. Photochem. Photobio. A*, **2006**, *181*, 283-289.
387. Felgentrager, A.; Maisch, T.; Spath, A.; Schroder, J. A.; Baumler, W. Singlet oxygen generation in porphyrin-doped polymeric surface coating enables antimicrobial effects on *Staphylococcus aureus*. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2014**, *16*, 20598-20607.
388. Garcez, A. S.; Núñez, S. C.; Baptista, M. S.; Daghasanli, N. A.; Itri, R.; Hamblin, M. R.; Ribeiro, M. S. Antimicrobial mechanisms behind photodynamic effect in the presence of hydrogen peroxide. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, **2011**, *10*, 483-490.
389. Gardner, J. M.; Abrahamsson, M.; Farnum, B. H.; Meyer, G. J. Visible Light Generation of Iodine Atoms and I–I Bonds: Sensitized I– Oxidation and I3– Photodissociation. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 16206-16214.
390. Boschloo, G.; Hagfeldt, A. Characteristics of the Iodide/Triiodide Redox Mediator in Dye-Sensitized Solar Cells. *Acc. Chem. Res.*, **2009**, *42*, 1819-1826.
391. Beney, L.; Gervais, P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2001**, *57*, 34-42.
392. Pogue, B. W.; Samkoe, K. S.; Gibbs-Strauss, S. L.; Davis, S. C. Fluorescent molecular imaging and dosimetry tools in photodynamic therapy. *Methods. Mol. Biol.*, **2010**, *635*, 207-22.
393. Carpenter, B.; Situ, X.; Scholle, F.; Bartelmess, J.; Weare, W.; Ghiladi, R. Antiviral, Antifungal and Antibacterial Activities of a BODIPY-Based Photosensitizer. *Molecules*, **2015**, *20*, 10604.
394. Bonfantini, E. E.; Burrell, A. K.; Campbell, W. M.; Crossley, M. J.; Gosper, J. J.; Harding, M. M.; Officer, D. L.; Reid, D. C. W. Efficient synthesis of free-base 2-formyl-5,10,15,20-tetraarylporphyrins, their reduction and conversion to [(porphyrin-2-yl)methyl]phosphonium salts. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2002**, *06*, 708-719.

395. Palao-Utiel, E.; Montalvillo-Jiménez, L.; Esnal, I.; Prieto-Montero, R.; Agarrabeitia, A. R.; García-Moreno, I.; Bañuelos, J.; López-Arbeloa, I.; De La Moya, S.; Ortiz, M. J. Controlling Vilsmeier-Haack processes in meso-methylBODIPYs: A new way to modulate finely photophysical properties in boron dipyrromethenes. *Dyes Pigm.*, **2017**, *141*, 286-298.
396. Iagatti, A.; Cupellini, L.; Biagiotti, G.; Caprasecca, S.; Fedeli, S.; Lapini, A.; Ussano, E.; Cicchi, S.; Foggi, P.; Marcaccio, M.; Mennucci, B.; Di Donato, M. Efficient Photoinduced Charge Separation in a BODIPY-C60 Dyad. *J. Phys. Chem. C*, **2016**.
397. Elisa Milanesio, M.; Durantini, E. N. Synthesis and Spectroscopic Properties of a Covalently Linked Porphyrin–Fullerene C60 Dyad. *Synth. Commun.*, **2006**, *36*, 2135-2144.
398. Milanesio, M. E.; Gervaldo, M.; Otero, L. A.; Sereno, L.; Silber, J. J.; Durantini, E. N. Synthesis and photophysical properties of Zn(II) porphyrin–C60 dyad with potential use in solar cells. *J. Phys. Org. Chem.*, **2002**, *15*, 844-851.
399. Ziessel, R.; Allen, B. D.; Rewinska, D. B.; Harriman, A. Selective Triplet-State Formation during Charge Recombination in a Fullerene/Bodipy Molecular Dyad (Bodipy= Borondipyrromethene). *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 7382-7393.
400. Yang, P.; Wu, W.; Zhao, J.; Huang, D.; Yi, X. Using C60-bodipy dyads that show strong absorption of visible light and long-lived triplet excited states as organic triplet photosensitizers for triplet-triplet annihilation upconversion. *J. Mater. Chem.*, **2012**, *22*, 20273-20283.
401. Obondi, C. O.; Lim, G. N.; Karr, P. A.; Nesterov, V. N.; D'souza, F. Photoinduced charge separation in wide-band capturing, multi-modular bis(donor styryl)BODIPY-fullerene systems. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2016**, *18*, 18187-18200.
402. Ray, C.; Diaz-Casado, L.; Avellanal-Zaballa, E.; Banuelos, J.; Cerdan, L.; Garcia-Moreno, I.; Moreno, F.; Maroto, B. L.; Lopez-Arbeloa, I.; De La Moya, S. N-BODIPYs Come into Play: Smart Dyes for Photonic Materials. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, **2017**, *23*, 9383-9390.
403. Kollmannsberger, M.; Gareis, T.; Heinl, S.; Daub, J.; Breu, J. Electrogenerated Chemiluminescence and Proton-Dependent Switching of Fluorescence: Functionalized Difluoroboradiaza-s-indacenes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1997**, *36*, 1333-1335.
404. Rehm, D.; Weller, A. Kinetics of Fluorescence Quenching by Electron and H-Atom Transfer. *Isr. J. Chem.*, **1970**, *8*, 259-271.

405. D'souza, F.; El-Khouly, M. E.; Gadde, S.; Mccarty, A. L.; Karr, P. A.; Zandler, M. E.; Araki, Y.; Ito, O. Self-Assembled via Axial Coordination Magnesium Porphyrin–Imidazole Appended Fullerene Dyad: Spectroscopic, Electrochemical, Computational, and Photochemical Studies. *J. Phys. Chem. B.*, **2005**, *109*, 10107-10114.
406. Huang, L.; Cui, X.; Therrien, B.; Zhao, J. Energy-Funneling-Based Broadband Visible-Light-Absorbing Bodipy–C60 Triads and Tetrads as Dual Functional Heavy-Atom-Free Organic Triplet Photosensitizers for Photocatalytic Organic Reactions. *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 17472-17482.
407. Ozlem, S.; Akkaya, E. U. Thinking Outside the Silicon Box: Molecular AND Logic As an Additional Layer of Selectivity in Singlet Oxygen Generation for Photodynamic Therapy. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 48-49.
408. Durantini, A. M.; Greene, L. E.; Lincoln, R.; Martínez, S. R.; Cosa, G. Reactive Oxygen Species Mediated Activation of a Dormant Singlet Oxygen Photosensitizer: From Autocatalytic Singlet Oxygen Amplification to Chemically Controlled Photodynamic Therapy. *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, *138*, 1215-1225.
409. Tian, J.; Zhou, J.; Shen, Z.; Ding, L.; Yu, J.-S.; Ju, H. A pH-activatable and aniline-substituted photosensitizer for near-infrared cancer theranostics. *Chem. Sci.*, **2015**, *6*, 5969-5977.
410. Sandell, J. L.; Zhu, T. C. A review of in-vivo optical properties of human tissues and its impact on PDT. *J. Biophotonics*, **2011**, *4*, 773-787.
411. Garcia-Diaz, M.; Huang, Y.-Y.; Hamblin, M. R. Use of fluorescent probes for ROS to tease apart Type I and Type II photochemical pathways in photodynamic therapy. *Methods*, **2016**, *109*, 158-166.