

REYNOSO, EUGENIA  
Cinetica y mecanismo



2013

72684

72684

MFN:
Clasif:
T. 836

72684



Crear... Crear... Crecer...

TESIS DOCTORAL EN CIENCIAS QUÍMICAS

**CINÉTICA Y MECANISMO DE LA  
FOTODEGRADACIÓN DE ANTIBIÓTICOS.  
IMPLICANCIAS MICROBIOLÓGICAS**

MIC. EUGENIA REYNOSO

DIRECTORA: DRA. M. A. BIASUTTI    CO-DIRECTOR: DR. N. A. GARCÍA

∞ 2013 ∞

*El presente trabajo de Tesis fue realizado en el Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas Fisicoquímicas y Naturales, y se presenta como requerimiento para optar al grado de Doctora en Ciencias Químicas.*

**Director de tesis**

Dra. María Alicia Biasutti



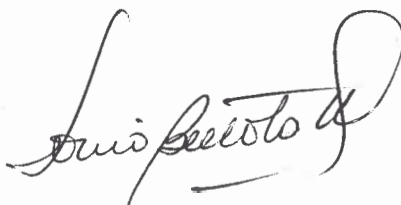
**Codirector de tesis**

Dr. Norman Andino García



**Jurado de Tesis**

Dra. Sonia Bertolotti (UNRC)



Dra. Miriam Etcheverry (UNRC)



Dra. Mónica González (UNLP)



**Río Cuarto, Diciembre 2013**

## Agradecimientos

*A los miembros del Jurado de Tesis por aceptar la noble tarea de guiarme durante estos años con tanto respeto y compromiso.*

*A mis Directores Alicia y Andy, gracias por la paciencia y dedicación, por enseñarme y permitirme aprender con libertad y por formarme en esta etapa con tanto cariño. No solamente los considero grandes profesionales sino también grandes personas. Muchas gracias.*

*A todo el grupo de Fotoquímica por los lindos momentos compartidos fuera y dentro del laboratorio en especial a: Ceci Ch., Mariel C., Ceci P., Clau S., Lauri H., Maxi A., Gaby P., Eduardo G., Toto N., Walter M., Caro G., Dalila O., Laura B., etc.*

*A la Dra. Susana Criado quien contribuyó enormemente en esta Tesis con seriedad y profesionalismo, tanto en la parte experimental como en la interpretación de los resultados, gracias por su tiempo y dedicación.*

*A la Dra. Mariana Spesia y al Dr. Edgardo Durantini por permitirme amablemente realizar los ensayos microbiológicos en su laboratorio, en especial a Mariana por la toda ayuda brindada.*

*A todos los miembros del Departamento de Química docentes y no docentes y a la UNRC por permitirme gratuitamente realizar esta carrera de posgrado en un lugar altamente equipado en tecnología y recursos humanos.*

*A CONICET por el financiamiento económico.*

*A mis compañeros becarios con los que compartí durante estos hermosos años momentos que recordaré por siempre, aprendí a respetarlos y quererlos muchísimo. Gracias: Naty G., Eve F., Jime M., Diana B., Jorge G., Gaby M., Lore M., Lauri H., Clau S., Caro G., Pablo C., Andrés y Javi D., Javi T., Angélica M., Meli M., Ale L., Ceci Ch., Fede A. y demás...*

*A mi enorme y hermosa familia que siempre me ha apoyado en todo lo que he decidido emprender en mi vida, en especial a mis padres por creer en mí y educarme con tantos valores y principios. Millones de gracias.*

*A mis hermanas Luly y Agus que son mis dos pulmones, a mis cuñados y a mi sobrina que es un sol, los adoro con toda el alma.*

*A mi esposo Hernán, por su incondicional apoyo y confianza, por su respeto a mi trabajo, por la palabra justa en el momento justo y por compartir conmigo cada momento de nervios y felicidad durante estos años. Te amo*

*A mi hijo Valentino, quien se merece la Tesis entera por haberla sentido desde la panza, siempre entendiendo los tiempos de mamá pero recordándome que él es y será lo mas importante en mi vida. Gracias hijo mío, mamá te ama y te amará siempre.*

*A Dios, porque siempre sentí sus pasos al lado de los míos, llenándome de paz y esperanza....*

*A mi hijo Valentino*

*A mi esposo Hernán*

*A mis padres y hermanas*

## Resumen

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Atb), ampliamente utilizados, pueden causar, en aguas residuales, efectos adversos en el ecosistema así como contribuir a la proliferación de bacterias resistentes a los mismos. Por esta razón, el efecto de la fotoirradiación de penicilinas y cefalosporinas en condiciones similares a las naturales han sido estudiados por técnicas estacionarias y resuelta en el tiempo. Asimismo, las posibles implicancias de estos fotoprocesos sobre la actividad antimicrobiana de los Atb, también fueron investigadas.

Con el propósito de modelar las condiciones ambientales, fue empleado como fotosensibilizador el pigmento natural Riboflavina (Rf, vitamina B2) presente prácticamente en todos los reservorios de agua, mientras que los fotosensibilizadores artificiales Perinaftenona (PN) y Rosa de Bengala (RB) fueron utilizados con fines comparativos.

El trabajo se realizó con el objetivo de predecir la eventual evolución natural tanto química como biológica de los contaminantes en condiciones ambientales y sus consecuencias inmediatas. Los estudios cinéticos y mecanísticos así como la elucidación de los fotoproductos contribuyen a la interpretación de los resultados.

La fotoirradiación de soluciones acuosas de los Atb produce la degradación de todos los agentes antimicrobianos estudiados. La evidencia experimental indica que en presencia de los fotosensibilizadores RB y PN, el proceso ocurre casi exclusivamente a través del mecanismo mediado por  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ), mientras que en presencia de Rf existe una considerable contribución del mecanismo mediado por radicales, con la participación de otras especies reactivas del oxígeno, tales como  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  y  $HO^{\cdot}$ .

Por otro lado, los ensayos microbiológicos muestran un paralelismo entre la velocidad de fotodegradación de los Atb y la pérdida de su capacidad bactericida sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. Al parecer, la fracción fotodegradada de los antibióticos no muestra actividad inhibidora sobre dichas cepas.

Como conclusión podemos decir que la información físico-química y biológica obtenida en el presente trabajo así como su interpretación resultan puntos esenciales en la predicción del comportamiento de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en ambientes naturales y pueden considerarse como un primer paso en la prevención de impactos ecológicos negativos.

## **Abstract**

Trace amounts of the widely used  $\beta$ -lactam antibiotics (Atb) in waste waters may cause adverse effects on the ecosystems, such as the contribution to proliferation of antibiotic-resistant bacteria. On these grounds, the effect of natural-like photoirradiation of aqueous penicillins and cephalosporins has been studied by stationary and time-resolved techniques. Additionally, possible implications of these photoprocesses on the antimicrobial activity of the Atb, has also been investigated.

In order to closely model environmental conditions, the naturally-occurring pigment Riboflavin (Rf, vitamin B2), present in practically all kind of water courses and water mirrors, was employed as a photosensitizer, whereas the artificial photosensitizers Perinaftene (PN) and Rose Bengal (RB) were used with comparative purposes.

The work was done with the aim to predict the eventual chemical and biological natural evolution of the contaminants under environmental conditions and its immediate consequences. Kinetic and mechanistic studies and the elucidation of the photoproducts contribute to the interpretation of the results.

Photosensitized irradiation of aqueous solutions of the Atb produces the degradation of all antimicrobial agents studied. Experimental evidence indicates that in the presence of RB and PN as photosensitizers, the process occurs almost exclusively through the mechanism  $O_2(^1\Delta_g)$ -mediated, while in the presence of Rf there is also a considerable contribution of radical-mediated mechanism, with the participation of other reactive oxygen species such as  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  and  $OH^{\cdot}$ .

On the other hand, microbiological assays exhibit a parallelism between the rate of the photodegradation of Atb and the loss of their bactericidal capacity on *Staphylococcus aureus* strains. Apparently, the fraction of photodegraded antibiotics did not show any inhibitory activity on the strains.

As a corollary we can say that the physicochemical and biological information collected in the present contribution and its interpretation are essential points for predicting the behavior of  $\beta$ -lactam antibiotics in natural environments and can be considered as an initial step in the prevention of negative ecological impacts.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>Resumen</b>	<b>xi</b>
<b>Abstract</b>	<b>xiii</b>
<b>Índice de contenidos</b>	<b>xv</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>xix</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>xxiv</b>
<b>Introducción. Importancia del tema y objetivos</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO I. Consideraciones teóricas</b>	<b>7</b>
I-1. Características y propiedades de la molécula de oxígeno	7
I-2. Especies reactivas de oxígeno (EROs)	9
I-2.1. Oxígeno singlete ( $O_2(^1\Delta_g)$ )	10
I-2.1.1. Generación de $O_2(^1\Delta_g)$	11
I-2.1.1.1. Generación química	12
I-2.1.1.2. Generación fotoquímica	13
I-2.1.2. Desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$	14
I-2.2. Anión radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )	19
I-2.2.1. Generación de $O_2^{\bullet-}$	19
I-2.2.1.1. Generación radiolítica y fotoquímica	20
I-2.2.1.2. Generación electroquímica	21
I-2.2.1.3. Generación química	21
I-2.2.2. Reactividad de $O_2^{\bullet-}$	22
I-2.3. Peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ )	24
I-2.3.1. Generación de $H_2O_2$	24
I-2.3.2. Principales reacciones en las que participa $H_2O_2$	24
I-2.4. Radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ )	26
I-2.4.1. Generación de $HO^{\bullet}$	26
I-2.4.1.1. Generación no fotoquímica	27
I-2.4.1.2. Generación fotoquímica	28
I-3. Fotosensibilización	31
I-3.1. Mecanismos de reacciones fotosensibilizadas	31



I-3.2. Métodos para discernir entre mecanismo Tipo I y Tipo II	32
I-3.3. Características de los sensibilizadores	33
I-3.4. Cinética de las fotooxidaciones sensibilizadas	35
I-4. Antibióticos	37
I-4.1. Antibióticos $\beta$ lactámicos	37
I-4.1.1. Mecanismo de acción de los antibióticos $\beta$ lactámicos	38
I-4.1.2. Resistencia antimicrobiana a antibióticos $\beta$ lactámicos	39
I-4.1.3. Resistencia a $\beta$ lactámicos por enzimas $\beta$ lactamasas	40
I-4.1.4. Control genético de la resistencia	41
I-4.2. Características generales de Penicilinas y Cefalosporinas	42
I-4.2.1. Penicilinas	42
I-4.2.2. Cefalosporinas	43
I-4.3. Características de los antibióticos seleccionados	43
I-4.4. Espectro de acción de los antibióticos seleccionados	45
I-5. El microorganismo	46
I-5.1. Características generales	46
I-5.2. Estructura de la pared	46
I-5.3. Productos extracelulares: Toxinas y Enzimas	47
I-5.4. Procesos infecciosos	49
I-5.5. Diagnóstico	50
I-6.6. Tratamiento	50
I-6. Referencias	51
<b>CAPITULO II. Materiales y Métodos</b>	<b>63</b>
II-1. Reactivos y solventes	63
II-1.1. Sensibilizadores	63
II-1.2. Sustratos de estudio	63
II-1.3. Solventes	63
II-1.4. Otros reactivos	63
II-1.5. Medios de cultivo	64
II-1.6. Cepas de <i>S. aureus</i> utilizadas	64
II-2. Determinaciones fisicoquímicas y fotoquímicas	64
II-2.1. Preparación de soluciones	64

II-2.2. Equipos utilizados	65
II-2.2.1. Determinaciones estacionarias	65
II-2.2.2. Determinaciones dinámicas	66
II-2.3. Metodología	70
II-2.3.1. Determinación del tiempo de vida de $O_2(^1\Delta_g)$	70
Por resolución temporal de la fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$	70
Por fotólisis estacionaria	72
II-2.3.2. Determinación de las constantes de velocidad de desactivación de los estados excitados del sensibilizador por los sustratos	73
II-2.3.2.1. Interacción sustrato-estado singlete excitado del sensibilizador	73
Método estacionario	73
Método resuelto en el tiempo	74
II-2.3.2.2. Interacción sustrato-estado triplete excitado del sensibilizador	75
Determinación de $^3k_q$	76
Espectros del estado $^3S^*$ en presencia y ausencia de los sustratos	76
Determinación del rendimiento cuántico de generación de radicales	78
II-2.3.3. Determinación de las velocidades relativas de consumo de oxígeno por los sustratos ( $v_r$ )	78
II-2.3.4. Análisis de los fotoproductos	79
II-3. Determinaciones microbiológicas	80
II-3.1. Preparación de medios de cultivo	80
II-3.2. Equipos utilizados	80
II-3.3. Metodología	80
II-3.3.1. Realización de las curvas de crecimiento de las cepas estudiadas	80
II-3.3.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) por macrodilución en caldo	81
II-3.3.3. Prueba de sensibilidad a los antibióticos por difusión en placa	82
II-3.3.4. Prueba de sensibilidad a los antibióticos fotodegradados	82
Por modificación del tamaño del halo de inhibición	83
Por recuento de viables	84
II-4. Referencias	85
<b>CAPÍTULO III. Antecedentes de la fotodegradación de Antibióticos</b>	<b>89</b>

<b>CAPÍTULO IV. Fotodegradación sensibilizada de antibióticos en presencia de RB y PN</b>	<b>97</b>
IV-1. Resultados	97
IV-1.1. Características de los sensibilizadores empleados	97
IV-1.2. Características de los compuestos estudiados	98
IV-1.3. Fotodegradación sensibilizada de los antibióticos en presencia de RB y PN	102
IV-1.4. Determinación de las velocidades relativas de consumo de oxígeno por los antibióticos ( $v_r$ )	105
IV-1.5. Interacción de los estados excitados del sensibilizador con los antibióticos	107
IV-1.6. Participación de las diferentes EROs en la fotodegradación sensibilizada por RB	110
IV-1.7. Determinación de la constante de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ por los antibióticos	112
IV-1.8. Análisis de fotoproductos	114
IV-2. Discusión	116
IV-3. Conclusiones	121
IV-4. Referencias	122
<b>CAPÍTULO V. Fotodegradación sensibilizada de antibióticos en presencia de Rf (Vitamina B2)</b>	<b>127</b>
V-1. Resultados	127
V-1.1. Características del sensibilizador empleado	127
V-1.2. Fotodegradación sensibilizada de los antibióticos en presencia de Rf	128
Determinación de las velocidades relativas de consumo de oxígeno por los antibióticos ( $v_r$ )	132
V-1.3. Desactivación de $^1Rf^*$ por los antibióticos	133
V-1.4. Desactivación de $^3Rf^*$ por los antibióticos	135
V-1.5. Participación de las diferentes EROs en la fotodegradación sensibilizada por Rf de los antibióticos	139
V-2. Discusión	144
V-3. Conclusiones	149

V-4. Referencias	151
<b>CAPÍTULO VI. Determinaciones Microbiológicas</b>	<b>157</b>
VI-1. Resultados y discusión	157
VI-1.1. Curvas de crecimiento de las cepas estudiadas	157
VI-1.2. Determinación de la CIM	160
VI-1.3. Prueba de sensibilidad a los antibióticos por difusión en placa	163
VI-1.4. Prueba de sensibilidad a los antibióticos Fotodegradados	165
Por modificación del tamaño del halo de inhibición	165
Por recuento de viables	168
VI-2. Conclusiones	171
VI-3. Referencias	172
<b>CAPÍTULO VII. Conclusiones finales</b>	<b>174</b>
<b>CAPÍTULO VIII. Apéndices</b>	<b>177</b>
VIII-1. Estructura química de los sensibilizadores empleados	177
VIII-2. Deducción de la ecuación del método de dobles inversas	178
VIII-3. Glosario de abreviaturas y símbolos utilizados	180

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura I.1.</b> Configuración electrónica de la molécula de oxígeno en su estado fundamental y sus estados excitados	7
<b>Figura I.2.</b> Diagrama de energía para el O <sub>2</sub>	9
<b>Figura I.3.</b> Formación de O <sub>2</sub> ( <sup>1</sup> Δ <sub>g</sub> ) por métodos químicos, fotoquímicos y biológicos	11
<b>Figura I.4.</b> Esquema de desactivación de O <sub>2</sub> ( <sup>1</sup> Δ <sub>g</sub> ). A: sustrato fotooxidable (desactivador), k <sub>d</sub> : constante de velocidad de desactivación física de O <sub>2</sub> ( <sup>1</sup> Δ <sub>g</sub> ) por moléculas de solvente, k <sub>q</sub> : constante de velocidad de desactivación física de O <sub>2</sub> ( <sup>1</sup> Δ <sub>g</sub> ) por el sustrato A, k <sub>r</sub> : constante de velocidad de desactivación química de O <sub>2</sub> ( <sup>1</sup> Δ <sub>g</sub> ) por el sustrato A	15
<b>Figura I.5.</b> Mecanismos de fotosensibilización Tipo I y Tipo II	31

<b>Figura I.6.</b> Mecanismo propuesto para fotooxidaciones sensibilizadas.(k: constantes de velocidad de: $^1k_d$ : desactivación natural de $^1S^*$ ; $^1k_q$ : desactivación de $^1S^*$ por A; $k_{ISC}$ : entrecruzamiento de sistemas; $^3k_d$ : desactivación natural de $^3S^*$ ; $^3k_p$ : formación de productos, $^3k_{qO_2}$ : desactivación de $^3S^*$ por $O_2$ ( $^3\Sigma_g^-$ ); $k_{ET}$ : transferencia de energía; $^3k_{qA}$ : desactivación de $^3S^*$ por A; $k_d$ : desactivación natural de $O_2(^1\Delta_g)$ ; $k_q$ desactivación física de $O_2(^1\Delta_g)$ por A; $k_r$ desactivación química de $O_2(^1\Delta_g)$ por A; $k_{rS}$ desactivación química de $O_2(^1\Delta_g)$ por S)	36
<b>Figura I.7.</b> Representación esquemática de la pared celular de bacterias Gram positivas	47
<b>Figura II.1.</b> Esquema del dispositivo utilizado en las experiencias en condiciones estacionarias	66
<b>Figura II.2.</b> Representación del equipamiento utilizado para la aplicación de TRPD	67
<b>Figura II.3.</b> Esquema del equipo utilizado para medidas de LFF	68
<b>Figura II.4.</b> Esquema del sistema utilizado para mantener flujo constante en medidas de LFF	68
<b>Figura II.5.</b> Diagrama de bloques de un TC-SPC. PMT: fotomultiplicador, TAC: convertidor tiempo-amplitud, ADC: convertidor analógico digital, MCA: analizador multicanal	69
<b>Figura II.6.</b> Señal típica del decaimiento de la fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ a 1270 nm en $D_2O$	71
<b>Figura II.7.</b> Representación de una señal transitoria típica obtenida por LFF	78
<b>Figura IV.1.</b> Espectros de absorción normalizados de los sensibilizadores (A) RB y (B) PN a pH 7,4 y 10	97
<b>Figura IV.2.</b> Estructuras químicas de los sustratos estudiados	98
<b>Figura IV.3.</b> Espectros de absorción normalizados de (A) Amx, (B) Cfx y (C) Cft a pH=7,4 y 10	100
<b>Figura IV.4.</b> Espectros de absorción normalizados de (A) Amp, (B) Cfd y (C) Ctx a pH=7,4 y 10	100
<b>Figura IV.5.</b> (A) Espectros de absorción de Cft a pH 7,4 en función de la concentración molar; (B) Absorbancia a 240 nm en función de la concentración	102

molar de Cft

**Figura IV.6.** Evolución de los espectros de absorción en función del tiempo de fotólisis para (A) Cft *vs.* PN a pH 10 (B) Amx *vs.* RB a pH 10 (C) Ctx *vs.* PN a pH 7,4 y (D) Amx *vs.* RB a pH 7,4.  $Abs_{RB^{549}} = 0,5$ ;  $Abs_{PN^{365}} = 0,5$ ;  $[Amx] = 1 \times 10^{-4} M$ ;  $[Cft] = 3 \times 10^{-5} M$ ;  $[Ctx] = 5 \times 10^{-5} M$

**Figura IV.7.** Gráficos de consumo de oxígeno por los Atb en función del tiempo de fotólisis para (A) Amx/RB, (B) Amx/PN, (C) Cfd/RB y (D) Cfd/PN en solución reguladora de pH 7,4 y 10.  $Abs_{RB^{549}} = 0,5$ ;  $Abs_{PN^{365}} = 0,5$ ;  $[Atb] = 5 \times 10^{-4} M$

**Figura IV.8.** Gráficos de consumo de oxígeno por los Atb en función del tiempo de fotólisis para (A) Cfx/PN, (B) Cft/PN (C) Amp/PN y (D) Ctx/PN en solución reguladora de pH 7,4 y 10.  $Abs_{RB^{549}} = 0,5$ ;  $Abs_{PN^{365}} = 0,5$ ;  $[Atb] = 5 \times 10^{-4} M$

**Figura IV.9.** Gráficos de Stern-Volmer para la desactivación del estado triplete excitado de RB por (A) Amx y (B) Cfd en solución reguladora de pH 7,4 y 10;  $Abs_{RB^{532}} = 0,3$

**Figura IV.10.** Decaimiento de la fosforescencia de  $O_2 (^1\Delta_g)$  a 1270 nm en ausencia y presencia de  $1 \times 10^{-4} M$  de Cft a pD 10

**Figura IV.11.** Consumo de oxígeno por (A) Amx a pH 10 y (B) Cfx a pH 7,4 sensibilizado por RB, en ausencia y en presencia de  $NaN_3$  y SOD.  $Abs_{RB^{549}} = 0,5$ ;  $[Atb] = 5 \times 10^{-4} M$ ;  $[NaN_3] = 1 mM$ ;  $[SOD] = 1mg/100 mL$

**Figura IV.12.** Gráficos de Stern- Volmer para la desactivación total de la fosforescencia de  $O_2 (^1\Delta_g)$  por (A) Cfx (B) Cfd (C) Cft (D) Ctx y (E) Amx a pD 7,4 y 10.  $Abs_{PN^{355}} = 0,3$

**Figura IV.13.** Gráfico de dobles recíprocas para la determinación de  $k_t$  para Amp a pH 7,4 y 10.  $Abs_{PN^{365}} = 0,5$

**Figura IV.14.** Estructuras químicas tentativas de los fotoproductos detectados en la fotodegradación sensibilizada en presencia de RB para los antibióticos Amx y Cfx

**Figura IV.15.** Posible mecanismo de ataque de oxígeno (A) al anillo aromático y (B) al grupo metilo presentes en la estructura química de Amx.

**Figura V.1.** Espectro de absorción normalizado del sensibilizador Rf a pH 7,4. 128

**Figura V.2.** Cambios en los espectros de absorción de los Atb en función del 129

tiempo de irradiación para (A) Amx/Rf vs. Rf (B) Cfx/Rf vs. Rf, (C) Cft/Rf vs Rf en solución reguladora de pH 7,4;  $Abs_{Rf}^{445} = 0,5$ ;  $[Amx] = 4 \times 10^{-4} M$ ;  $[Cfx] = 1 \times 10^{-4} M$ ;  $[Cft] = 3 \times 10^{-5} M$

**Figura V.3.** Cambios en los espectros de absorción de los Atb en función del tiempo de irradiación para (A) Amp/Rf vs. Rf (B) Cfd/Rf vs. Rf, (C) Ctx/Rf vs Rf en solución reguladora de pH 7,4;  $Abs_{Rf}^{445} = 0,5$ ;  $[Amp] = 1,5 \times 10^{-3} M$ ;  $[Cfd] = 3,5 \times 10^{-5} M$ ;  $[Ctx] = 5 \times 10^{-5} M$

**Figura V.4.** Cambios en los espectros de absorción de Rf en ausencia y presencia de Cft a  $t=0$  y  $t= 2$  min de irradiación, en solución saturada de Argón.  $Abs_{Rf}^{445} = 0,5$ ;  $[Cft] = 5 \times 10^{-4} M$

**Figura V.5.** Gráficos de consumo de oxígeno por los Atb en función del tiempo de fotólisis para (A) Amx, Cfx y Cft, y (B) Amp, Cfd y Ctx, en presencia de Rf como sensibilizador a pH 7,4;  $Abs_{Rf}^{445} = 0,5$ ;  $[Atb] = 5 \times 10^{-4} M$

**Figura V.6.** Espectros de emisión de fluorescencia de Rf en presencia y en ausencia de 3 mM de (A) Cfx y (B) Cfd en solución reguladora de pH 7,4

**Figura V.7.** Gráficos representativos de Stern-Volmer para la desactivación del estado singlete excitado de Rf por (A) Amx y Cft y (B) Cfx y Cfd en solución reguladora pH 7,4

**Figura V.8.** Gráficos de Stern Volmer para la desactivación del estado triplete excitado de Rf por (A) Amx y Amp, (B) Cfx y Cfd, (C) Cft y Ctx en solución reguladora de pH 7,4;  $Abs_{Rf}^{445} = 0,3$

**Figura V.9.** Espectros de triplete de Rf en solución saturada de Argón, en ausencia y en presencia de (A) Amx (B) Cfx (C) Cft y (B) Ctx, determinados a 1 y 15  $\mu s$  después del pulso del láser para Rf y Atb respectivamente. Inserto: Espectros de triplete de Rf en solución saturada de Argón (1  $\mu s$ ), en ausencia y en presencia de Atb (15  $\mu s$ ) normalizados a 670 nm.  $[Amx] = 3 \times 10^{-4} M$ ;  $[Cfx] = 6 \times 10^{-4} M$ ;  $[Cft] = [Ctx] = 5 \times 10^{-5} M$

**Figura V.10.** Decaimiento de la absorción del transitorio de Rf en ausencia de Ctx a 670 nm y Rf en presencia de  $5 \times 10^{-5} M$  de Ctx a 570 nm en solución acuosa.  $Abs_{Rf}^{445} = 0,3$

**Figura V.11.** Gráficos de consumo de oxígeno por los Atb en función del tiempo de fotólisis en ausencia y presencia de inhibidores específicos para (A)

Amx, (B) Cfx, (C) Cft en Rf pH 7,4; Abs <sub>SR</sub> <sup>445</sup> = 0,5; [Atb]= 5x10 <sup>-4</sup> M; [NaN <sub>3</sub> ]= 1 mM; [D-manitol]= 10 mM; [SOD]=[CAT]=1mg%	
<b>Figura V.12.</b> Gráficos de consumo de oxígeno por los Atb en función del tiempo de fotólisis en ausencia y presencia de inhibidores específicos para (A) Amp, (B) Cfd, (C) Ctx en Rf pH 7,4; Abs <sub>SR</sub> <sup>445</sup> = 0,5; [Atb]= 5x10 <sup>-4</sup> M; [NaN <sub>3</sub> ]= 1 mM; [D-manitol]= 10 mM; [SOD]=[CAT]=1mg%	141
<b>Figura V.13.</b> Espectros de absorción de (A) Cfx y Cfd y (B) Cft y Ctx en ausencia y presencia de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 mM; [Cfx]= [Cfd]= 1x10 <sup>-4</sup> M; [Cft]= [Ctx]=3 x 10 <sup>-5</sup> M	143
<b>Figura VI.1.</b> Curvas de crecimiento de las cepas de <i>S. aureus</i> DM1, DM2 y ATCC 25923	157
<b>Figura VI.2.</b> Curva de crecimiento de <i>S. aureus</i> DM1 en ausencia y presencia de RB (Abs <sub>RB</sub> <sup>549</sup> = 0,5)	159
<b>Figura VI.3.</b> Curvas de crecimiento de <i>S.aureus</i> (A) DM1y (B) ATCC 25923, en presencia de 1 mg/L de Amx, 8 mg/L de Cfx y 8 mg/L de Cft	159
<b>Figura VI.4.</b> Curva de crecimiento de <i>S. aureus</i> DM1 en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de Cfd	160
<b>Figura VI.5.</b> Método de macrodilución en tubo para la determinación de la CIM. (A) Amp sobre <i>S. aureus</i> DM1 (B) Cfd sobre <i>S. aureus</i> DM2 y (C) Ctx sobre <i>S.aureus</i> ATCC 25923. <u>CE</u> : control de esterilidad; <u>CC</u> : control de crecimiento	162
<b>Figura VI.6.</b> Método de difusión en agar para determinar el efecto de la actividad inhibitoria de Ctx sobre la cepa <i>S. aureus</i> (A) DM1 y (B) DM2 y (C) Amp sobre la cepa DM2. Los números corresponden a las concentraciones de Atb ensayadas. (1= 0,2 mM; 2=0,4 mM; 3=0,6 mM; 4=0,8 mM; 5=1 mM; 6=1,2 mM; 7=1,5 mM; 8=2 mM)	163
<b>Figura VI.7.</b> Efecto de la concentración de los Atb en solución reguladora de pH 7,4, sobre el halo de inhibición de la cepa de <i>S. aureus</i> (A y C) DM1 y (B y D) DM2	164
<b>Figura VI.8.</b> Método de difusión en agar para determinar la actividad inhibitoria de Amp sobre la cepa <i>S. aureus</i> ATCC 25923. Los números indican las concentraciones ensayadas. (5=1 mM; 6=1,2 mM; 7=1,5 mM; 8=2 mM)	165



<b>Figura VI.9.</b> Método de difusión en agar para determinar el efecto los distintos tiempos de fotólisis sobre los halos de inhibición de los Atb (A) Amp, (B) Cfd, (C) Amx y (D) Cft sobre la cepa <i>S. aureus</i> DM1. (1= 0 min; 2=10 min; 3=20 min; 4=30 min, 5=45 min; 6=60 min; 7=90 min; 8=120 min; RB)	166
<b>Figura VI.10.</b> Índices relativos de decrecimiento de la actividad bactericida de los Atb a pH 7,4 después de la fotooxidación sensibilizada con RB ( $Ab_{SRB}^{549}=0,5$ ) sobre (A) <i>S. aureus</i> DM1 y (B) <i>S. aureus</i> DM2. $H_0$ y $H$ representan los radios de los halos inhibitorios a $t=0$ y a distintos tiempos de fotólisis, respectivamente	166
<b>Figura VI.11.</b> Método de difusión en agar para determinar el efecto de los distintos tiempos de fotólisis sobre los halos de inhibición de Amp sobre la cepa <i>S. aureus</i> ATCC 25923. (1= 0 min; 2=10 min; 3=20 min; 4=30 min; 5=45 min; 6=60 min; 7=90 min; 8=120 min; RB)	168
<b>Figura VI.12.</b> Método de difusión en agar para determinar el efecto de los distintos tiempos de fotólisis (0, 30, 60 90 y 120 min) sobre los halos de inhibición para la cepa <i>S. aureus</i> ATCC 25923 en presencia de RB	168
<b>Figura VI.13.</b> Método de recuento de viables para determinar el efecto de la fotólisis de Cft sobre la cepa <i>S. aureus</i> DM2. (A) control de crecimiento de la cepa en ausencia de Cft (B) <i>S. aureus</i> DM2 en presencia de 100 mg/L de Cft antes (S/F) y después (F) de la fotólisis	169
<b>Figura VI.14.</b> Efecto de Cft (16 m/L y 100 mg/L) antes y después de 4 hs de fotólisis en presencia de RB, sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i> DM2	170

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla IV.1.</b> Coeficientes de absorción molar ( $\epsilon$ ) de los Atb en buffer fosfato de pH 7,4 y 10	102
<b>Tabla IV.2.</b> Velocidades relativas de consumo de oxígeno ( $v_r$ ) de los Atb a pH 7,4 y 10 en presencia de RB ó PN como sensibilizador; constantes de velocidad para la desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ por los Atb ( $k_t$ )	106
<b>Tabla IV.3.</b> Constantes de velocidad para la desactivación del estado triplete	109

excitado de RB por los Atb ( ${}^3k_q$ )

**Tabla IV.4.** Velocidades relativas de consumo de oxígeno del sistema Atb/RR/solución reguladora pH 7,4 y 10 en ausencia y presencia de inhibidores específicos ( $v_{inh}/v_0$ ).  $\text{NaN}_3$  (1 mM), SOD (1 mg%) 111

**Tabla IV.5.** Análisis por HPLC-masa para los productos de degradación fotosensibilizada de Amx (fotolizada 5 horas) y Cfx (fotolizada 1 hora) a pH 7,4; [Atb]= 2 mM;  $t_r$ = tiempo de retención; peso molecular de Amx ( $M_{Amx}$ )= 365; peso molecular de Cfx ( $M_{Cfx}$ )= 347. ND: no detectado 115

**Tabla V.1.** Velocidades relativas de consumo de oxígeno del sistema Atb/Rf/solución reguladora pH 7,4 ( $v_r$  Rf) y Atb/PN/solución reguladora de pH 7,4 ( $v_r$  PN); constante de velocidad para la desactivación de  ${}^1\text{Rf}^*$  por los Atb ( ${}^1k_q$ ) y constante de velocidad para la desactivación de  ${}^3\text{Rf}^*$  por los Atb ( ${}^3k_q$ ) 133

**Tabla V.2.** Velocidades relativas de consumo de oxígeno del sistema Atb/Rf/solución reguladora pH 7,4 en ausencia y presencia de inhibidores específicos ( $v_{inh}/v_0$ ).  $\text{NaN}_3$  (1 mM), SOD (1 mg%), CAT (1 mg%) y D-manitol (10 M) 142

**Tabla VI.1.** Rango de concentraciones utilizado de cada Atb para el ensayo de CIM 161

**Tabla VI.2.** Valores de CIM encontrados para los Atb por la técnica de macrodilución en tubo, expresados en mg/L 161

# INTRODUCCIÓN

## IMPORTANCIA DEL TEMA Y OBJETIVOS

---

### 1. IMPORTANCIA DEL TEMA

Varias sustancias farmacológicas han sido reconocidas como nuevos contaminantes debido a su persistencia y bioacumulación en el ambiente, provocando efectos negativos tanto en ecosistemas acuáticos como terrestres<sup>1,2</sup>.

Los antibióticos pertenecen a esta nueva clase de contaminantes debido a que, la mayoría de ellos, no sufren inactivación metabólica, de manera que son excretados en el ambiente tal cual como fueron administrados<sup>3- 7</sup> y no son biodegradables por lo que permanecen en el sistema acuático incluso luego de los tratamientos convencionales del agua<sup>8- 11</sup>.

Entre los efectos negativos que se generan, la presencia de estos compuestos en ecosistemas acuáticos puede contribuir en la proliferación de cepas bacterianas resistentes a múltiples e importantes clases de antibióticos<sup>12</sup>. Por lo que el desarrollo de diferentes métodos capaces de remover antibióticos del medio ambiente ha recibido especial atención en los últimos años<sup>13- 19</sup>.

Los procesos de fotooxidación sensibilizada pueden constituir una alternativa para la degradación de antibióticos ya que, si bien estos compuestos son transparentes a la irradiación con luz natural, pueden ser degradados a través de la acción de sustancias fotosensibilizadoras cuya propiedad es absorber dicha luz y producir estados excitados con capacidad de iniciar una cascada de fotoprocesos en los cuales se generan especies altamente reactivas. Por otro lado, los antibióticos degradados por estas especies fotogeneradas pueden disminuir sus actividades terapéuticas específicas<sup>20</sup>. Esto último advierte sobre las condiciones de almacenamiento de estos compuestos y constituye un aspecto relevante desde el punto de vista biológico y comercial.

Por las razones anteriormente mencionadas, en este trabajo de Tesis se seleccionaron antibióticos de la familia de los  $\beta$  lactámicos, ampliamente utilizados en medicina humana y veterinaria<sup>21,22,23</sup>, con el propósito de investigar aspectos cinéticos y mecanísticos de procesos fotooxidativos sensibilizados por colorantes naturales y artificiales sobre estos compuestos y las posibles implicancias de los procesos en su actividad antimicrobiana específica. La investigación de dichos aspectos permite el acceso a importante información, como la factibilidad de que ocurran bajo

determinadas condiciones medioambientales, la velocidad y eficiencia del proceso, los valores de variables controlables para evitar o promover el efecto fotooxidativo, productos de fotooxidación generados, modificaciones en la actividad antimicrobiana, para mencionar solamente algunas.

Consideramos que los conocimientos que en esta Tesis se presentan pueden ayudar a predecir el comportamiento de los sustratos estudiados en ambientes naturales y, potencialmente, la fotodegradación sensibilizada, puede constituir un mecanismo que contribuya a la disminución de los mismos en el ambiente y por lo tanto a la prevención de los múltiples efectos negativos que su presencia genera.

En el *capítulo I* se presenta una reseña bibliográfica acerca de las características principales de las especies reactivas de oxígeno que pueden ser generadas a partir de procesos de fotosensibilización. En este capítulo también se incluye una descripción detallada de los antibióticos y del microorganismo seleccionado para el estudio. En el *capítulo II* se detallan los materiales y métodos utilizados en los ensayos.

En el *capítulo III* se comentan los antecedentes que existen sobre la fotodegradación de fármacos, especialmente de antibióticos  $\beta$  lactámicos.

En los *capítulos IV, V y VI* se muestran los resultados experimentales obtenidos y se intenta ofrecer posibles explicaciones a los mismos teniendo en cuenta los conocimientos informados en la bibliografía actual. Específicamente, en el *capítulo IV* se presentan los resultados para el estudio del mecanismo y la cinética de la fotooxidación sensibilizada de los  $\beta$  lactámicos: Amoxicilina, Ampicilina, Cefalexina, Cefadroxil, Ceftriaxona y Cefotaxima, utilizando los colorantes sintéticos Rosa de bengala y Perinaftenona, los cuales resultan generadores de la especie reactiva de oxígeno, oxígeno singlete<sup>24,25</sup>. En el *capítulo V* se amplió el estudio mecanístico y cinético de los mismos antibióticos utilizando como sensibilizador el colorante natural Vitamina B2 ó Riboflavina, el cual genera, además de oxígeno singlete, otras especies reactivas de oxígeno<sup>26</sup> capaces de reaccionar con los sustratos estudiados. Por último, en el *capítulo VI*, se muestran los resultados obtenidos en los ensayos microbiológicos los cuales pretenden relacionar los efectos de la fotodegradación sensibilizada de los antibióticos con la modificación de la actividad antimicrobiana de los mismos sobre diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*.

## 2. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS DE ESTE TRABAJO DE TESIS

### GENERAL

Investigar los procesos fotooxidativos sensibilizados sobre diversos antibióticos y el posible efecto sobre su actividad antimicrobiana.

### ESPECÍFICOS

- Caracterizar los sustratos de interés en medio homogéneo y en distintas condiciones experimentales.
- Estudiar la fotodegradación sensibilizada por irradiación con luz ultravioleta visible (simil-medioambiental) de los antibióticos seleccionados en presencia de los colorantes artificiales Rosa de bengala y Perinaftenona, y el colorante natural Riboflavina (Vitamina B2).
- Realizar un estudio cinético y mecanístico en presencia de cada uno de los sensibilizadores de manera de poder establecer relaciones entre las estructuras de los sustratos, características ambientales y susceptibilidad a la fotooxidación mediada por especies reactivas de oxígeno.
- Caracterizar los fotoproductos obtenidos como consecuencia del proceso fotodegradativo de los antibióticos.
- Evaluar la actividad bactericida de los antibióticos a diferentes tiempos de irradiación fotosensibilizada, sobre diferentes cepas de *S. aureus*.

### 3. REFERENCIAS

1. Trovó A. G., Santos Melo S. A., Fernandes Pupo Nogueira R. Photodegradation of the pharmaceutical amoxicillin, bezafibrate and paracetamol by photo-Fenton process-Application to sewage treatment plant effluent. *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (2008) 198:215.
2. Elmolla E. S., Chaudhuri M. Degradation of amoxicillin, ampicillin and cloxacillin antibiotics in aqueous solution by the UV/ZnO photocatalytic process. *J. Hazardous Materials* (2010) 173:445.
3. Al-Ahmad A., Daschner F. D., Kümmerer K. Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin-G and sulfamethoxazole and inhibition o waste water bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* (1999) 37:158.
4. Kim S., Jensen J. N., Aga D. S., Weber A. S. Tetracycline as a selector for resistant bacteria in activated sludge. *Chemosphere* (2007) 66:1643.
5. Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment - a review - part I. *Chemosphere* (2009) 75:417.
6. Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment - a review - part II. *Chemosphere* (2009) 75:435.
7. Yu D. J., Yi X. L., Ma Y. F., Yin B., Zhuo H. L., Li J., Huang Y. F. Effects of administration mode of antibiotics on antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* in aquatic ecosystems. *Chemosphere* (2009) 76:915.
8. Kümmerer K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants in to wastewater by hospitals in relation to other sources. A review. *Chemosphere* (2001) 45:957.
9. Richardson S. D., Ternes T. Water analysis: Emerging contaminant ant current issues. *Analytical Chemistry* (2005) 77:3807.
10. Zwiener C., Gremm T. J., Frimmel F. H. Pharmaceuticals in the Environment: Sources Fate, Effects, and Risks. Springer Verlag, Weinheim, Germany (2004)
11. Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz K. L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment* (1999) 225:109.
12. Kümmerer K. Resistance in the environment. *J. Antimicrobial Chemotherapy* (2004) 54:311.
13. Prabhakaran D., Sukul P., Lamshoeft M., Maheswari M.A., Zuehlke S., Spitteller M. Photolysis of difloxacin and sarafloxacin in aqueous system. *Chemosphere* (2009) 77:739.
14. Avisar D., Lester Y., Mamane H. PH induced polychromatic UV treatment for the removal of a mixture of SMX, OTC and CIP from water. *J. Hazardous Materials* (2010) 75:1068.
15. Koyuncu I., Arikan O. A., Wiesner M. R., Rice C. Removal of hormones and antibiotics by nanofiltration membranes. *J. Membrane Science* (2008) 309:94.

- 
16. Ternes T. A., Stüber J., Herrmann N., McDowell D., Ried A., Kampmann M., Teiser B. Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater?. *Water Research* (2003) 37:1976.
  17. Benitez F. J., Acero J. L., Real Roldán G. Ozonation of pharmaceutical compounds: rate constants and elimination in various water matrices. *Chemosphere* (2009) 77:53.
  18. Choi K. J., Kim S. G., Kim S. H. Removal of tetracycline and sulfonamide classes of antibiotic compound by powdered activated carbon. *Environmental Science and Technology* (2008) 29:333.
  19. Choi K. J., Kim S. G., Kim S. H. Removal of antibiotics by coagulation and granular activated carbon filtration. *J. Hazardous Materials* (2008) 151:38.
  20. Posadaz A., Sanchez E., Gutiérrez M. I., Calderon M., Bertolotti S., Biasutti M. A., García N. A. Riboflavin and Rose Bengal sensitised photooxidation of sulfathiazole and succinylsulphathiazole. Kinetics study and microbiological implications. *Dyes and Pigments* (2000) 45:219.
  21. Bailón-Pérez M. I., García-Campaña A. M., Cruces-Blanco C., del Olmo Iruela M. J. *Chromatography A* (2008) 1185:273.
  22. Rozas O., Contreras D., Mondaca M. A., Pérez-Moya M., Mansilla H. D. Experimental design of Fenton and photo-Fenton reactions for the treatment of ampicillin solutions. *J. Hazardous Materials* (2010) 177:1025.
  23. Dail M. K., Mezyk S. P. Hydroxyl-Radical-Induced Degradative Oxidation of  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Water: Absolute Rate Constant Measurements. *J. Physical Chemistry A* (2010) 114:8391.
  24. Neckers D. C. Rose Bengal. Review. *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (1989) 47: 1.
  25. Nonell S., Gozález M., Trull F. R. H-phenalen-1-ona-2-sulfonic acid: an extremely efficient singlet oxygen sensitizer for aqueous media. *Afinidad* (1993) 448:445.
  26. Tayler M. B., Radda G. K. Flavins as a photosensitizer. *Methods in Enzymology* (1971) 18:496.

# CAPÍTULO I.

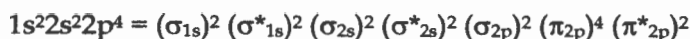
## CONSIDERACIONES TEÓRICAS

### I-1. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DE LA MOLÉCULA DE OXÍGENO

El oxígeno molecular es una de las sustancias más importantes de la tierra. Comprende el 21% de la atmósfera, el 89% de las sales del agua y un 47% como mínimo de la fase de la tierra. Además, la mayoría de los seres vivos utilizan oxígeno para la generación de energía y la respiración.

Desde el punto de vista fotoquímico resulta una molécula muy importante debido a su alta reactividad y a la energía relativamente baja de sus estados excitados.

Para comprender la reactividad química del oxígeno es necesario conocer su estructura electrónica. En 1928, Mulliken<sup>1</sup> usando la teoría cuántica explicó la propiedad paramagnética de la molécula de oxígeno. Su análisis demostró que los electrones no apareados, ocupan cada uno de ellos dos orbitales moleculares externos diferentes (el orbital  $\pi$  enlazante y el  $\pi$  antienlazante), y por lo tanto presenta la siguiente configuración electrónica:



Los estados resultantes de considerar esta configuración electrónica, pueden representarse esquemáticamente como se muestra en la **Figura I.1**, de acuerdo a tres arreglos posibles para los electrones<sup>2,3</sup>.

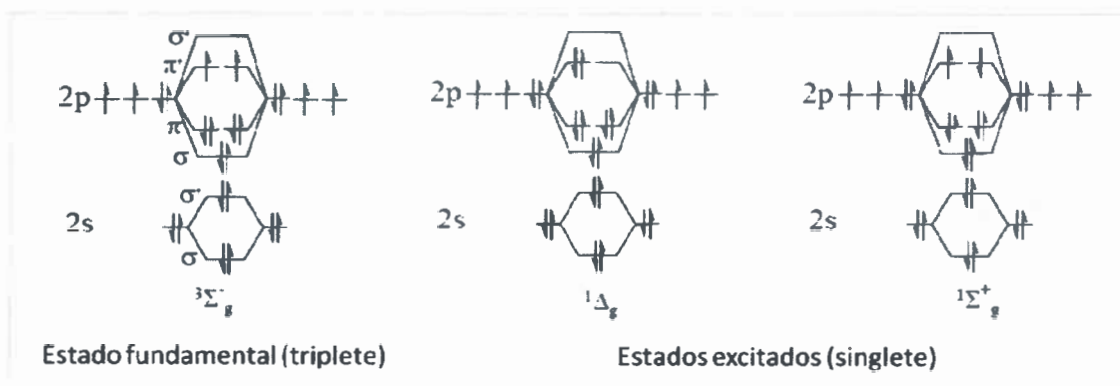


Figura I.1. Configuración electrónica de la molécula de oxígeno en su estado fundamental y sus estados excitados.



De los seis electrones  $\pi$ , cuatro completan los orbitales de enlace degenerados  $\pi^+$  y  $\pi^-$  mientras que los otros dos llenan parcialmente los orbitales de antienlace degenerados  $\pi^{*+}$  y  $\pi^{*-}$ . El arreglo de estos dos electrones en los orbitales de antienlace determina cual de los tres estados que surgen,  $^3\Sigma_g^-$ ,  $^1\Delta_g$  y  $^1\Sigma_g^+$ , es energéticamente el más bajo.

Según la regla de Hund el estado fundamental, de menor energía, es aquél que posee la mayor multiplicidad de espín. Por lo tanto, la configuración con multiplicidad triplete corresponde al estado fundamental de la molécula de oxígeno ( $O_2(^3\Sigma_g^-)$ ) y es la forma más abundante y estable de oxígeno en la naturaleza.

Dado que el oxígeno posee los electrones no apareados con el giro de espín paralelo, le dificulta tomar dos electrones libres con giro antiparalelo, por lo que sólo puede interaccionar con los electrones de otros elementos y compuestos que estén libres y que tengan el giro de espín opuesto, pero recibéndolos de uno en uno. Esto explica por qué en su estado fundamental y a temperatura ambiente el oxígeno es muy poco reactivo.

En 1934 Herzberg<sup>4</sup> descubrió, por espectroscopia, la existencia de un estado de energía superior de oxígeno y reportó al oxígeno singlete; éste se forma cuando uno de los dos electrones libres del oxígeno en estado fundamental capta energía y cambia el giro de espín. Cuando eso sucede, inmediatamente se aparea con el otro electrón libre. Las dos especies de oxígeno en estado singlete son: el oxígeno singlete sigma ( $O_2(^1\Sigma_g^+)$ ), que tiene los dos electrones desapareados pero con giros de espín opuestos, y el oxígeno singlete delta ( $O_2(^1\Delta_g)$ ), en el que estos electrones se han apareado (Figura I.1). De los dos estados excitados mencionados sólo el de menor energía,  $O_2(^1\Delta_g)$ , juega un papel significativo en reacciones en solución y es el que tiene importancia médica, biológica y ambiental, como se explicará más adelante en este capítulo. Esta especie que se encuentra a 22,5 Kcal/mol sobre el estado fundamental es inestable, puede decaer al estado fundamental emitiendo luz fosforescente en la región del infrarrojo (1270 nm) o reaccionar aceptando dos electrones, libres o apareados. El estado de mayor energía,  $O_2(^1\Sigma_g^+)$ , por su parte, se desactiva rápidamente a  $O_2(^1\Delta_g)$  por lo que no tiene posibilidades de participar en reacciones<sup>5</sup>. En la Figura I.2 se puede apreciar el diagrama de energía para el oxígeno.



Figura I.2. Diagrama de energía para el  $O_2$ .

Cabe aclarar que estas funciones son apropiadas solo para moléculas libres de oxígeno<sup>6</sup>. Es decir, si la molécula sufre colisiones con otras moléculas en fase gaseosa o es perturbada por la presencia de un medio condensado, el estado  $^1\Sigma_g^+$  puede mezclarse con el estado  $^1\Delta_g$ .

## I-2. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROS)

El término EROs (especies reactivas de oxígeno) se emplea para incluir a todas las especies de oxígeno radicalarias u otras que, aunque no contienen electrones desapareados, están implicadas en la generación de radicales libres. Estas especies se pueden separar en dos grupos:

- Radicales libres de oxígeno, tales como anión radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxilo ( $HO^\bullet$ ), radical peroxilo ( $RO_2^\bullet$ ) y radical alcoxilo ( $RO^\bullet$ ).
- Derivados no radicales, como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HClO$ ), oxígeno singlete ( $O_2(^1\Delta_g)$ ) y ozono ( $O_3$ )<sup>7</sup>.

La formación de EROs ocurre a través de una serie de reacciones químicas donde los radicales libres y los intermediarios no radicalarios están interrelacionados<sup>8</sup>.

Son moléculas muy reactivas debido a que en el último orbital tienen un electrón no apareado (radical libre), lo cual les confiere inestabilidad física. Las principales especies son las que se producen por la ruptura o excitación del oxígeno y las especies parcialmente reducidas ( $O_2(^1\Delta_g)$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^\bullet$  y  $H_2O_2$ ).

En condiciones fisiológicas normales, las células producen constantemente cantidades moderadas de estas especies para llevar a cabo determinadas funciones. Principalmente, participan en el mecanismo de defensa del organismo frente a

determinados agentes infecciosos, aunque también son capaces de destruir células tumorales. Así mismo la concentración de EROs es finamente controlada por la acción de enzimas y antioxidantes encargados de neutralizar estas especies.

Si un agente estresante induce un aumento en el contenido intracelular de EROs de manera que sobrepasa las defensas enzimáticas y de antioxidantes, estas especies son capaces de reaccionar rápidamente con biomoléculas susceptibles a oxidarse como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y azúcares con el consiguiente daño de las funciones celulares, conduciendo a lo que se conoce como estrés oxidativo<sup>9,10</sup>. Este proceso incluye peroxidación de lípidos de membranas celulares y subcelulares, daños en enzimas y proteínas respiratorias y daños en el ADN nuclear y mitocondrial.

Las EROs también pueden generarse en células expuestas a la luz como el tejido epitelial y ocular, mediante procesos de fotosensibilización como consecuencia de la intervención de sustancias que actúan como sensibilizadores, tal es el caso de ciertas flavinas<sup>11,12,13</sup>, NADH/NADPH<sup>14</sup>, ácido urocánico<sup>15</sup> y algunos esteroides<sup>16</sup>.

También, como consecuencia de procesos fotosensibilizados, las EROs pueden generarse en el medio ambiente debido a la presencia de moléculas con capacidad sensibilizadora. Se ha demostrado que la presencia de sustancias húmicas, tales como los ácidos húmicos y los ácidos fúlvicos, y riboflavina en aguas, está asociada a la degradación fotooxidativa de múltiples contaminantes ambientales<sup>17- 21</sup>. A lo largo de este capítulo se citarán algunos ejemplos específicos.

En el desarrollo de este trabajo de Tesis, el método de fotosensibilización fue utilizado para generar las especies reactivas de oxígeno. Es un método que produce principalmente,  $O_2(^1\Delta_g)$  y  $O_2^{\cdot-}$  por lo que, a continuación, se describirá en detalle a estas dos especies. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, la fotosensibilización suele involucrar también otras EROs generadas a partir de  $O_2^{\cdot-}$ , como lo son  $H_2O_2$  y  $HO^{\cdot}$ , especies sobre las que se dará una descripción sintética acerca de su generación y principales reacciones en las que participan.

### **I-2.1. OXÍGENO SINGLETE ( $O_2(^1\Delta_g)$ )**

El  $O_2(^1\Delta_g)$  es una especie electrofílica sumamente reactiva que tiene la capacidad de atacar rápidamente compuestos orgánicos. Es alrededor de 1000 veces más reactiva que el oxígeno en estado fundamental ( $O_2(^3\Sigma_g^-)$ ). Esta mayor reactividad se debe simplemente, a que numerosas sustancias con las que reacciona se encuentran en

estado fundamental singlete, entonces la reacción singlete-singlete es más probable que una reacción triplete-singlete, como sería con  $O_2(^3\Sigma_g^-)$ , dado que la multiplicidad de espín es la misma.

La importancia de las reacciones de  $O_2(^1\Delta_g)$  han sido reconocidas en numerosas áreas como la medicina, la bioquímica, química de los alimentos, química del medio ambiente, entre otras.

En los sistemas biológicos causa daños a los tejidos y muerte celular al afectar estructuras como la membrana plasmática, o componentes subcelulares tales como el ADN, aminoácidos, proteínas y lípidos<sup>22,23,24</sup>.

En los alimentos produce una rápida oxidación de ciertos componentes, incluso a temperaturas muy bajas<sup>25</sup>, es capaz de modificar el sabor, especialmente de aceites y productos lácteos expuestos a la luz, así como pérdida de vitaminas principalmente vitamina D, riboflavina y ácido ascórbico<sup>26</sup>.

También se ha demostrado su participación en la fotodegradación sensibilizada de compuestos tales como pesticidas fenólicos<sup>20</sup>, fungicidas<sup>27</sup>, diversos fármacos<sup>28-31</sup>, antioxidantes sintéticos<sup>32</sup>, productos industriales<sup>33</sup>, entre otros.

### I-2.1.1. Generación de $O_2(^1\Delta_g)$

$O_2(^1\Delta_g)$  puede ser generado biológica, química y fotoquímicamente, las diferentes vías de formación de esta especie se muestran en la **Figura I.3**. Algunos mecanismos no han sido probados científicamente y están siendo cuestionados.

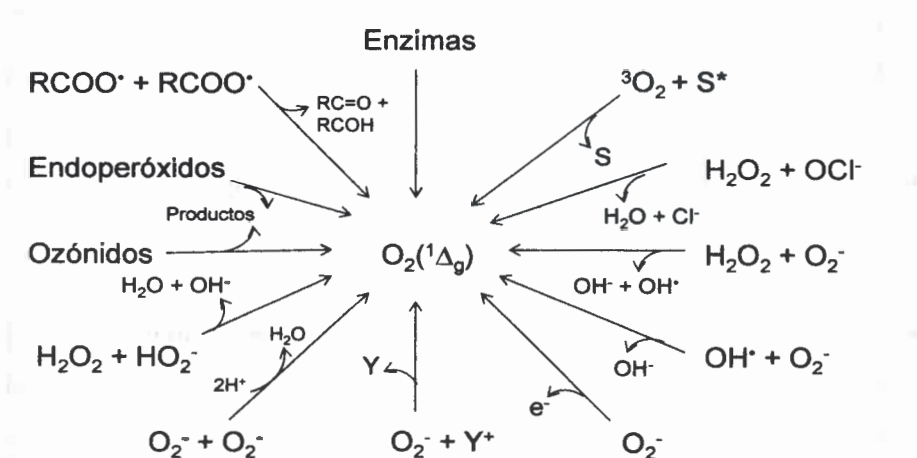


Figura I.3. Formación de  $O_2(^1\Delta_g)$  por métodos químicos, fotoquímicos y biológicos<sup>34</sup>.

En sistemas vivos existen dos fuentes principales de generación de  $O_2(^1\Delta_g)$ : los procesos inflamatorios y la fotosensibilización de las áreas expuestas a la luz<sup>35</sup>. Esta especie ha sido considerada el principal agente citotóxico en la terapia fotodinámica (PDT)<sup>36,37</sup>, un tratamiento emergente, particularmente para el cáncer<sup>38</sup>, que requiere la combinación de oxígeno, radiación visible y drogas (fotosensibilizadores) que conducen al deterioro o muerte del tejido.

A continuación se presenta una descripción sintética de algunos métodos químicos y fotoquímicos para la generación de  $O_2(^1\Delta_g)$  luego, con más detalle en la sección 3 de este capítulo, se describirá el método de generación fotosensibilizada dado que, como ya se mencionó, fue el empleado en este Trabajo de Tesis.

#### I-2.1.1.1. Generación química

La generación química implica reacciones exotérmicas en la cual uno de los productos es  $O_2(^1\Delta_g)$ . Estas reacciones son, a menudo, quimioluminiscentes debido a los decaimientos radiativos de esta especie. Existen muchas reacciones químicas, a continuación se mencionan algunos ejemplos:

##### a. *Por descomposición de $H_2O_2$*

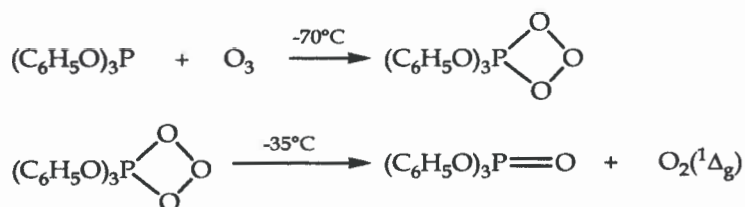
La reacción puede ocurrir en presencia de hipoclorito de sodio o hipobromito de sodio:



Concretamente, el  $O_2(^1\Delta_g)$  se forma a partir del anión peróxido de cloro ( $ClOO^-$ ) que es un intermediario en la reacción anteriormente mencionada. Esta reacción tuvo un rol importante en la historia de la química de  $O_2(^1\Delta_g)$  debido a que este sistema fue la evidencia definitiva de la participación de  $O_2(^1\Delta_g)$  en reacciones de fotooxigenación sensibilizada<sup>39</sup>.

##### b. *Por descomposición térmica de ozónidos*

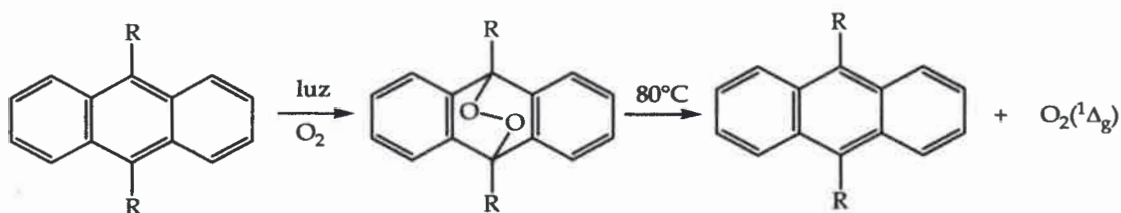
Los ozónidos son compuestos altamente energéticos a partir de los cuales es posible obtener  $O_2(^1\Delta_g)$ . Murray y Kaplan<sup>40</sup> presentaron la primera evidencia química de que aductos entre aril fosfitos y ozono, preparados a  $-70^\circ C$ , cuando son llevados a  $-35^\circ C$ , producen  $O_2(^1\Delta_g)$  de acuerdo a la siguientes reacciones:



Las desventajas que presenta este método es que, paralelamente a la producción de  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  se pueden formar productos oxidados, además de la dificultad que presenta la separación del fosfato formado.

*c. Por descomposición de endoperóxidos*

Ciertos hidrocarburos aromáticos, especialmente los poliacenos lineales, reaccionan con  $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$ , vía fotooxigenación sensibilizada, para producir endoperóxidos los cuales, por calentamiento, se disocian y regeneran el hidrocarburo de partida y  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  de acuerdo a la siguiente reacción<sup>41</sup>:

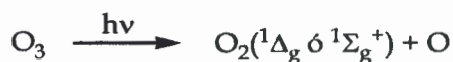


La estabilidad térmica de los endoperóxidos depende de la estructura del hidrocarburo aromático<sup>42,43,44</sup>. Ciertos endoperóxidos son relativamente estables a temperatura ambiente (1,4-dimetil naftaleno, 1,4,5-trimetil naftaleno, 9,10-dimetil antraceno). Los endoperóxidos generalmente se preparan a bajas temperaturas y luego se descomponen por calentamiento. La proporción de  $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$  para formar  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  puede alcanzar, en ciertos casos, el 100%.

I-2.1.1.2. Generación fotoquímica

*a. Por fotólisis de  $\text{O}_3$*

La fotólisis de  $\text{O}_3$  conduce a la generación de  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  y  $^1\Sigma_g^+$  en fase gaseosa a través de la siguiente reacción:



La fotólisis de  $\text{O}_3$  a 253,7 nm solamente produce  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  y un átomo de oxígeno.

b. *Por absorción directa de  $O_2 (^3\Sigma_g^-)$*

Cuando se irradia con un láser Nd-Yag soluciones de Freón a altas presiones de oxígeno es posible obtener  $O_2(^1\Delta_g)$ , como lo demostraron Mathenson<sup>45</sup> y Evans<sup>46</sup> usando la transición simultánea de  $2 O_2 (^1\Sigma_g^+) \rightarrow 2 O_2 (^1\Delta_g)$ .

c. *Por radiólisis de pulso*

Cuando un haz de electrones atraviesa un líquido hidrocarbonado, como benceno, se forma una elevada cantidad de estados excitados. Debido a que los tiempos de vida de los estados singlete y triplete de benceno son de muy corta vida (unos pocos nanosegundos), la inhibición por el oxígeno disuelto y, por lo tanto, de generación de  $O_2(^1\Delta_g)$ , es muy baja. Sin embargo, en presencia de tripletes aceptores de energía, como el naftaleno, ocurre transferencia de energía desde el triplete del benceno al triplete del naftaleno, la que puede ser inhibida por oxígeno para generar  $O_2(^1\Delta_g)$ . Esto permite observar las propiedades de  $O_2(^1\Delta_g)$  usando al técnica de radiólisis de pulso<sup>47</sup>.

d. *Por microondas*

Cuando una descarga de microondas atraviesa el oxígeno gaseoso a través de un sistema de flujo de gas, se produce oxígeno singlete ( $^1\Delta_g$ ,  $^1\Sigma_g^+$ ), átomos de oxígeno y ozono. Estas últimas dos especies oxidantes pueden ser removidas con vapor de mercurio y  $O_2(^1\Sigma_g^+)$  es inhibido, probablemente para dar  $O_2(^1\Delta_g)$ , cuando el gas emergente es burbujeado en soluciones que contienen sustratos oxidables<sup>48</sup>.

e. *Por reacción entre Cloro y  $H_2O_2$*

El  $O_2(^1\Delta_g)$  también puede generarse en un reactor químico por una reacción entre cloro gaseoso y una solución de peróxido de hidrógeno, donde cerca del 100% del oxígeno producido es  $O_2(^1\Delta_g)$ <sup>49</sup>. Con un láser químico de oxígeno-yodo eléctricamente excitado (eCOILs), el  $O_2(^1\Delta_g)$  es producido en un plasma que fluye, generalmente se trata de He/ $O_2$ , a una presión inferior a 10 Torr<sup>50</sup>.

f. *Por fotosensibilización*

Es uno de los métodos más comúnmente empleados en el laboratorio para la generación de  $O_2(^1\Delta_g)$ . Dado que fue el método seleccionado para este trabajo de Tesis, será discutido en detalle en la sección 3 de este capítulo.

### I-2.1.2. Desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$

Debido a que el  $O_2(^1\Delta_g)$  es una molécula en estado electrónico excitado resulta muy inestable respecto a su estado fundamental, consecuentemente tiende a desactivarse. Los mecanismos de desactivación de  $O_2(^1\Delta_g)$  son diversos.



Dependiendo del producto final, pueden dividirse en dos grupos: *procesos físicos y procesos químicos*. Un proceso físico supone únicamente cambios en los estados cuánticos de las moléculas, mientras que un proceso químico involucra cambios en la naturaleza química de las moléculas. Hay muchos caminos posibles para la desactivación de  $O_2(^1\Delta_g)$ ; el más favorable dependerá del tipo de molécula y de la naturaleza del estado electrónico involucrado. La **Figura I.4** representa un esquema simplificado de las posibles vías de desactivación.

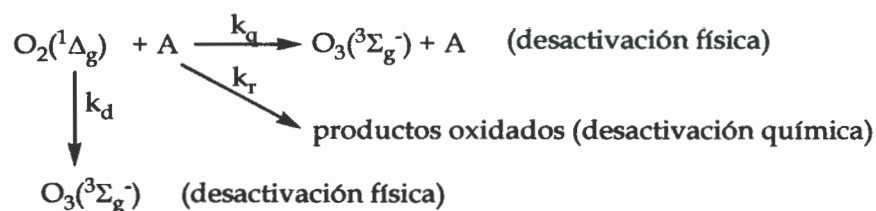


Figura I.4. Esquema de desactivación de  $O_2(^1\Delta_g)$ . A: sustrato fotooxidable (desactivador),  $k_d$ : constante de velocidad de desactivación física de  $O_2(^1\Delta_g)$  por moléculas de solvente,  $k_q$ : constante de velocidad de desactivación física de  $O_2(^1\Delta_g)$  por el sustrato A,  $k_r$ : constante de velocidad de desactivación química de  $O_2(^1\Delta_g)$  por el sustrato A.

Como se puede apreciar en la **Figura I.4**, el  $O_2(^1\Delta_g)$  puede ser desactivado por interacciones con las moléculas de solvente, con una constante de velocidad  $k_d$  y/o por colisiones con un sustrato A eventualmente presente en el medio.

Por lo tanto, el tiempo de vida ( $\tau_0$ ) del  $O_2(^1\Delta_g)$ , en ausencia de un dado sustrato, puede definirse como:

$$\tau_0 = 1/k_d$$

Mientras que, en presencia del sustrato A, el tiempo de vida  $\tau$  del  $O_2(^1\Delta_g)$  estará dado por:

$$\tau = 1/(k_d + k_t [A])$$

donde  $k_t (= k_q + k_r)$  es la constante de velocidad de desactivación total de  $O_2(^1\Delta_g)$  por el sustrato A, presente en el medio.

#### Desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$ por un sustrato

Los desactivadores más conocidos de  $O_2(^1\Delta_g)$  son los alquenos, dienos, compuestos aromáticos, aminas, fenoles, sulfuros, complejos de  $Ni^{2+}$  y  $Co^{2+}$  y algunos iones inorgánicos y heterocíclicos<sup>51,52</sup>.



a) *Desactivación física*

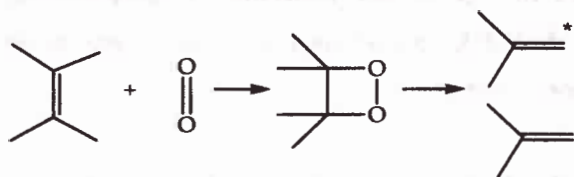
La desactivación física de  $O_2(^1\Delta_g)$  ocurre principalmente por mecanismos de transferencia de energía. Se trata de un proceso permitido por espín que ocurre cuando la energía del estado triplete de un sustrato fotooxidable es menor de 22,5 Kcal/mol (energía de excitación de  $O_2(^1\Delta_g)$ ). Este es el caso de moléculas que presentan varios dobles enlaces conjugados como polienos de cadena larga, quinonas, colorantes y complejos de metales de transición<sup>51,52,53</sup>.

b) *Desactivación reactiva*

El oxígeno singlete es una especie capaz de reaccionar químicamente con una gran variedad de moléculas orgánicas produciendo compuestos oxidados<sup>54</sup>.

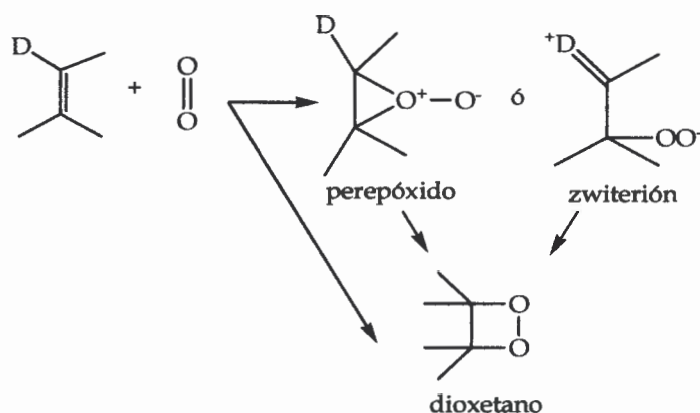
Una de las reacciones más conocida es la adición de oxígeno a dobles enlaces, la cual puede ocurrir a través de tres mecanismos diferentes:

i. Cicloaddición [2+2]: se produce un dioxetano por adición [2+2] de  $O_2(^1\Delta_g)$  a un doble enlace C=C el cual forma parte de un ciclo o posee un sustituyente donador de electrones.

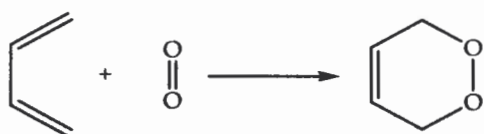


Ciertos dioxetanos son inestables a temperatura ambiente. La descomposición térmica o fotoquímica de 1,2-dioxetanos es una reacción quimioluminiscente. En efecto, se forman dos fragmentos carbonílicos: uno en el estado fundamental y otro, el cual predomina, en un estado electrónicamente excitado<sup>55</sup>.

Para la formación de dioxetanos han sido propuestos diversos mecanismos<sup>56,57</sup>. Aún no está claro si se trata de una reacción concertada o por pasos. Existen algunas evidencias<sup>58,59</sup> de que la reacción es estereoespecífica, involucrando la adición suprafacial de  $O_2(^1\Delta_g)$  al doble enlace C=C. En ciertos casos se ha postulado como intermediario un peróxido y en otros un zwitterión:

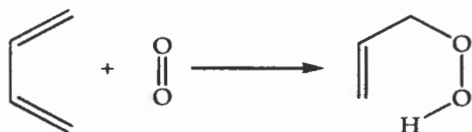


ii. Cicloadiciones [4+2]: la adición 1,4 de  $O_2(^1\Delta_g)$  a sistemas *cis* 1,3-dienos presentes en hidrocarburos acíclicos, aromáticos o heterociclos conduce a la formación de peróxidos cíclicos o endoperóxidos, los cuales pueden utilizarse como generadores de  $O_2(^1\Delta_g)$  (ver descomposición de endoperóxidos sección 2.1.1.1.c).



El mecanismo más aceptado para esta reacción es una cicloadición del tipo Diels-Alder en la que el  $O_2(^1\Delta_g)$  actúa como dienófilo. Generalmente, la reacción ocurre a través de una cicloadición concertada suprafacial-suprafacial con formación de un ciclo de seis miembros<sup>53</sup>. No obstante, en ciertos casos se han postulado intermediarios tales como un perepóxido arílico o una especie birradicalaria asimétrica<sup>60,61</sup>.

iii. Reacción "eno": la adición de  $O_2(^1\Delta_g)$  a un doble enlace C=C el cual posee, al menos, un átomo de hidrógeno arílico produce hidroperóxidos arílicos, los cuales se pueden utilizar para sintetizar otros compuestos.

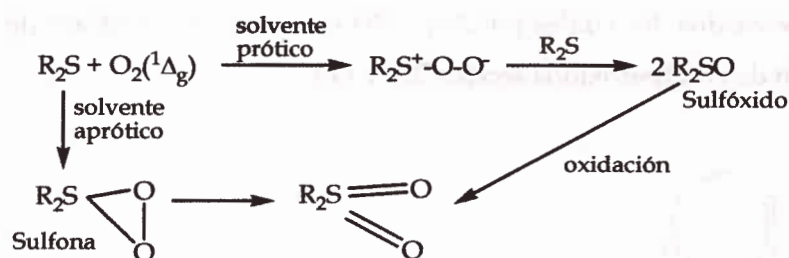


La adición de  $O_2(^1\Delta_g)$  a la olefina va acompañada de un corrimiento del doble enlace. Para esta reacción han sido postulados una serie de intermediarios: birradical,

zwitterión, perepóxido. No obstante, en base a una serie de evidencias experimentales generalmente se acepta un mecanismo del tipo concertado<sup>62</sup>.

Se trata de una reacción regio y estereoselectiva en la que el  $O_2(^1\Delta_g)$  ataca preferentemente por la parte menos impedida y el hidrógeno se abstrae por donde está el sustituyente alquilo de mayor tamaño. Si en la molécula existen varios dobles enlaces  $C=C$ , el  $O_2(^1\Delta_g)$  ataca al más sustituido (el que posee menor potencial de ionización)<sup>53,62</sup>.

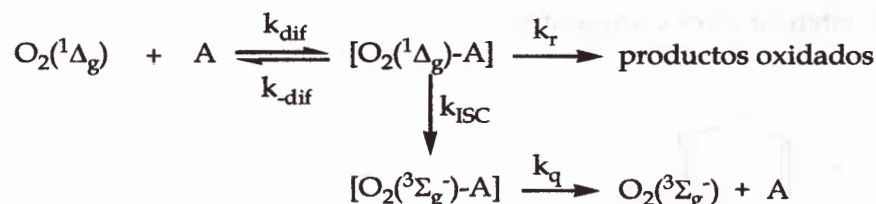
iv. Oxidación de sulfuros: otra reacción característica y de importancia biológica es la oxidación de sulfuros por  $O_2(^1\Delta_g)$  para dar sulfóxidos y sulfonas, dependiendo del medio de reacción. Un intermediario peroxídico ha sido sugerido para este mecanismo<sup>63</sup>, tal como se muestra en la siguiente reacción:



c) Desactivación a través de un complejo de encuentro

En diferentes trabajos se ha propuesto<sup>64</sup> que ciertos compuestos tales como sulfuros, aminas, alquenos, indoles, furanos, fenoles y éteres etílicos, interaccionan con  $O_2(^1\Delta_g)$  a través de un mecanismo de transferencia de carga.

Numerosas evidencias indican que esta especie reactiva puede ser desactivada a través de un mecanismo que involucra un excíplejo o complejo de encuentro con carácter parcial de transferencia de carga, actuando el  $O_2(^1\Delta_g)$  como aceptor de electrones.



Gorman *et. al.*<sup>65,66,67</sup> postulan que tal mecanismo opera generalmente para reacciones de  $O_2(^1\Delta_g)$  con sustratos orgánicos dentro de los límites  $k_r \gg k_{ISC}$  (desactivación

química) y  $k_{ISC} \gg k_r$  (desactivación física). Los hallazgos experimentales citados a favor de dicho mecanismo son característicos de reacciones similares a las de un excipiente, el cual se forma en un equilibrio rápido y reversible.

### **I-2.2. ANIÓN RADICAL SUPERÓXIDO ( $O_2^{\cdot-}$ )**

En general la reactividad de  $O_2^{\cdot-}$  es débil, aunque en los sistemas biológicos puede penetrar las membranas y causar daños a blancos específicos<sup>68</sup>. Es capaz de reaccionar con quinonas, ácido ascórbico, tocoferoles, flavinas, fenoles, hierro libre o unido a ciertas proteínas y con otros radicales (como el propio  $O_2^{\cdot-}$ , óxido nítrico y radicales fenoxi)<sup>69,70</sup>. También inhibe algunas enzimas esenciales para el metabolismo celular como deshidrogenasa de 6-fosfogluconato, aconitasa y fumarasa.

Bajo condiciones de sobreproducción y agotamiento de sus secuestradores, el  $O_2^{\cdot-}$  puede interactuar con los grupos -SH de las proteínas y enzimas cercanas e inactivarlas, agotar el glutatión e iniciar una cascada de eventos oxidativos perjudiciales para la célula<sup>71</sup>.

También interviene en procesos de fotodegradación sensibilizada de una gran variedad de sustratos entre los que se pueden mencionar fungicidas<sup>27</sup>, antibióticos<sup>29,30</sup>, herbicidas<sup>72</sup> y otros compuestos<sup>73,74</sup>.

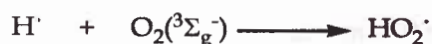
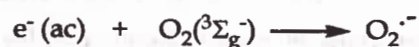
#### **I-2.2.1. Generación de $O_2^{\cdot-}$**

En los sistemas vivos, la mitocondria es la principal organela productora de esta especie radicalaria. Se estima que del 2-4% del oxígeno consumido durante el transporte de electrones de la cadena respiratoria celular no se reduce a agua por el citocromo C oxidasa, sino que deriva en la formación de  $O_2^{\cdot-}$ . Este, a su vez, puede generar otras especies reactivas de oxígeno espontánea o enzimáticamente (reacción de Haber-Weiss)<sup>75</sup>; las cuales en exceso reaccionan con toda clase de macromoléculas causando citotoxicidad y daño mutagénico.

En el laboratorio, el método que se utilice para la generación de  $O_2^{\cdot-}$  dependerá del medio en el cual se lleve a cabo el estudio, ya sea solución acuosa o medio aprótico. En solución acuosa,  $O_2^{\cdot-}$  tiene un tiempo de vida corto, mientras que en medios apróticos, el tiempo de vida del ión es mucho más largo<sup>76</sup>.

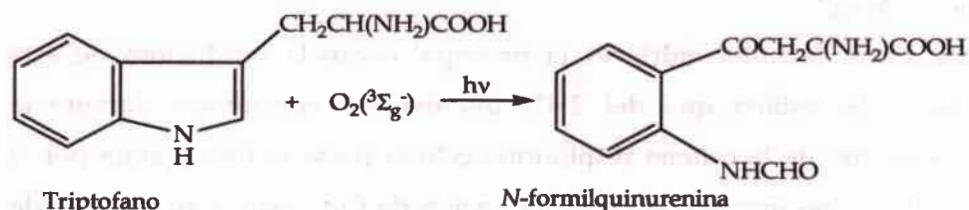
### I-2.2.1.1. Generación radiolítica y fotoquímica

La ionización de alta energía y la radiación UV han sido ampliamente usadas para generar  $O_2^{\cdot-}$  en soluciones acuosas o alcohólicas. Aunque hay una diferencia en la distribución del radical primario, para los dos métodos, las reacciones responsables de la generación de  $O_2^{\cdot-}$  son similares:

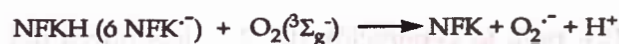
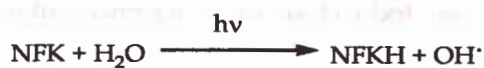


Se puede aumentar el rendimiento de generación de  $O_2^{\cdot-}$  en presencia de etanol, el cual convierte  $H^{\cdot}$  y  $HO^{\cdot}$  en  $O_2^{\cdot-}$  a pH mayor que 7.

La *N*-formilquinurenina (NFK), uno de los productos de la fotooxidación de triptófano, también conduce a la formación de  $O_2^{\cdot-}$  por aplicación de láser flash fotólisis a 265 nm, en solución acuosa saturada en aire<sup>77</sup>.



Luego:



Existen otros métodos que usan fotosensibilizadores cetónicos tales como acetona, acetofenona y benzofenona<sup>78</sup> para la generación de  $O_2^{\cdot-}$ .

El método de fotosensibilización será detallado en la sección 3 de este capítulo.

### I-2.2.1.2. Generación electroquímica

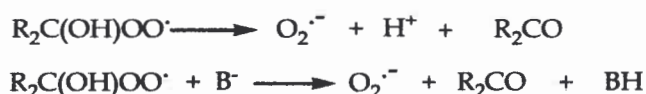
La especie  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  puede ser reducida electroquímicamente, vía transferencia de un electrón, para producir  $O_2^{\cdot-}$  en medios apróticos. Si bien dicha reducción también puede ocurrir en solución acuosa, debido a la rápida protonación de  $O_2^{\cdot-}$  (incluso a pH básico) el tiempo de vida de  $O_2^{\cdot-}$  es muy corto en este solvente<sup>79</sup>. Por lo tanto, los métodos electroquímicos son principalmente utilizados en solventes apróticos.

En principio,  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  puede ser reducido por algún donador de electrones, vía un mecanismo de esfera externa, para producir  $O_2^{\cdot-}$ . Naturalmente, la eficiencia de la reacción dependerá del potencial de reducción del donador<sup>80</sup>.

### I-2.2.1.3. Generación química

#### a. *Por descomposición de peroxiradicales libres con sustituyentes $\alpha$ -hidroxilos*

Por radiólisis de soluciones acuosas conteniendo  $O_2$ ,  $N_2O$  y alcoholes se pueden obtener radicales  $\alpha$ -hidroxi-alkilperóxido. Los alcoholes de peroxiradicales generados pueden producir  $O_2^{\cdot-}$  a través de las siguientes vías:

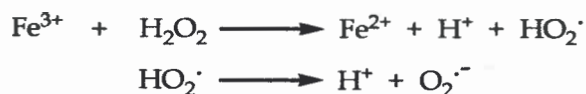


donde  $B^-$  es una base.

Alsheikhly y Simic<sup>81</sup> han demostrado que  $O_2^{\cdot-}$  también puede ser formado durante la descomposición de peroxiradicales de ácidos grasos insaturados (oleico, linoleico y ácido araquidónico).

#### b. *Por descomposición de $H_2O_2$*

Hay varios ejemplos de generación de  $O_2^{\cdot-}$  durante la descomposición de  $H_2O_2$ . La vía más simple es la generación de  $O_2^{\cdot-}$  mediante la reducción de iones metálicos por  $H_2O_2$ <sup>82</sup>. Por ejemplo:



Estos procesos, incluidos en los que se desencadenan en la reacción de Fenton, la cual será descrita más adelante (ver sección 2.3.2), generalmente ocurren en solución acuosa. Como  $O_2^{\cdot-}$  es más estable en medio aprótico que en solución acuosa, sería

esperable que la descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en solventes apróticos genere una solución más concentrada de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .

c. *Reacción de  $\text{NaO}_2$  y  $\text{KO}_2$  con alcoholes, hidroperóxidos ó trifenilmetil:*

En 1966, Le Berre y Berguer<sup>83</sup> usaron la reacción de  $\text{NaO}_2$  y  $\text{KO}_2$  con alcoholes, hidroperóxidos ó trifenilmetil en benceno, tetrahidrofurano y tolueno con el propósito de generar  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Una de las principales desventajas de este método fue la baja solubilidad de  $\text{NaO}_2$  y  $\text{KO}_2$  en solventes orgánicos y, por lo tanto, la necesidad de usarlos como suspensiones. Una gran mejora del método fue el uso de éteres los cuales forman complejos con cationes sodio y potasio<sup>84</sup>.

d. Otro método de preparación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en solventes apróticos es la síntesis de superóxido de tetraalquilamonio. En 1964, Mc Elroy y Hashman<sup>85</sup> describieron la síntesis de superóxido de tetraalquilamonio con un rendimiento del 90% para la reacción sólido-sólido de hidróxido de tetraalquilamonio pentahidratado con  $\text{KO}_2$ .

### I-2.2.2. Reactividad de $\text{O}_2^{\cdot-}$

La reactividad de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  está determinada por sus propiedades químicas tales como: basicidad, nucleofilicidad, propiedades de radical libre, propiedades redox, entre otras. Como la mayoría de las reacciones de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  son estudiadas en solución, su reactividad también se verá afectada por la solvatación y la interacción con cationes, ya sea para formar pares iónicos de contacto ó separados por solvente.

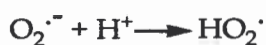
La reacción de Haber-Weiss<sup>75</sup> es quizás la reacción más conocida en la que participa el  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Esta reacción, en la cual se generan radicales  $\text{HO}^{\cdot}$ , bajo ciertas condiciones, suele ocurrir en células vivas y como consecuencia constituye una fuente de estrés oxidativo. La reacción directa es muy lenta, pero puede ser catalizada por metales como el hierro.



Otras reacciones que podemos mencionar son las siguientes:

a) Protonación:

$\text{O}_2^{\cdot-}$  puede reaccionar con un protón o con un donador de protón para formar un radical perhidroxilo ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ). Varios compuestos orgánicos (alcoholes, ácidos carboxílicos, fenoles hidrocarburos) e inorgánicos ( $\text{H}_2\text{O}$ , ácidos) pueden participar de esta reacción como donadores de protones.



b) Sustitución nucleofílica:

$\text{O}_2^{\cdot-}$  también puede reaccionar con halogenuros de alquilo, sulfonatos y fosfatos a través del siguiente tipo de reacción:



mientras que ésteres, halogenuros de acilo y anhídridos de acilo reaccionan con  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por reacciones como:



c) Transferencia de electrones:

$\text{O}_2^{\cdot-}$  puede reducir diversos compuestos orgánicos e inorgánicos (quinonas, complejos cuprosos, complejos ferrosos, dióxido de azufre, entre otros) a través de mecanismos de transferencia de electrones:



d) Adición:

En muchos casos se trata de reacciones elementales:



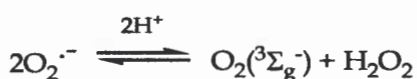
donde M es un ión metálico o un complejo metálico.

Sin embargo, existen procesos más complicados tales como:

- Reacciones de oxidación y desprotonación



- Dismutación catalítica y no catalítica





### I-2.3. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Es un líquido altamente polar ligeramente más viscoso que el agua. Es relativamente estable a temperatura ambiente, pero se descompone con facilidad en oxígeno y agua por calentamiento y por exposición a la luz. Además, numerosas sustancias actúan como catalizadores de su descomposición, entre otras: metales de transición, álcalis, y óxidos metálicos.

No es un radical libre pero, al ser un oxidante débil, puede formarlos por interacción con metales, en lo que se describirá más adelante como Reacción de Fenton.

#### I-2.3.1. Generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

En los sistemas biológicos es producido por diversas enzimas que unen oxígeno, peroxisomas, mitocondrias y retículo endoplásmico.

Como ya se mencionó en la sección 2.2.2, el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> es convertido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> espontáneamente o por vía enzimática (catalizado por la enzima superóxido dismutasa) de acuerdo a la reacción de dismutación antes mencionada (2.2.2.d).

Químicamente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> era antiguamente generado por electrolisis de una solución acuosa de ácido sulfúrico o sulfato ácido de amonio, seguida por la hidrólisis del peroxodisulfato. En la actualidad se obtiene casi exclusivamente por la autooxidación de un 2-alcohol-antraquinona en un proceso llamado "*proceso antraquinona*".

#### I-2.3.2. Principales reacciones en las que participa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

##### a. *De descomposición*

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se descompone por desproporciónación a agua y oxígeno gaseoso en una reacción espontánea como la siguiente:



Este proceso es termodinámicamente favorable. ( $\Delta H^\circ = -98,2 \text{ KJ mol}^{-1}$ ,  $\Delta S = 70,5 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ); la velocidad de descomposición depende de la temperatura, de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así como del pH y la presencia de impurezas y estabilizantes. Esta reacción es además una reacción de desproporción redox en la que el oxígeno contenido en la molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se oxida y se reduce al mismo tiempo.

Muchas sustancias catalizan esta reacción de descomposición, incluyendo en su mayoría metales de transición y sus compuestos. Catalizadores comunes resultan el dióxido de manganeso, plata y platino<sup>86</sup>. La misma reacción es catalizada por la

enzima catalasa presente en células hepáticas y cuya principal función involucra la eliminación de metabolitos tóxicos así como la disminución del estrés oxidativo.

En presencia de ciertos catalizadores como  $\text{Fe}^{+2}$  o  $\text{Ti}^{+3}$ , la descomposición conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno como hidroxilo ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) e hidroperoxilo ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ). La combinación de  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  es conocida como reacción de Fenton la cual se tratará en detalle a continuación.

b. *Reacción de Fenton y Foto-Fenton*

La reacción de descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  catalizada por hierro se denomina reacción de Fenton<sup>75,87,88</sup>.

En medio ácido el hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) es oxidado por  $\text{H}_2\text{O}_2$  a hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), un radical hidroxilo ( $\text{HO}^{\bullet}$ ) y un anión hidroxilo ( $\text{HO}^-$ ). El  $\text{Fe}^{3+}$  formado se reduce nuevamente a  $\text{Fe}^{2+}$ , un radical peróxido ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ) y un protón por reacción con el exceso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (desproporcionación). El  $\text{HO}^{\bullet}$  libre generado es un potente oxidante, aunque selectivo. A su vez,  $\text{Fe}^{3+}$  puede interactuar con  $\text{HO}_2^{\bullet}$  lo cual conduce también a la recuperación de  $\text{Fe}^{2+}$ .

La oxidación de un compuesto orgánico por la reacción de Fenton es rápida, exotérmica y generalmente conduce a la mineralización total del compuesto a dióxido de carbono y agua<sup>87</sup>.



Existe un debate en curso en la literatura química respecto a la naturaleza del  $\text{HO}^{\bullet}$  altamente reactivo formado a partir de la reacción de Fenton. El mecanismo clásico predice que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se reduce con la generación de  $\text{HO}^{\bullet}$  libre, sin embargo los  $\text{HO}^{\bullet}$  producidos pueden permanecer unidos al hierro, ya sea como  $[\text{Fe} \dots \text{HO}^{\bullet}]^{3+}$  o  $[\text{Fe}=\text{O}]^{2+}$ . Estos intermediarios pueden tener propiedades oxidantes similares pero distinguibles de los  $\text{HO}^{\bullet}$  libres<sup>89</sup>.

El empleo de la irradiación UV-V en este proceso es conocido como reacción de Foto-Fenton, en la cual el poder de oxidación se ve aumentado principalmente debido a la fotorreducción de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  siendo este último capaz de reaccionar con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  estableciéndose un ciclo, además de la generación de radicales  $\text{HO}^{\bullet}$  adicionales<sup>88</sup>.

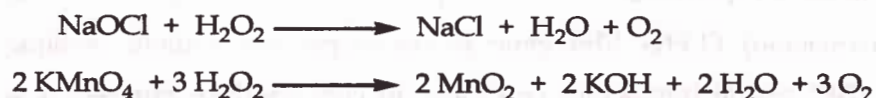


### c. De oxido-reducción

En solución acuosa  $\text{H}_2\text{O}_2$  es capaz de oxidar y reducir una gran variedad de iones inorgánicos.

En solución ácida  $\text{H}_2\text{O}_2$  actúa como agente oxidante, se pueden mencionar por ejemplo reacciones como la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  y la oxidación de sulfito ( $\text{SO}_2^{-3}$ ) a sulfato ( $\text{SO}_2^{-4}$ ).

Como ejemplo donde  $\text{H}_2\text{O}_2$  actúa como agente reductor se pueden mencionar las reacciones con hipoclorito de sodio o permanganato de potasio, las cuales resultan un método conveniente para generar oxígeno en el laboratorio:



## I-2.4. RADICAL HIDROXILO ( $\text{HO}^\bullet$ )

Es el radical libre más reactivo que existe sobre las moléculas biológicas, afecta al ADN, proteínas y lípidos. También se ha encontrado que participa en procesos de fotodegradación de compuestos como herbicidas<sup>90</sup>, fungicidas<sup>91</sup>, antibióticos<sup>92,93</sup> y otros contaminantes<sup>94</sup>.

### I-2.4.1. Generación de $\text{HO}^\bullet$

En los sistemas vivos es generado principalmente por la reacción de Haber-Weiss y Fenton descritas anteriormente.

En el laboratorio, la generación de este radical puede ser agrupada en métodos fotoquímicos y métodos que involucran la transformación de especies químicas y otras formas de energía (generación no fotoquímica), algunos ejemplos se mencionarán a continuación.

I-2.4.1.1. Generación no fotoquímica

a. *Ozonización en medio alcalino*

El O<sub>3</sub> puede participar de una reacción radicalaria favorecida en medio alcalino, la cual puede iniciarse también a partir de otras especies como HO<sup>-</sup>, HO<sub>2</sub><sup>-</sup>, HCOO<sup>-</sup>, etc. Las especies formadas tienen una gran capacidad oxidante<sup>95,96,97</sup>.



b. *Ozono/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

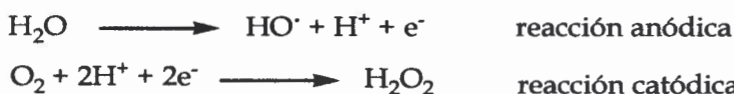
El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede iniciar la descomposición del O<sub>3</sub> por transferencia de electrones. La reacción genera HO<sup>•</sup> a través de un mecanismo en cadena que se ve favorecido en medio alcalino<sup>95</sup>. La reacción global es la siguiente:



c. *Reacción de Fenton (ver sección 2.3.2)*

d. *Oxidación electroquímica*

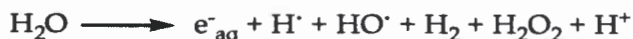
La aplicación de corriente eléctrica (2-20 A) entre dos electrodos adecuados<sup>98</sup>, produce en agua, reacciones químicas primarias con generación de HO<sup>•</sup>. La eficiencia del sistema puede mejorarse agregando Fe<sup>2+</sup> y el proceso se conoce como *electro-Fenton*.



e. *Radiólisis y procesos con haces de electrones*

Se basa en la generación de electrones altamente reactivos, iones radicales y radicales neutros utilizando partículas másicas u ondas electromagnéticas de alta energía<sup>99</sup>. Se pueden usar rayos γ (Gammacell, <sup>60</sup>Co)<sup>100</sup>, rayos X o aceleradores de haz de electrones como los de tipo Van-de-Graaf o lineales (LINAC)<sup>101</sup>.

Básicamente, cuando el haz de electrones penetra un medio acuoso, los mismos pierden energía por colisiones no elásticas con las moléculas de agua y se generan especies reactivas de acuerdo a la siguiente reacción:



De los productos que se forman, las tres primeras especies corresponden a productos primarios de la radiólisis del agua. Los  $e_{aq}^-$  y los  $H^\bullet$  son reductores fuertes, mientras que  $HO^\bullet$  actúa como oxidante.

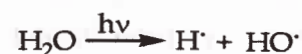
f. *Plasma no térmico*

El plasma es considerado el cuarto estado de la materia que contiene iones y electrones libres (*gas eléctrico*). Puede generarse, en forma no térmica, por una descarga eléctrica o bombardeo de un gas con un haz de electrones de alta energía. Estos plasmas son buenas fuentes de especies reactivas altamente reductoras y oxidantes, como  $O(^3P)$ ,  $HO^\bullet$ ,  $N$ ,  $H$ ,  $NH$ ,  $CH$ ,  $O_3$ ,  $O_2(^1\Delta_g)$ , los propios electrones de plasma, etc<sup>101</sup>.

#### I-2.4.1.2. Generación fotoquímica

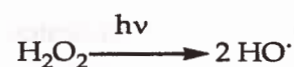
a. *Fotólisis del agua en le ultravioleta de vacío (UUV)*

La irradiación a longitudes de onda menores que 190 nm, conduce, en la mayoría de los casos a la ruptura homolítica de uniones químicas<sup>102,103</sup>. En agua se generan radicales  $OH^\bullet$  y radicales de hidrógeno ( $H^\bullet$ ) con rendimientos cuánticos dependientes de la longitud de onda de irradiación<sup>104</sup>.

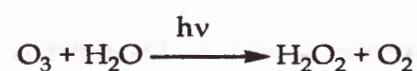


b. *UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/O<sub>3</sub> y UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub>*

El clivaje de la molécula de  $H_2O_2$  por fotones de energía superior a la unión de O-O<sup>1</sup> tiene un rendimiento cuántico casi unitario ( $\Phi_{HO^\bullet} = 0.98$  a 254 nm) y produce cuantitativamente dos  $HO^\bullet$  por cada molécula de  $H_2O_2$ .



La irradiación de  $O_3$  en agua produce  $H_2O_2$  de acuerdo a la siguiente reacción:



El  $H_2O_2$  a su vez se fotoliza dando radicales  $HO^\bullet$ . La combinación UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> también genera radicales. La reacción entre  $H_2O_2$  y  $O_3$  es lenta pero se ve favorecida en presencia de luz.

c. *FotoFenton (ver sección 2.3.2)*

d. *Ferrioxalato y otros complejos de Fe(III)*

En presencia de ciertos ligandos orgánicos tales como ácidos carboxílicos, el  $\text{Fe}^{3+}$  puede formar complejos estables o pares iónicos asociados que exhiben bandas en el espectro UV-visible, son fotoquímicamente activos y generan  $\text{Fe}^{2+}$  por irradiación. Por ejemplo, el ácido oxálico forma complejos que absorben fuertemente desde 250nm hasta 580 nm. La fotólisis del ferrioxalato tiene un alto rendimiento cuántico ( $\Phi = 1-1,2$ )<sup>105</sup>, casi independiente de la longitud de onda.

Si se agrega  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la reducción fotoquímica del complejo de  $\text{Fe}^{3+}$  se acopla a la reacción de Fenton<sup>106,107</sup>. Recientemente se ha demostrado la alta eficiencia del uso de mezclas iluminadas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y ferrioxalato para la fotodegradación de contaminantes orgánicos<sup>108</sup>.

e. *UV/Periodato*

El ácido periódico,  $\text{H}_5\text{IO}_6$ , y el periodato,  $\text{IO}_4^-$ , son oxidantes fuertes. La irradiación de soluciones de periodato con luz UV corta genera radicales ( $\text{IO}_3^\cdot$ ,  $\text{HO}^\cdot$ ,  $\text{IO}_4^\cdot$ ) y otras especies oxidantes ( $\text{IO}_3^-$ ,  $\text{O}_3$ )<sup>109</sup>.

f. *Fotocatálisis heterogénea*

Es un proceso que se basa en la absorción directa o indirecta de energía radiante (visible o UV) por un sólido (el fotocatalizador heterogéneo, que normalmente es un semiconductor de banda ancha). La excitación del semiconductor puede tener lugar de dos formas:

- (1) Por excitación directa del semiconductor, de manera que éste es el que absorbe los fotones usados en el proceso. Corresponde al caso más general y de mayor aplicabilidad en fotocatalisis heterogénea.
- (2) Por excitación inicial de moléculas adsorbidas en la superficie del catalizador (colorantes), las que a su vez son capaces de inyectar cargas (electrones) en el semiconductor.

Cuando una partícula de un semiconductor es excitada con luz suficientemente energética (caso 1) se promueve un electrón desde la banda de valencia a la banda de conducción como consecuencia de la foto-excitación, dejando así una deficiencia de electrones o un "hueco" en la banda de valencia, de esta manera se crean pares electrón-hueco cuya vida media está en el rango de los nanosegundos. En ese lapso de tiempo estos pares deben migrar a la superficie y reaccionar con especies adsorbidas. Los pares electrón-hueco que no alcanzan a separarse y a reaccionar con especies en la

superficie, se recombinan y la energía se disipa. Esta recombinación puede tener lugar tanto en la superficie como en el seno de la partícula<sup>110</sup>.

En la superficie pueden reaccionar con sustancias como el agua o iones OH<sup>-</sup> adsorbidos, generando radicales HO<sup>•</sup> y/u otros radicales<sup>111</sup>.

Existen diversos materiales con propiedades idóneas para actuar como fotocatalizadores y llevar a cabo este tipo de reacciones como por ejemplo TiO<sub>2</sub>, ZnO, CdS, óxidos de hierro, etc. La mayoría de estos materiales puede excitarse con luz de no muy alta energía ( $\lambda > 310$  nm).

Los fotocatalizadores más investigados hasta el momento son los óxidos metálicos semiconductores de banda ancha y, particularmente, el TiO<sub>2</sub>, el cual presenta una elevada estabilidad química que lo hace apto para trabajar en un amplio rango de pH, al mismo tiempo que es capaz de producir transiciones electrónicas por absorción de luz en el ultravioleta cercano.

Para mejorar la respuesta a la luz es habitual la unión de colorantes a la superficie del sólido<sup>112</sup> (caso 2). Dichos colorantes actúan como fotosensibilizadores utilizando la energía de fotones visibles para transferir un electrón a la banda de conducción del semiconductor e iniciar una serie de procesos fotoquímicos y/o fotofísicos que derivan en actividad fotocatalítica o fotovoltaica. La efectividad del proceso de fotosensibilización depende en gran medida de las características estructurales y energéticas de los colorantes utilizados. Para lograr una buena fotosensibilización los colorantes deben ser capaces de absorber luz en una amplia región del espectro visible y además tener grupos funcionales adecuados que permitan su unión a la superficie del semiconductor (generalmente grupos carboxilato y fosfonato)<sup>113</sup>.

Por otro lado la energía del orbital molecular ocupado de más alta energía (HOMO) y del orbital molecular desocupado de más baja energía (LUMO) en estos colorantes debe ser tal que permita la foto-inyección de electrones en la banda de conducción del semiconductor. Asimismo las moléculas de los colorantes sensibilizadores deben ser altamente fotoestables como para soportar varios ciclos de excitación óptica y conversión redox.

### I-3. FOTSENSIBILIZACIÓN

Se denomina fotosensibilización a todo proceso por el cual una especie química (transparente a la longitud de onda de excitación) sufre una alteración fotoquímica o fotofísica como resultado de la absorción inicial de luz por otra especie química denominada fotosensibilizador (o simplemente sensibilizador (S))<sup>114</sup>.

#### I.3.1. Mecanismos de reacciones fotosensibilizadas

En presencia de oxígeno, dos vías compiten por el sensibilizador en su estado excitado<sup>115</sup>. Actualmente se las denomina mecanismos Tipo I y Tipo II<sup>64,116,117</sup>. A continuación se muestra un esquema de ambos mecanismos.

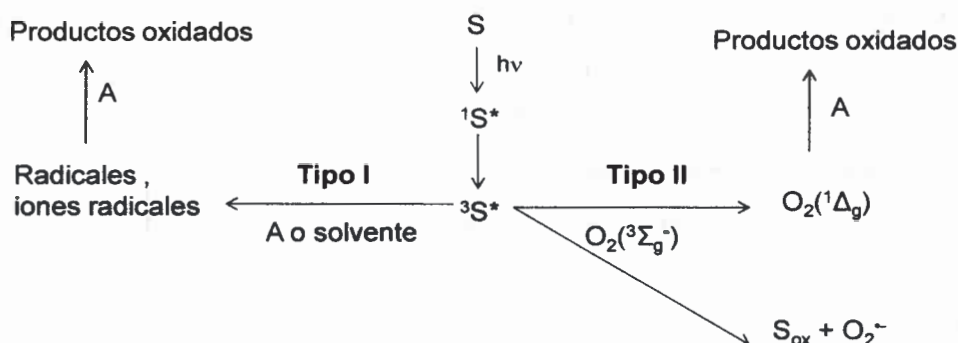


Figura I.5. Mecanismos de fotosensibilización Tipo I y Tipo II<sup>118</sup>

El primer paso corresponde a la absorción de luz por parte de sensibilizador en estado fundamental, para producir un estado singlete excitado ( $^1S^*$ ) que rápidamente se convierte, mediante cruce entre sistemas, en un estado triplete excitado ( $^3S^*$ ).

**Mecanismo Tipo I:** el estado triplete excitado del sensibilizador ( $^3S^*$ ) reacciona directamente con el solvente o el sustrato (A) donando o aceptando hidrógenos o electrones y produciendo radicales libres o iones radicales<sup>117,118,119</sup>. La reacción redox puede ir en cualquier dirección aunque generalmente el sensibilizador en estado excitado es oxidante<sup>118</sup>. El  $^3S^*$  actúa como radical libre iniciador, fotoquímicamente activado, el cual produce la especie radicalaria del sensibilizador. Esta especie puede abstraer hidrógeno de otro compuesto para iniciar una reacción en cadena o reaccionar instantáneamente con oxígeno generando especies reactivas del oxígeno (EROs)<sup>120</sup>.



Los compuestos que generalmente sufren reacciones Tipo I son ricos en electrones o poseen hidrógenos fáciles de abstraer.

**Mecanismo Tipo II:** el sensibilizador en su estado triplete excitado transfiere la energía al oxígeno molecular en su estado fundamental ( $O_2 (^3\Sigma_g^-)$ ) para generar oxígeno singlete ( $O_2 (^1\Delta_g)$ )<sup>117,118,119</sup>. Esta especie reacciona con numerosas moléculas orgánicas, particularmente moléculas con alta densidad electrónica, para dar peróxidos y otros productos oxidados.

En algunos casos puede ocurrir transferencia de electrones desde el sensibilizador al oxígeno para producir la especie oxidada del sensibilizador e ión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )<sup>116,121</sup>, bajo esta definición también se trata de un mecanismo Tipo II, aunque ocasionalmente puede ser descripta como un mecanismo Tipo I. En general los compuestos que no son fácilmente oxidados o reducidos como olefinas, dienos y compuestos aromáticos, proceden a través del mecanismo Tipo II, aunque también se ha observado este mecanismo para fenoles<sup>122,123</sup> y aminas<sup>124</sup>.

Como se puede observar en lo anteriormente explicado, el oxígeno puede reaccionar en un sistema fotoquímico por un mecanismo Tipo I ó Tipo II, aunque las constantes de velocidad Tipo II ( $k_{II}O_2 = 1 \text{ a } 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) para las reacciones de  $O_2 (^3\Sigma_g^-)$  con la mayoría de los tripletes de los fotosensibilizadores son considerablemente mayores que las constantes de velocidad para los procesos Tipo I ( $k_I O_2 < 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ).

Los mecanismos Tipo I y II pueden ocurrir uno, otro o ambos simultáneamente, dependerá del tipo de sensibilizador, sustrato, las concentraciones relativas de los mismos y de oxígeno y la naturaleza del medio. En general el mecanismo Tipo I es altamente dependiente del tipo y concentración del sensibilizador y del sustrato mientras que el mecanismo Tipo II es más dependiente de la solubilidad y la concentración de oxígeno del sistema.

### **I-3.2. Métodos para discernir entre mecanismo Tipo I y Tipo II**

El método directo para revelar la presencia de  $O_2 (^1\Delta_g)$  es a través de la detección de la emisión fosforescente a 1270 nm de esta especie y constituye el método actualmente escogido para el estudio de espectros, rendimientos y determinaciones cinéticas.

Cuando no se cuenta con la posibilidad de la observación directa de la emisión de  $O_2 (^1\Delta_g)$  y se necesita establecer el mecanismo de una dada reacción de fotooxidación, existen métodos indirectos<sup>24</sup> algunos de los cuales se mencionan a continuación:

1. Investigar el efecto de desactivantes específicos, ya sea de  $O_2 (^1\Delta_g)$  (1,4-diazabicyclo [2,2,2] octano (DABCO), azida sódica, compuestos carotenoides que posean más de nueve enlaces dobles conjugados) ó de  $O_2^{\cdot-}$  (enzima superóxido dismutasa), sobre la velocidad de fotooxidación.
2. Estudiar el efecto de  $D_2O$  comparado con el de  $H_2O$  sobre la velocidad de descomposición del sustrato. Si la concentración de sustrato es suficientemente baja como para no afectar el decaimiento de  $O_2 (^1\Delta_g)$ , la velocidad de fotooxigenación del sustrato será mayor en  $D_2O$  que en  $H_2O$ , debido a que el tiempo de vida del  $O_2 (^1\Delta_g)$  en  $D_2O$  es mayor que el tiempo de vida en  $H_2O$  <sup>125,126</sup>. Este método permite determinar si hay  $O_2 (^1\Delta_g)$  presente, no obstante, no se descarta la posibilidad de que el ión  $O_2^{\cdot-}$  esté en el medio, debido a que tal especie también tiene un tiempo de vida mayor en  $D_2O$ .
3. Investigar la competencia entre el sustrato y el oxígeno por el triplete del sensibilizador. Si el sustrato reacciona con el estado triplete del sensibilizador, la presencia de oxígeno singlete predomina y el sustrato interacciona esencialmente con dicha especie, independizándose de la concentración de oxígeno. Tal discriminación se puede llevar a cabo trabajando en idénticas condiciones (sensibilizador, luz, concentración de sustrato) en solución aireada y en solución saturada en nitrógeno o argón y comparando las velocidades de reacción en ambos casos.
4. La técnica de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) también puede resultar un método alternativo ya que se aplica a cualquier sistema molecular que involucre electrones no apareados, por lo que es altamente sensible para detectar radicales libres. La reacción entre  $O_2(^1\Delta_g)$  y el atrapador específico de electrones 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona (TEMP) conduce a la formación de un radical libre 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidoma-N-oxil (TEMPO) cuyo espectro de EPR es característico<sup>127</sup>. Si bien otras especies reactivas de oxígeno pueden reaccionar con TEMP, no se produce TEMPO, con lo cual este método es altamente específico para  $O_2(^1\Delta_g)$ <sup>128</sup>.

El uso de distintos atrapadores de electrones puede ser utilizado para diferenciar especies reactivas de oxígeno por EPR.

### **I-3.3. Características de los sensibilizadores**

Los sensibilizadores más comúnmente usados en las reacciones fotosensibilizadas son colorantes tales como rosa de bengala, azul de metileno, rodaminas, pigmentos como flavinas y clorofilas, hidrocarburos aromáticos y coenzimas entre otros. También se

utilizan, aunque en menor medida, compuestos de coordinación basados en complejos de rutenio y derivados metálicos de porfirinas y ftalocianinas.

La elección del fotosensibilizador depende de las características del sustrato en estudio y del medio de reacción. Los requisitos para el sensibilizador ideal se enumeran a continuación<sup>64,129</sup>:

**Estabilidad fotoquímica:** es deseable que el sensibilizador sea fotoestable a lo largo de la reacción fotosensibilizada, aunque alguna pérdida generalmente es inevitable, sobre todo si se llevan a cabo irradiaciones prolongadas. Para cada caso es necesario elegir un sensibilizador que sea estable en las condiciones del diseño del experimento o, para un dado sensibilizador procurar un diseño que evite su descomposición.

Por otro lado si se desea investigar la cinética de fotooxidación de un dado sustrato vía  $O_2 (^1\Delta_g)$ , se necesitará un sensibilizador que en su estado fundamental y excitado no reaccione ni con el solvente ni con el sustrato fotooxidable.

**Solubilidad:** el sensibilizador debe ser soluble en el medio de reacción. En el caso de solventes orgánicos no resulta difícil conseguir sensibilizadores adecuados, pero en medio acuoso la situación se complica.

**Características de absorción:** Generalmente se pretende que el sensibilizador absorba en la región visible del espectro electromagnético, los más efectivos son aquellos que absorben en el intervalo de 380 a 900 nm. Idealmente la banda de absorción del sensibilizador en la región visible no se debe superponer con las del sustrato fotooxidable, es decir, la banda de absorción del sensibilizador se debe encontrar al rojo respecto a la del sustrato. Además debe presentar altos coeficientes de extinción molar de modo que se logren altas absorbancias a bajas concentraciones para evitar formación de dímeros y de complejos en el estado fundamental con el sustrato.

En el caso en el que el espectro de emisión de la fuente de irradiación se solape parcialmente con el espectro de absorción del sensibilizador y/o del sustrato fotooxidable, será necesario utilizar una fuente de luz lo mas monocromática posible y ajustar concentraciones de tal modo que la absorción del sensibilizador exceda a la del sustrato en el intervalo de emisión de la fuente de luz.

Cruce entre sistemas desde el estado singlete excitado: para que la generación de  $O_2(^1\Delta_g)$  se produzca por transferencia de energía desde el estado triplete excitado de un sensibilizador, es necesario que este último posea un rendimiento cuántico de cruce entre sistemas cercano a la unidad de esta manera, el estado triplete excitado es poblado eficientemente.

Velocidad de transferencia de energía: como las constantes de velocidad de transferencia de energía dependen de la diferencia de energía entre el estado triplete excitado del sensibilizador y el oxígeno singlete, el sensibilizador debe tener una energía de estado triplete mayor que la de  $O_2(^1\Delta_g)$  (22,5 Kcal/mol). Por otra parte, el tiempo de vida del estado triplete excitado del sensibilizador debe ser lo suficientemente largo como para permitir que la interacción entre dicha especie y el oxígeno fundamental ocurra eficientemente. El estado singlete excitado de la mayoría de las moléculas orgánicas es relativamente de corta vida mientras que el estado triplete tiene una vida más larga por lo que este último estado es el involucrado en la acción de sensibilizador<sup>17</sup>.

#### **I-3.4. Cinética de las fotooxidaciones sensibilizadas**

El mecanismo propuesto en la Figura I.6 resume los principales procesos fotoquímicos que pueden ocurrir cuando una solución que contiene un fotosensibilizador (S) y un sustrato fotooxidable (A) es irradiada con luz visible en presencia de oxígeno disuelto. Inicialmente se genera el estado singlete excitado del sensibilizador,  $^1S^*$  (reacción 1) el cual puede decaer al estado fundamental S (reacción 2), ser inactivado por A (reacción 3), o producir un estado triplete excitado  $^3S^*$  (reacción 4).

El  $^3S^*$  puede decaer al estado fundamental S (reacción 5), puede generar productos (reacción 6) o puede ser inactivado por  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  generando  $O_2^{\cdot-}$  por transferencia de electrón (reacción 7) u  $O_2(^1\Delta_g)$  por transferencia de energía (reacción 8). El  $^3S^*$  también puede aceptar un electrón de A formando la especie semireducida del sensibilizador,  $S^{\cdot-}$ , y el catión radical del sustrato,  $A^{\cdot+}$  (reacción 9).

Por otro lado,  $O_2(^1\Delta_g)$  puede ser inactivado físicamente por el solvente (reacción 10), por el sustrato (reacción 11) o bien puede reaccionar con A (reacción 12) o con S (reacción 13). La reacción 12 es la vía de desaparición de A más común en procesos mediados por  $O_2(^1\Delta_g)$ .

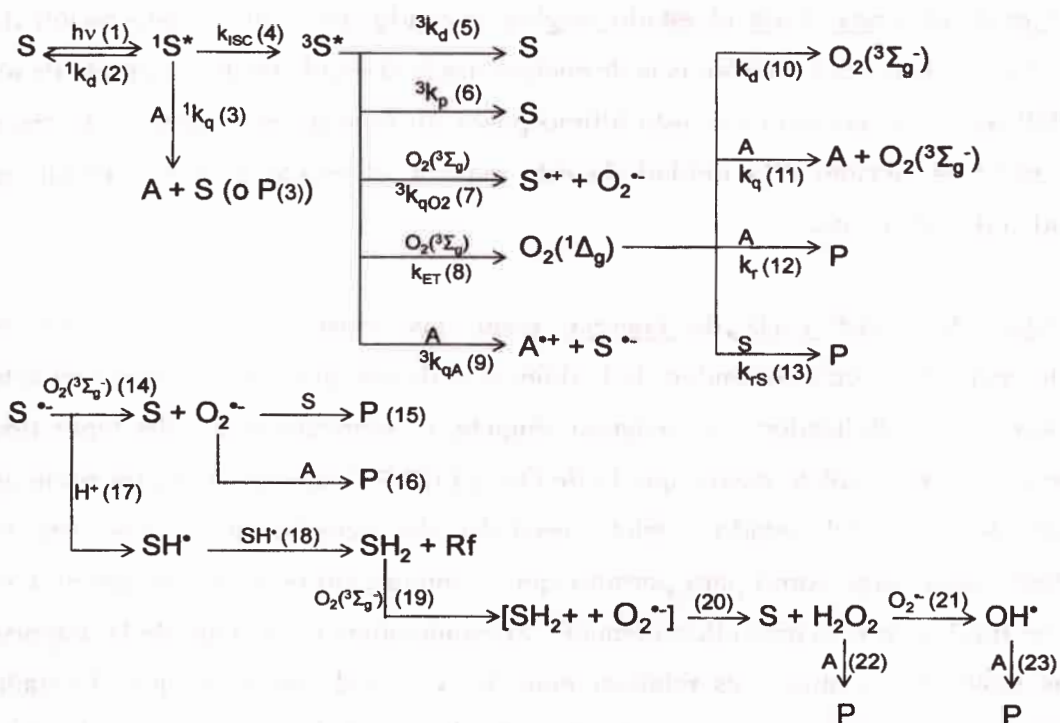


Figura I.6. Mecanismo propuesto para fotooxidaciones sensibilizadas.(k: constantes de velocidad de:  $^1k_d$ : desactivación natural de  $^1S^*$ ;  $^1k_q$ : desactivación de  $^1S^*$  por A;  $k_{ISC}$ : entrecruzamiento de sistemas;  $^3k_d$ : desactivación natural de  $^3S^*$ ;  $^3k_p$ : formación de productos,  $^3k_{qO_2}$ : desactivación de  $^3S^*$  por  $O_2(^3\Sigma_g^-)$ ;  $k_{ET}$ : transferencia de energía;  $^3k_{qA}$ : desactivación de  $^3S^*$  por A;  $k_d$ : desactivación natural de  $O_2(^1\Delta_g)$ ;  $k_q$  desactivación física de  $O_2(^1\Delta_g)$  por A;  $k_r$  desactivación química de  $O_2(^1\Delta_g)$  por A;  $k_{rS}$  desactivación química de  $O_2(^1\Delta_g)$  por S).

En paralelo,  $S^{\bullet-}$  puede generar  $O_2^{\bullet-}$  por transferencia de electrón al oxígeno (reacción 14) y el  $O_2^{\bullet-}$  generado puede reaccionar químicamente con S (reacción 15) o con A (reacción 16).

En presencia de un sustrato donador de hidrógenos puede generarse el radical neutro de S,  $SH^{\bullet}$  (reacción 17). El decaimiento bimolecular de  $SH^{\bullet}$  ocurre por desproporcionación y conduce a la formación de S y la especie totalmente reducida,  $SH_2$  (1 reacción 18). Esta última, en presencia de  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  puede ser reoxidada, previa formación de un complejo (reacción 19), dando S y  $H_2O_2$  (reacción 20) el cual puede reaccionar con  $O_2^{\bullet-}$  y producir  $OH^{\bullet}$  (reacción 21). A su vez,  $H_2O_2$  y  $OH^{\bullet}$  pueden interaccionar con A para dar productos, P (reacciones 22 y 23 respectivamente).

En este trabajo de Tesis se escogieron tres sensibilizadores para los estudios de fotooxidación, los colorantes sintéticos Rosa de Bengala (RB) y Perinaftenona o

Fenalenona (PN) los cuales resultan generadores de la especie  $O_2(^1\Delta_g)^{130,131}$ ; y el pigmento natural Riboflavina (Rf) el cual es capaz de fotosensibilizar procesos de oxidación de una gran variedad de sustratos vía radicales libres (Mecanismo Tipo I) o mediados por  $O_2(^1\Delta_g)$  (Mecanismo tipo II)<sup>132</sup>.

Los resultados que se mostrarán en la presente Tesis serán discutidos en base al esquema cinético presentado en la **Figura I.6**.

#### **I- 4. ANTIBIÓTICOS**

Se define a un antibiótico como aquella sustancia química producida por un ser vivo o derivado sintético de ella, que mata o impide el crecimiento de microorganismos sensibles. Idealmente los antibióticos presentan toxicidad selectiva, es decir que resultan nocivos para el microorganismo e inoocuos para el huésped. Lo frecuente es que el término sea relativo, una droga que en una concentración tolerable para el huésped, sea capaz de dañar al microorganismo.

El término antibiótico fue utilizado por primera vez en 1942 por Selman Waksman para describir aquellas formulaciones antagonistas al crecimiento de microorganismos derivadas de otros organismos vivos. En la actualidad la definición incluye también a los antimicrobianos sintéticos o quimioterapéuticos antimicrobianos como las quinolonas, sulfamidas y otros derivados de productos naturales como así también aquellos con propiedades antibióticas descubiertas empíricamente<sup>133</sup>.

De acuerdo a su mecanismo de acción principal los antibióticos se dividen en cuatro grandes grupos<sup>134</sup>: (I) aquellos que actúan sobre la pared celular bloqueando la síntesis, exportación, organización o formación de la misma, sin interferir con los componentes intracelulares; (II) los que pueden lesionar directa o indirectamente la integridad de la membrana celular, (III) los que tiene acción sobre la síntesis del ADN y ARN , y (IV) los que poseen acción sobre los ribosomas y por lo tanto la síntesis proteica, aproximadamente la mitad de los antibióticos poseen este último mecanismo acción<sup>135,136</sup>.

##### **I-4.1. Antibióticos $\beta$ lactámicos**

La presencia de un anillo  $\beta$  lactámico en la estructura química define a esta familia de antibióticos, la cual incluye grupos tales como penicilinas, cefalosporinas,

carbapenemas, monobactamas e inhibidores de  $\beta$  lactamasas. Su uso se inició con la administración de penicilina hace 70 años y actualmente constituyen el grupo de antimicrobianos mas prescritos tanto en la atención primaria como en los hospitales<sup>137</sup>. Ciertos antibióticos representativos de esta familia fueron seleccionados para este trabajo de Tesis.

#### I-4.1.1. Mecanismo de acción de antibióticos $\beta$ lactámicos

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos poseen acción bactericida dado que producen la muerte de microorganismos sensibles en fase logarítmica de crecimiento<sup>138</sup>.

Este tipo de antibióticos inhibe el último estadio en la síntesis de la pared celular bacteriana, fase en la cual ocurre transpeptidación y unión del peptidoglicano naciente a la matriz de la pared celular preexistente por ligaduras cruzadas<sup>138,139</sup>. Las enzimas que catalizan esta etapa, llamadas transpeptidasas, son capaces de unirse covalentemente a penicilinas y otros antibióticos con anillo  $\beta$ -lactámico. Dichas enzimas, también denominadas *proteínas que unen penicilina (PBPs, penicillin binding proteins)*, al unirse fuertemente a la molécula de antibiótico se inactivan de forma irreversible, por lo que ya no pueden catalizar la reacción de transpeptidación, en consecuencia la pared celular en crecimiento se sigue formando pero sin entrecruzamientos por lo que se debilita progresivamente.

Las diferencias de presión osmótica entre el interior de la célula y el exterior produce la lisis bacteriana al carecer de la estructura que la protege de los cambios osmóticos del medio externo.

Además el complejo antibiótico-PBPs estimula la liberación de autolisinas bacterianas endógenas, enzimas que digieren la pared celular preexistente<sup>137,140</sup>. A estos efectos se suma el hecho de que la débil pared celular permite el ingreso de otros agentes antimicrobianos que inicialmente no pueden atravesarla.

Antes de que los antibióticos  $\beta$ -lactámicos puedan inhibir el crecimiento microbiano por el mecanismo descrito, deben ser capaces de alcanzar el o los sitios "blancos" susceptibles en la membrana<sup>138</sup>. En las bacterias Gram positivas, la pared celular no constituye una barrera importante para el ingreso de estas drogas por lo que la mayoría resultan sensibles a este tipo de antimicrobianos. Sin embargo, las bacterias Gram negativas, aunque poseen una pared de peptidoglicano mucho más delgada que Gram positivas, tienen una membrana externa compleja de lipopolisacáridos que

retarda la entrada de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, en consecuencia la mayor parte de los microorganismos Gram negativos son resistentes a estas drogas, aunque las modificaciones químicas sobre la estructura básica de la molécula de antibiótico se han destinado principalmente a aumentar la acción sobre este grupo de bacterias.

Cabe aclarar que esta clase de antibióticos no resultan activos frente a micoplasma, dado que carecen de pared celular, y tampoco frente a bacterias intracelulares<sup>137</sup>.

#### I-4.1.2. Resistencia antimicrobiana a antibióticos $\beta$ lactámicos

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los  $\beta$  lactámicos, así como también a otras clases de antibióticos, por varios mecanismos que en ocasiones pueden presentarse de forma asociada<sup>141</sup>:

1. Alteraciones en la permeabilidad: La presencia de membrana externa en los bacilos Gram negativos dificulta el ingreso de sustancias hidrofílicas, como los  $\beta$  lactámicos, que necesitan utilizar los poros proteicos (porinas) para tal fin. La resistencia es secundaria, es decir, se genera por alteraciones en dichas porinas.
2. Modificación de los sitios "blanco": Esta clase de antibióticos debe unirse a las PBP's para ejercer su efecto bactericida. Cambios a nivel de las mismas, por ejemplo como consecuencia de mutaciones espontáneas en los genes que las codifican, implican una pérdida de afinidad de lo  $\beta$  lactámicos por ellas, con la consiguiente disminución de su actividad. Este mecanismo afecta fundamentalmente a cocos Gram positivos<sup>142,143</sup>.
3. Expresión de bombas de eliminación activa: Los mecanismos de expulsión consisten en bombas de flujo, dependientes de energía, que bombean el antimicrobiano al exterior. Este mecanismo se ha demostrado en ciertos bacilos Gram negativos, especialmente en *P. aeruginosa*.
4. Producción de enzimas: Actualmente constituye el principal mecanismo de resistencia a los  $\beta$  lactámicos, sobre todo en las bacterias Gram negativas. Las  $\beta$  lactamasas son enzimas catalíticas de naturaleza proteica que actúan por modificación del anillo  $\beta$ -lactámico de penicilinas y cefalosporinas dando lugar a la formación de compuestos inactivos. Específicamente producen la ruptura del enlace amídico del anillo  $\beta$  lactámico, previa unión al grupo carboxilo, con lo que éste pierde la capacidad de unirse a las PBP's. El grado de resistencia que determinan se correlaciona con su concentración, afinidad por los diferentes  $\beta$  lactámicos y propiedades hidrolíticas.



#### I-4.1.3. Resistencia a $\beta$ lactámicos por enzimas $\beta$ lactamasas

Como ya se mencionó anteriormente la producción de  $\beta$  lactamasas es el principal mecanismo de resistencia a antibióticos como las penicilinas y cefalosporinas, presente en una amplia variedad de bacterias.

Las  $\beta$  lactamasas pertenecen a una familia muy diversa de enzimas capaces de hidrolizar antibióticos que poseen anillo  $\beta$  lactámico en su estructura química. En base a la especificidad del sustrato, parámetros cinéticos y secuencia de nucleótidos en sus genes, pueden dividirse en cuatro clases de la A a la D, de acuerdo a la distribución en las diferentes especies de bacterias, la producción en cada especie y la prevalencia de la especie como patógeno en infecciones clínicas, las  $\beta$  lactamasas de clase A son las más importantes<sup>144</sup>.

Las enzimas  $\beta$ -lactamasas se encuentran tanto en microorganismos Gram positivos como Gram negativos y son responsables de muchas cepas altamente resistentes<sup>138</sup>.

La producción de  $\beta$ -lactamasas en Gram positivos está mediada por genes cromosómicos y plasmídicos y estos genes generalmente son inducidos por el mismo antibiótico. En este grupo de microorganismos las  $\beta$ -lactamasas son enzimas extracelulares, con alta afinidad por sus sustratos y se elaboran en grandes cantidades. *S. aureus* constituye un ejemplo de bacteria productora de esta enzima, dicha producción esta mediada sobre todo por un gen plasmídico que puede transferirse con facilidad y rapidez a otras especies y géneros de bacterias susceptibles<sup>145</sup>. Algunas cepas de esta especie poseen además una resistencia intrínseca debida a la presencia de una PBP adicional (PBP2a) y tolerancia a  $\beta$ -lactámicos por falla de autolisinas<sup>138</sup>.

Las  $\beta$ -lactamasas de Gram negativos son constitutivas, mediadas por plásmidos o cromosomas, se producen en pocas cantidades y tiene baja afinidad por sus sustratos. En contraste con las de Gram positivos, estas  $\beta$ -lactamasas se localizan en el espacio periplásmico, por lo que restringen el acceso del antibiótico a los sitios blanco de la membrana solo después de que este ha penetrado la pared celular.

Una estrategia bastante eficaz para combatir la resistencia mediada por  $\beta$ -lactamasas es la co-administración del antibiótico  $\beta$  lactámico junto a un inhibidor de dicha enzima<sup>146,147,148</sup>.

El ácido clavulánico constituye un claro ejemplo de acción inhibitoria a  $\beta$ -lactamasas, su estructura química es similar al ácido penicilánico de penicilinas, de manera que posee alta afinidad por estas enzimas uniéndolas irreversiblemente<sup>149</sup>. En otras palabras, el ácido clavulánico resulta un inhibidor no competitivo de  $\beta$  lactamasas sin

actividad antimicrobiana propia<sup>150</sup>. La combinación de amoxicilina / ácido clavulánico ha estado en uso durante más de 20 años y continúa siendo ampliamente utilizada, debido a su elevada acción terapéutica. Otro claro ejemplo es el sulbactam que también es un inhibidor de  $\beta$  lactamasas, su mecanismo de acción es idéntico al mencionado para el ácido clavulánico y suele co-administrarse junto a ampicilina.

#### I-4.1.4. Control genético de la resistencia

Tanto las bacterias Gram negativas como las Gram positivas son capaces de adquirir y/o transferir la resistencia a uno o más antibióticos a través de eventos que ocurren a nivel genético, tales como *mutación y selección*, en los cuales el medicamento actúa como un selector suprimiendo bacterias sensibles y permitiendo el desarrollo de mutantes resistentes a las drogas, e *intercambio de material genético* que codifique para dicha propiedad. El último evento mencionado puede ocurrir por uno o varios mecanismos como los que se mencionan a continuación<sup>136</sup>:

1. *Transducción*: ocurre a través de virus que infectan bacterias (bacteriófagos), los cuales pueden transferir material genético de una célula bacteriana a otra. Constituye un mecanismo común en bacterias Gram positivas. El ADN plasmídico es encerrado en un virus bacteriano y transferido por ese virus a otra bacteria de la misma especie; por ejemplo el plásmido que porta el gen para la producción de  $\beta$  lactamasas puede transferirse de un estafilococo resistente a la penicilina a uno sensible, si es transmitido por un bacteriófago adecuado.
2. *Transformación*: el ADN desnudo pasa de una célula de una especie a otra alterando, por lo tanto, su genotipo. Esto puede ocurrir a través de manipulación genética en el laboratorio.
3. *Conjugación*: cuando se produce una transferencia unilateral de material entre bacterias, no sólo del mismo género, estamos en presencia de una conjugación. Esta transferencia es mediada por un factor de fertilidad (F) que no es más que el producto de la extensión de los pelos sexuales de una célula donora a una receptora. El plásmido que porta el gen de resistencia a un dado fármaco es transferido a través de estos túbulos de proteína de una bacteria resistente a una sensible. Este método resulta el más común entre diferentes géneros de bacterias Gram negativas.

4. *Transposición*: entre un plásmido y otro puede ocurrir la transferencia de secuencias cortas de ADN; llamados transposones. Puede suceder, además, entre un plásmido y una porción del cromosoma bacteriano dentro de alguna bacteria.

Cuando la resistencia a un dado antibiótico ocurre por un evento de mutación cromosómica o de selección, la transmisión de dicha característica se denomina "vertical", dado que se transfiere de una generación de bacterias a la siguiente. Por otro lado, si la transmisión de la resistencia se dá por intercambio de material genético por algunos de los mecanismos mencionados anteriormente, se denomina "horizontal" dado que puede ocurrir entre bacterias de la misma especie y/o de especies y géneros diferentes<sup>151</sup>.

El mal uso y el abuso de los antibióticos, ya sea en el hogar, hospitales, comunidades, con los animales, en la agricultura, etc, pueden adicionar a las fuerzas del ambiente, a seleccionar y mantener cepas de bacterias resistentes. Los antibióticos, considerados aún como los mejores agentes para el tratamiento de las infecciones, son los únicos y más importantes agentes que seleccionan, y son causa de la propagación de las bacterias resistentes. Las dos caras del efecto de estas valiosas drogas hace que sea crucial su uso cuidadoso.

#### **I-4.2. Características Generales de Penicilinas y Cefalosporinas**

##### **I-4.2.1. Penicilinas**

Constituyen el grupo de antibióticos mayormente empleados. Son producidos por especies de hongos del género *Penicillium* especialmente *Penicillium chrisogenumthum*. La estructura básica de la molécula contiene un núcleo llamado ácido penicilánico el cual consiste en un anillo pentagonal de tiazolidina unido a un anillo  $\beta$ -lactámico tetragonal para dar lugar al doble anillo característico. Al núcleo se le adosa una cadena lateral mediante un enlace peptídico en la posición 6 del anillo  $\beta$  lactámico y que varía de una penicilina a otra definiendo sus propiedades antibacterianas y farmacológicas<sup>152</sup>.

Las penicilinas se pueden clasificar de acuerdo a sus propiedades en penicilinas naturales (tales como penicilina G y V) y semisintéticas. Las penicilinas semisintéticas son aquellas obtenidas a partir del ácido 6 amino penicilánico unido químicamente a una cadena lateral que le confiere ciertas ventajas como por ejemplo ampliar su espectro de acción o proteger el núcleo penicilánico de la acción de  $\beta$  lactamasas.

#### I-4.2.2. Cefalosporinas

Las cefalosporinas son fármacos estructuralmente similares a las penicilinas, producidos por hongos del género *Cephalosporium* especialmente de la especie *salmosynnematum* y *acremonium*. El núcleo de las cefalosporinas es el ácido cefalosporámico semejante al ácido penicilánico con la diferencia de que en este caso el anillo  $\beta$ -lactámico se encuentra fusionado a un anillo hexagonal de dihidrotiazina a diferencia del anillo pentagonal de tiazolidina de las penicilinas<sup>152</sup>. Al igual que las penicilinas, las cefalosporinas también se distinguen por sus cadenas laterales y pueden clasificarse en naturales y semisintéticas.

En la medicina, las cefalosporinas naturales (como las cefalosporinas N, P y C) no son utilizadas por no tener una acción antibacteriana potente. Las cefalosporinas de uso corriente son semisintéticas obtenidas a partir del ácido 7 amino cefalosporámico, las cuales resultan activas contra la mayoría de los microorganismos susceptibles a penicilinas, constituyendo una alternativa útil en pacientes alérgicos a esta droga<sup>140</sup>.

En función del momento de su descubrimiento y su actividad antimicrobiana se las ha clasificado en cuatro generaciones. A medida que aumenta el número de generación de cefalosporinas, aumenta su espectro de acción y su resistencia a  $\beta$ -lactamasas<sup>153,154</sup>.

#### I-4.3. Características de los Antibióticos seleccionados

Amoxicilina: es una penicilina semisintética que pertenece al grupo de las *penicilinas de amplio espectro*<sup>152</sup>. El grupo fenol y amino en la cadena lateral permiten un aumento de actividad sobre bacterias Gram negativas, específicamente el grupo amino favorece la penetración del antibiótico a través de la membrana externa de lipopolisacáridos que poseen este grupo de microorganismos, además esta modificación permite que sea estable en presencia de los ácidos gástricos y por lo tanto apropiadas para ser administradas por vía oral en los tratamientos, favoreciendo su absorción. A pesar de su amplio espectro y su buena absorción por vía oral, resulta sensible a las  $\beta$ -lactamasas por lo que no es una droga de elección para eliminar microorganismos productores de dicha enzima. En cuanto a su eliminación del organismo, el 75% aproximadamente de la dosis de Amoxicilina administrada se excreta por la orina sin sufrir cambios.

Cefalexina: es una cefalosporina de primera generación<sup>155</sup> que posee acción sobre la mayoría de los cocos Gram positivos y contra ciertos cocos y bacilos Gram negativos de importancia clínica. Resulta sensible a  $\beta$  lactamasas al igual que Amoxicilina y puede ser administrada por vía oral, debido a que se ha separado el radical acetoxilo de la estructura química original y posee en su cadena lateral un anillo aromático lo cual le confiere mayor estabilidad. Más del 90% del fármaco se excreta inalterado en orina.

Ceftriaxona: pertenece al grupo de las cefalosporinas de tercera generación<sup>155</sup> derivado del ácido cefalosporámico, con un residuo metoximínico que le confiere resistencia a los organismos productores de  $\beta$ -lactamasas<sup>156,157</sup>. Presenta un espectro de acción muy amplio, tanto para microorganismos Gram positivos y Gram negativos aerobios, además presenta una buena actividad frente a microorganismos anaerobios. Aproximadamente el 35-65% de Ceftriaxona se elimina por orina, el resto se elimina por la vía fecal. Una pequeña cantidad es metabolizada en los intestinos ocasionando un metabolito inactivo antes de ser eliminada.

Ampicilina: es un  $\beta$  lactámico de amplio espectro, derivado semisintético de la penicilina y usado ampliamente en medicina. Aunque es más activa que las penicilinas, resulta un antibiótico sensible a la acción de  $\beta$  lactamasas producidas por gran número de bacterias y por esta razón solo debe ser co-administrada con un inhibidor de dicha enzima como lo es el Sulbactam.

En cuanto a su eliminación del organismo, aproximadamente el 10% de la dosis de ampicilina es metabolizada a productos inactivos que son eliminados sobre todo en la orina, conjuntamente con el antibiótico sin metabolizar<sup>158</sup>.

Ampicilina está relacionada estructuralmente con Amoxicilina, ambos antibióticos son aminopenicilinas, la única diferencia química entre ellos es la presencia del grupo fenol en este último.

Cefadroxil: Es un para-hidroxi derivado de la Cefalexina que se encuentra dentro de las cefalosporinas de primera generación y es activo frente a una gran variedad de Gram positivos y Gram negativos<sup>153,159</sup>.

Más del 90% de esta droga es excretada del organismo por orina sin sufrir modificaciones.

**Cefotaxima:** pertenece al grupo de las cefalosporinas de tercera generación<sup>158</sup>. Al igual que Ceftriaxona, la presencia del grupo metoximínico en la estructura química de este compuesto le confiere estabilidad frente a  $\beta$  lactamasas lo cual amplía su espectro de acción sobre un gran número de bacterias Gram positivas y Gram negativas. En la mayoría de los casos es considerada equivalente a Ceftriaxona en términos de susceptibilidad y eficacia, además de sus similitudes químicas.

#### **I-4.4. Espectro de acción de los antibióticos seleccionados**

Amoxicilina resulta activa frente a microorganismos  $\beta$ - lactamasas negativos como *H. influenzae*, *H. pylori*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *S. aureus*, entre otros. Este antibiótico cuando es co-administrado con ácido clavulánico aumenta su espectro de actividad sobre los microorganismos productores de  $\beta$ -lactamasas ya, que esta sustancia resulta un potente protector del anillo  $\beta$ -lactámico<sup>160</sup>.

Cefalexina tiene actividad sobre microorganismos como *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, no productores de  $\beta$ - lactamasas y ciertas enterobacterias, constituyendo una alternativa muy importante en el tratamiento de infecciones producidas por *S. aureus*.

Ceftriaxona resulta excelente contra microorganismos como *S. pneumoniae*, *S. betahaemolyticus*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter*, *Serratia sp*, *Pseudomonas sp*, *H. influenzae*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *H. parainfluenzae*, *S. viridans*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y *Clostridium sp.*, por mencionar algunos<sup>161</sup>.

El espectro de acción Ampicilina abarca microorganismo sensibles como *L. monocytogenes*, *N. meningitidis*, *H. influenzae* no productoras de  $\beta$ -lactamasa, *G. vaginalis*, *B. pertussis*, y algunos bacilos entéricos como *E. coli*, *P. mirabilis*, *Salmonella*, y *Shigella* <sup>152,162</sup>.

Entre los microorganismos sensibles a Cefadroxil se encuentran Estreptococos  $\beta$ -hemolíticos, Estafilococos coagulasa-positivos, coagulasa-negativos y cepas productoras de  $\beta$  lactamasas, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, especies de *Klebsiella*, *H. influenzae*, *Salmonella* y *Shigella*<sup>152,158,162</sup>.

Cefotaxima es activo frente a cepas de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Clostridium*, *Haemophylus*, *B. pertussi*, *Moraxella*, *Pasteurella*, *Leptospira*, entre otros<sup>162</sup>.

En función de su espectro de acción estos antibióticos se utilizan para tratar infecciones humanas de la piel y partes blandas, infecciones urinarias y del aparato genital, sepsis,

endocarditis bacteriana, neumonías y gastroenteritis entre otras, producidas por los microorganismos anteriormente mencionados.

## I-5. EL MICROORGANISMO

En este trabajo de Tesis se seleccionaron para los ensayos microbiológicos cepas de *Staphylococcus aureus*, cuyas características serán mencionadas a continuación.

### I-5.1. Características generales

*S. aureus* se incluye dentro de la familia *Micrococcaceae* y del género *Staphylococcus*.

Son células esféricas Gram positivas, con un diámetro que varía de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$ . Se disponen de a pares, tétradas o en racimos irregulares. Son inmóviles, no esporulados, usualmente catalasa positivos. Son anaerobios facultativos, 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 las superficies<sup>139</sup>, al calor (soportan 50°C durante 30 min) y al cloruro de sodio al 9 %.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 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<sup>163</sup>.

*S. aureus* está asociado con la producción de múltiples enfermedades<sup>140</sup>. Esta especie, que se encuentra dentro del grupo de los *Staphylococcus* coagulasa positivos<sup>164</sup>, es además uno de los patógenos hospitalarios más importantes y extendidos. Ciertas cepas con una virulencia desacostumbrada se han asociado ampliamente a infecciones hospitalarias y desarrollan con rapidez resistencia a muchos agentes antimicrobianos, haciendo su tratamiento muy difícil<sup>140</sup>.

### I-5.2. Estructura de la pared

La pared de *S. aureus* posee tres componentes esenciales. El *péptidoglicano* comprende entre el 40 y 60% del peso de la misma y es característico de la especie ya que todos los residuos de ácido N acetil murámico presentan cadenas tetrapeptídicas con enlaces cruzados formados por puentes de pentaglicina, lo que favorece su supervivencia en

los tejidos del huésped. *S. aureus*, también contiene aproximadamente un 40% de ácidos teicoicos y lipoteicoicos característicos de ribitol fosfato y un componente proteico unido por enlace covalente al péptidoglicano y uniformemente distribuido en la pared llamado *proteína A* que se une de manera inespecífica (por el fragmento Fc) a las inmunoglobulinas G (G1, G2 y G4) del huésped bloqueando el proceso de fagocitosis. Un esquema de la estructura de la pared se muestra en la **Figura I.7**.

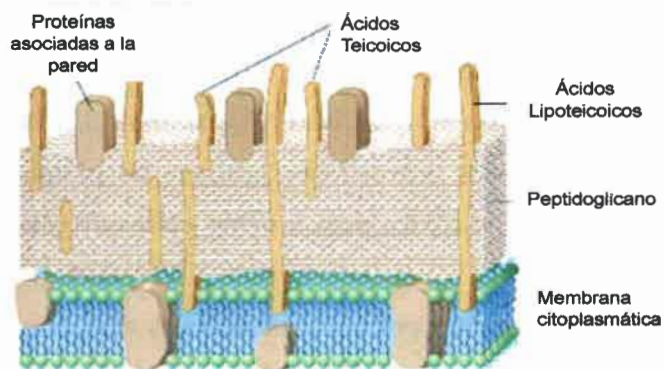


Figura I.7. Representación esquemática de la pared celular de bacterias Gram positivas.

El péptidoglicano, los ácidos teicoicos y la proteína A comprenden la estructura antigénica de este microorganismo. También resultan antígenos: el factor de agregación (un componente de pared de *S. aureus* que agrega células enteras de estafilococos en presencia de plasma) y el polisacárido capsular (estructura ligeramente laxa que recubre ciertas cepas y es capaz de interactuar con el huésped)<sup>138,139</sup>.

### **I-5.3. Productos extracelulares: Toxinas y Enzimas**

*S. aureus* también se caracteriza por producir gran variedad de sustancias que libera al medio. Estos productos extracelulares pueden o no ser tóxicos. Dentro de las sustancias tóxicas encontramos las hemolisinas, leucocidinas, enterotoxinas, la toxina exfoliativa responsable del Síndrome de la Piel Escaldada y la toxina del Síndrome del Choque Tóxico (TSST-1)<sup>138</sup>.

Dentro de las sustancias no tóxicas, *S. aureus* libera al medio enzimas como catalasas, coagulinas, hialuronidasas,  $\beta$ -lactamasas, lipasas, nucleasas, estafiloquinasas, fosfatasa alcalina, pirrolidonil arilamidasa, ornitina descarboxilasa, termonucleasa y  $\beta$ -galactosidasa. A continuación se describen brevemente algunas de ellas<sup>136</sup>.



**Catalasa:** es una enzima que descompone el  $H_2O_2$  en oxígeno y agua. Químicamente es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina.

La prueba de la catalasa permite diferenciar microorganismos del género estafilococo que son catalasa positivos, del género estreptococo que son catalasa negativos.

**Coagulasa:** es una enzima proteolítica de composición química desconocida con actividad semejante a la protrombina, la cual coagula el plasma por mecanismos diferentes de los fisiológicos humanos.

**Hialuronidasa:** también llamada factor de extensión, facilita la diseminación de la infección al hidrolizar el ácido hialurónico de los tejidos.

**Hemolisinas:** existen cuatro tipos de hemolisinas alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ), y delta ( $\delta$ ). La hemolisina  $\alpha$  puede producir lisis de los eritrocitos y lesionar las plaquetas mientras que la  $\beta$  degrada la esfingomiélin y es tóxica para muchas clases de células incluso para los eritrocitos humanos.

**Leucocidina:** es una enzima capaz de lisar leucocitos polimorfonucleares y macrófagos. Su actividad lítica se atribuye a una alteración de la bomba sodio-potasio seguida de una serie de elementos secundarios, incluyendo un aumento de la permeabilidad a cationes, secreción de proteínas y acumulación de calcio.

**Toxina exfoliativa:** también conocida como toxina epidermolítica, produce la descamación generalizada del síndrome estafilocócico de piel escaldada.

**Toxina del choque tóxico:** en el ser humano, la presencia de esta toxina se asocia con fiebre elevada, shock, vómitos, diarreas, trombocitopenia, insuficiencia renal y hepática, afecciones de aparatos y sistemas múltiples, incluyendo un exantema descamativo en la palma de las manos y planta de los pies. Un 80 % de casos del síndrome de choque tóxico se asocia con la menstruación y uso de tampones y un 20 % de los casos ocurre junto a infecciones posquirúrgicas y otros tipos de infecciones locales (cutáneas, óseas, pulmonares).

**Enterotoxinas.** Existen al menos seis toxinas solubles designadas con letras de la A a la F, producidas por casi el 50 % de las cepas de *S. aureus*. Las enterotoxinas son termoestables (soportan ebullición durante 30 min) y resisten la acción de las enzimas intestinales. Son causa importante de envenenamiento alimentario, sobre todo cuando se degradan proteínas o carbohidratos.

#### **I-5.4. Procesos infecciosos**

Del 40 al 50 % de los seres humanos son portadores nasales de *S. aureus*, también se encuentran con regularidad en las ropas personales, las ropas de camas y otros objetos de los ambientes humanos. La capacidad patógena de una cepa determinada de *S. aureus* está dada por mecanismos y factores patogénicos y producen una variedad de síndromes con manifestaciones clínicas que varían desde una simple pústula o impétigo hasta septicemia o muerte.

*S. aureus* es capaz de producir cuadros infecciosos en humanos, tales como forúnculos y abscesos de todo tipo y en cualquier parte del cuerpo, foliculitis, impétigo, hidrosadenitis, blefaritis, otitis, osteomielitis, endocarditis, entre otras. Puede llegar a sangre y producir bacteriemias o septicemias. También afecta al aparato digestivo, genitourinario y respiratorio (neumonías). Sus toxinas también producen cuadros clínicos tales como el Síndrome del Choque Tóxico, el Síndrome de la Piel Escaldada y las gastroenteritis estafilocócicas producidas por las enterotoxinas<sup>139</sup>.

Además, este patógeno es capaz de infectar líneas intravasculares, marcapasos y válvulas cardíacas artificiales.<sup>165</sup>

Una característica distintiva de las infecciones crónicas producidas por *S. aureus* es la capacidad de este microorganismo de crecer formando biopelículas, una comunidad de células inmersa en una matriz polimérica extracelular la cual se forma cuando las bacterias se adhieren a una superficie sólida<sup>166</sup>. Estas comunidades constituyen un nicho de protección que promueve el crecimiento y la supervivencia de las bacterias en un ambiente hostil, además dificultan el tratamiento quimioterápico debido, posiblemente, a la falta de permeabilidad de los antibióticos a la estructura de la biopelícula<sup>167</sup>.

En animales *S. aureus* es uno de los principales agentes causales de mastitis bovina (infección de la glándula mamaria en respuesta a un daño local, que puede ser de origen infeccioso, tóxico o traumático)<sup>168</sup> disminuyendo así la calidad y cantidad de leche producida, lo cual genera pérdidas económicas considerables<sup>169</sup>. La formación de biopelículas por parte de *S. aureus* es considerado un factor de virulencia asociado con el desarrollo de mastitis en bovinos<sup>170</sup>.

### **I-5.5. Diagnóstico**

El hallazgo de racimos irregulares típicos de cocos Gram positivos, en el examen microscópico directo del material purulento, permite dar un diagnóstico presuntivo. El diagnóstico definitivo se consigue aislando e identificando el microorganismo. Básicamente se realiza aislamiento del microorganismo en medios selectivos y diferenciales, se continúa con la observación macroscópica de las colonias y microscópica con coloración de Gram. Si se observa morfología y coloración característica de *S. aureus* se realizan pruebas identificadoras como catalasa y coagulasa (*S. aureus* es catalasa y coagulasa positivo). También es conveniente agregar otras pruebas como por ejemplo termonucleasa y fermentación de diferentes azúcares (*S. aureus* es termonucleasa positivo y manitol positivo) o detección de antígenos mediante test de látex.

El diagnóstico de mastitis bovina se realiza a través de pruebas físicas, químicas, biológicas y métodos electrónicos<sup>171</sup>.

### **I-5.6. Tratamiento**

La quimioterapia antimicrobiana en medicina humana y veterinaria es la principal herramienta terapéutica frente a los microorganismos patógenos causantes de enfermedades infecciosas<sup>172</sup>.

Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos son muy importantes para la elección del agente apropiado y para la evaluación de su efectividad durante el transcurso de la infección. A menos que el paciente sea alérgico, se recomienda bactericidas análogos de la penicilina. La elección inicial debe limitarse a los resistentes a  $\beta$ -lactamasas dado que la mayoría de las cepas aisladas de infecciones hospitalarias y adquiridas en la comunidad, son productoras de dichas enzimas. Pero si la prueba de sensibilidad a antibióticos demuestra que el estafilococo aislado es sensible a la penicilina, esta debe ser la droga de elección porque es más activa y menos costosa<sup>139</sup>.

En general, las infecciones por estafilococos son tratadas en humanos con penicilinas como fármacos de primera elección, tales como la Amoxicilina sola o co-administrada con ácido clavulánico, y con cefalosporinas (entre ellas Cefalexina o Ceftriaxona) y Vancomicina como fármacos alternativos. Los antimicrobianos más utilizados en el tratamiento de mastitis bovina son los  $\beta$ -lactámicos, tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos y sulfonamidas<sup>173</sup>.

## I.6. REFERENCIAS

1. Mulliken R. S. Interpretation of the atmospheric oxygen bands; electronic levels of the oxygen molecule. *Nature* (1928) 122:505.
2. Min D.B., Lee H.O. Chemistry of lipid oxidation. *Flavor Chemistry: Thirty years of progress*. R. Teranishi, E. L. Wick, I. Hornstein (Eds), Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York (1999)
3. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. Third Edition, Oxford University Press, Oxford (1999)
4. Herzberg G. Photography of the Infra-Red Solar Spectrum to Wave-length 12,900 Å. *Nature* (1934) 133:759.
5. Foote C. S., Valentine J. S., Greenberg A., Liebman J. F. *Active oxygen in chemistry*. Blackie A & P., London (1995)
6. Kears D. R. Physical and chemical properties of singlet molecular oxygen. *Chemical Reviews* (1971) 71:395.
7. Reiter R. J. The role of the neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage. *Neurochemistry International* (1995) 27:453.
8. Gillham B., Papachristodoulou D. K., Thomas J. H. *Biochemical Basis of Medicine*. Third Edition, Butterworth-Heinemann, London (1997)
9. Cochrane C. G., Gimbrone M. A. (Eds). *Biological Oxidants: Generation and Injurious Consequences*. Academic Press, San Diego (1992)
10. Ho Y. S., Magnenat J. L., Bronson R. T., Cao J., Gargano M., Sugawara M., Funk C. D. Mice Deficient in Cellular Glutathione Peroxidase Develop Normally and Show No Increased Sensitivity to Hyperoxia. *J. Biological Chemistry* (1997) 272:16644.
11. Heelis P. F. The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazines). *Chemical Society Reviews* (1982) 11:15.
12. Criado S., García N. A. A comparative kinetic and mechanistic study between Tetrahydrozoline and Naphazoline toward photogenerated reactive oxygen species. *Photochemistry and Photobiology* (2010) 86:23.
13. Viteri G., Edwards A. M., De la Fuente J., Silva E. Study of the interaction between triplet riboflavin and the  $\alpha$ -,  $\beta$ H- and  $\beta$ L-crystallins of the eye lens. *Photochemistry and Photobiology* (2003) 77:535.
14. Sohal R. S., Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* (1996) 273:59.
15. Hanson K. M., Simon J. D. Epidermal trans-urocanic acid and the UV-A-induced photoaging of the skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1998) 95:10576.

16. Albro P. W., Bilski P., Corbett J. T., Schroeder J. L., Chignell C. F. Photochemical reactions and phototoxicity of sterols: novel self-perpetuating mechanisms for lipid photooxidation. *Photochemistry and Photobiology* (1997) 66:316.
17. Aguer J.P., Richard C., Andreux F. Effect of light on humic substance: production of reactive species. *Analysis* (1999) 27:387.
18. Ter Halle A., Richard C. Simulated solar light irradiation of mesotrione in natural waters. *Environmental Science Technology* (2006) 40:3842.
19. Halladja S., Amine-Khodja A., Ter Halle A., Boulkamh A., Richard C. Photolysis of fluometuron in the presence of natural water constituents. *Chemosphere* (2007) 69:1647.
20. Escalada J.P., Pajares A., Gianotti J., Biasutti M. A., Criado S., Molina P., Massad W., Amat-Guerri F., García N. A. Photosensitized degradation in water of the phenolic pesticides bromoxynil and dichlorophen in the presence of riboflavin, as a model of their natural photodescomposition in the environment. *J. Hazardous Materials* (2011) 186:466.
21. De la Rochette A., Silva E., Bilourez-Aragón I., Mancini A., Edwards A. M., Molière P. Riboflavin photodegradation and photosensitizing effect is highly dependent on oxygen and ascorbate concentrations. *Photochemistry and Photobiology* (2000) 72:815.
22. Lledías F., Hansberg W. Catalase modification as a marker for singlet oxygen. *Methods in Enzymology* (2000) 319:110.
23. Henderson B. W., Dougherty T. J. How does Photodynamic Therapy work?. *Photochemistry and Photobiology* (1992) 55:145.
24. Straight R. C., Spikes J. D. Singlet Oxygen. CRC Press, Boca Ratón, Florida (1985)
25. Rawls H. R., Van Santen P. J. A possible role for singlet oxygen in the initiation of fatty acid autoxidation. *J. American Oil Chemists Society* (1970) 47:121.
26. Min D. B., Boff J. M. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (2002) 1:58.
27. Escalada J. P., Pajares A., Gianotti J., Massad W. A., Bertolotti S., Amat-Guerri F., García N. A. Dye-sensitized photodegradation of the fungicide carbendazim and related benzimidazoles. *Chemosphere* (2006) 65:237.
28. Massad W., Bertolotti S., Romero M., García N. A. A kinetic study on the inhibitory action of sympathomimetic drugs towards photogenerated oxygen active species. The case of phenylephrine. *Photochemistry and Photobiology B: Biology* (2005) 80:130.
29. Reynoso E., Nesci A., Allegretti P., Criado S., Biasutti M. A. Kinetic and mechanistic aspects of sensitize photodegradation of  $\beta$ -lactam antibiotics: Microbiological implications. *Redox Report* (2012) 17:275.

- 
30. Castillo C., Criado S., Díaz M., García N.A. Riboflavin as a sensitizer in the photodegradation of tetracyclines. Kinetics, mechanism and microbiological implications. *Dyes and Pigments* (2007) 72:178.
31. Purpora R., Massad W., Ferrari G., Reynoso E., Criado S., Miskoski S., Pajares A., García N. A. The NAIDs indomethacin and diflunisal as scavengers of photogenerated reactive oxygen species. *Photochemistry and Photobiology* (2013) 89:1463.
32. Criado S., Allevi C., García N. A. Visible-light-promoted degradation of the antioxidants propyl gallate and t-butylhydroquinone: Mechanistic aspect. *Redox Report* (2012) 17:131.
33. Barbieri Y., Massad W., Diaz D., Sanz J., Amat-Guerri F., García N. A. Photodegradation of bisphenol A and related compounds under natural-like conditions in the presence of Riboflavin: Kinetics, Mechanism and Photoproducts. *Chemosphere* (2008) 73:564.
34. Krinsky N. I. Singlet oxygen in biological systems. *Trends Biochemical Science* (1977) 2:35.
35. Briviba K., Klotz L. O., Sies H. Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. *Biological Chemistry* (1997) 378:1259.
36. Milanesio M. E., Alvarez M. G., Yslas E. I., Borsarelli C. D., Silver J. J., Rivarola V., Durantini E. N. Photodynamic study of metallo 5,10,15,20-tetrakis(4-methoxyphenyl) porphyrin: photochemical characterization and biological consequences in a human carcinoma cell line. *Photochemistry and Photobiology* (2001) 74:14.
37. Theodossiou T., Hothersall J. S., Woods E. A., Okkenhaug K., Jacoson J., Mac Robert A. Firefly Luciferin-activated Rose Bengal In Vitro Photodynamic Therapy by Intracellular Chemiluminescence in Transgenic NIH 3T3 Cells. *J. Cancer Research* (2003) 63:1818.
38. Bonnett R., Martínez G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* (2001) 57:9513.
39. Foote C. S., Wexler S. Olefin Oxidations with Excited Singlet Molecular Oxygen. *J. American Chemical Society* (1964) 86:3879.
40. Murray R. W., Kaplan M. L. Singlet oxygen sources in ozone chemistry. Chemical oxygenations using the adducts between phosphite esters and ozone. *J. American Chemical Society* (1969) 91:5358.
41. Rosenthal I. Singlet Oxygen. CRC Press, Boca Raton, Florida (1985).
42. Wasserman H. H., Scheffer J. R. Singlet oxygen reactions from photoperoxides. *J. American Chemical Society* (1967) 89:3073.
43. Wasserman H. H., Larsen D. L. Formation of 1,4-endoperoxides from the dye-sensitized photo-oxygenation of alkyl-naphthalenes. *J. American Chemical Society Communications* (1972) 253.

- 
44. Turro N. J., Chow M. F., Rigaudy J. Thermolysis of anthracene endoperoxides. Concerted *vs.* diradical mechanisms. Microscopic reversibility in endothermic chemiluminescent reactions. *J. American Chemical Society* (1979) 101:1300.
  45. Matheson I. B. C., Lee J. Chemical reaction rates of amino acids with singlet oxygen. *Photochemistry and Photobiology* (1979) 29:879.
  46. Evans D. F., Tucker J. N. Reactivity of the ( $^1O_g$ )<sub>2</sub> and lg states of oxygen produced by direct laser excitation. *J. Chemical Society Faraday Transactions* (1976) 72:1661.
  47. Gorman A. A., Lovering G., Rodgers M. A.J. A pulse radiolysis study of the triplet sensitized production of singlet oxygen: determination of energy transfer efficiencies. *J. American Chemical Society* (1978) 100:4527.
  48. Carlsson D.J., Suprunchuk T., Wiles D. L. The Quenching of Singlet Oxygen ( $^1\Delta_g$ ) by Transition Metal Chelates. *Canadian Journal of Chemistry* (1974) 52:3728.
  49. Kodymova J., Spalek O. Performance Characteristics of Jet-type Generator of Singlet Oxygen for Supersonic Chemical Oxygen-Iodine Laser. *J. Applied Physics* (1998) 37:117.
  50. Babaeva N. Y., Arakoni R., Kushner M. J. O<sub>2</sub>( $^1\Delta$ ) production in high pressure flowing He/O<sub>2</sub> plasmas: Scaling and quenching. *J. Applied Physics* (2007) 101:123306.
  51. Bellus D. Singlet oxygen. Reactions with organic compounds and polymers. John Wiley & Sons, New York (1978)
  52. Young R. H., Brewer D. R. Singlet oxygen. Reactions with organic compounds and polymers. John Wiley & Sons, New York (1978)
  53. Gorman A. A. Advances in Photochemistry. Volman D.H., Hammond G. S., Neckers D. C. (Eds), John Wiley & Sons, New York (1992)
  54. Foote C. S. Mechanisms of Photosensitization. Alan R Liss Inc, New York (1984).
  55. Asquith R. S., Rivett D. R. Studies on the photooxidation of tryptophan. *Biophysica Acta* (1971) 252:111.
  56. Sekiya K., Mii S., Tonomura Y. Effects of Modification of Sulfhydryl and Imidazole Groups of Myosin on Its ATPase Activity. *J. Biochemistry, Tokio* (1965) 57:192.
  57. Savige W. E. *International Wool Textile Reserach Conference* (1975) 2:570.
  58. Nakagawa M., Kato S., Kataoka S., Hino T. 3a-Hydroperoxypyrroloindole from tryptophan. Isolation and transformation to formylkynurenine. *J. American Chemical Society* (1979) 101:3136.
  59. Rio G., Berthelot J. *Bulletin de la Societe Chimique, Francia* (1971) 3555.
  60. Dewar M. J. S., Thiel W. MINDO/3 study of the addition of singlet oxygen ( $^1\Delta_g$ ) to 1,3-butadiene *J. American Chemical Society* (1977) 99:2338.
  61. Ashford R. D., Ogryzlo E. A. Arrhenius Parameter for Some Gas-phase Cycloaddition Reactions of Singlet Molecular Oxygen. *Canadian Journal of Chemistry* (1974) 52:3544.

- 
62. Braun M. A., Maurette M. T., Oliveros E. *Technologie Photochimique*, Presses polytechniques romandes CH-1015. Lausanne (1986)
63. Gollnick K. Singlet Oxygen. Mechanism and kinetics of chemical reactions of singlet oxygen with organic compounds. Ranby B., Rabek J. F. (Eds), John Wiley & Sons, Londres (1978).
64. Criado S. N. Fotooxidaciones sensibilizadas de compuestos de importancia biológica. *Tesis doctoral en Ciencias Químicas* (1997)
65. Gorman A. A., Hamblett I., Lambert C., Spencer B., Standen M. C. Identification of both Preequilibrium and Diffusion limits for Reaction of Singlet Oxygen,  $O_2^1\Delta_g$ , with Both Physical and chemical quenchers: Variable-Temperature, Time-Resolved Infrared Luminescence Studies. *J. American Chemical Society* (1988) 110:8053.
66. Gorman A. A., Lovering G., Rodgers M. A. the Entropy-Controlled Reactivity of Singlet Oxygen ( $^1\Delta_g$ ) toward Furans and Indoles in Toluene. A Variable-Temperature study by Pulse Radiolysis. *J. American Chemical Society* (1979) 101:3050.
67. Gorman A. A., Gould I. R., Hamblett I., Standen M. C. Reversible Exciplex Formation between Singlet Oxygen,  $^1\Delta_g$ , and Vitamin E. solvent and Temperature Effects *J. American Chemical Society* (1984) 106:6956.
68. Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J. Biological Chemistry* (1989) 264:7761.
69. Fridovich I. Superoxide radical: An endogenous toxicant. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. (1983) 23:239.
70. Mashino T., Fridovich I. Superoxide radical initiates the autoxidation of dihydroxyacetone. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1987) 254:547.
71. Brent J. A., Rumack B. H. Role of free radicals in toxic hepatic injury I. Free radical biochemistry. *Clinical Toxicology* (1993) 31:139.
72. Massad W., Criado S., Bertolotti S., Pajares A., Gianotti J., Escalada J. P., Amat-Guerri F., García N. A. Photodegradation of the herbicide Norflurazon sensitized by Riboflavin. A kinetic and mechanistic study. *Chemosphere* (2004) 57:455.
73. Díaz M., Luiz M., Alegretti P., Furlong J., Amat-Guerri F., Massad W., Criado S., García N. A. Visible-light-mediated photodegradation of  $17\beta$ -estadiol: Kinetics, Mechanism and Photoproducts. *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (2009) 202:221.
74. Pajares A., Bregliani M., Montaña M. P., Criado S., Massad W., Gianotti J., Gutiérrez I., García N. A. Visible-light promoted photoprocesses on aqueous gallic acid in the presence of riboflavin. Kinetics and mechanism. *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (2010) 209:89.
75. Haber F., Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceeding of the Royal Society A* (1934) 147:332.



- 
76. Afanas'ev I. B. *Superoxide ion: chemistry and biological implications*. CRC Press, Boca Ratón, Florida (1989)
77. Pileni M. P., Santus R., Land E. J. On the photosensitizing properties of *N*-formylkynurenine and related compounds. *Photochemistry and Photobiology* (1978) 28:525.
78. Mc Dowell M. S., Bakac A., Espenson J. H. A convenient route to superoxide ion in aqueous solution. *Inorganic Chemistry* (1983) 22:847.
79. Sawyer D. T., Seo E. T. One-electron mechanism for the electrochemical reduction of molecular oxygen. *Inorganic Chemistry* (1977) 16:499.
80. Castillo C. Procesos Oxidativos Fotosensibilizados sobre Medicamentos Orgánicos y Especies de Importancia Biológica: Antioxidantes, Antibióticos y Proteínas. *Tesis Doctoral en Ciencias Químicas* (2009)
81. Alsheikhly M. I., Simic M. G. Superoxide radical generation in radiation induced autooxidation of fatty acids, en Superoxide and superoxide dismutase in chemistry, biology and medicine. Rotilio G (Ed), Elsevier, Amsterdam (1986)
82. Walling C., Cleary M. Oxygen evolution as a critical test of mechanism in the ferric-ion catalyzed decomposition of hydrogen peroxide. *International Journal of Chemical Kinetic* (1977) 9:595.
83. Le Berre A., Berguer Y. Reactions des superoxydes alcalins avec des composés organiques. I. Reactions radicalaires. *Bulletin de la Societe Chimique, FR* (1966) 2363.
84. Valentine J. S., Curtis A. B. Convenient preparation of solutions of superoxide anion and the reaction of superoxide anion with a copper (II) complex. *J. American Chemical Society* (1975) 97:224.
85. Mc Elroy A. D., Hashman J. S. Synthesis of tetramethylammonium superoxide. *Inorganic Chemistry* (1964) 3:1798.
86. Petrucci R. H. *General Chemistry: Principles & Modern Applications*. Ninth Edition, Prentice Hall (2007)
87. Fenton H. J. H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chemical Society, Transactions* (1984) 65:899.
88. Pignatello J. J. Dark and photoassisted iron(3+)-catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide. *Environmental Science and Technology* (1992) 26:944.
89. Roger V. L., Phillip M. H., Ronald P. M. The Origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radical Biology & Medicine* (1997) 22:885.
90. Stangroom S. J., Macleod C. L., Lester J. N. Photosensitized transformation of the herbicide 4-chloro-2-methylphenoxy acetic acid (MCPA) in water. *Water Research* (1998) 32:623.
91. Coelho C., Cavani L., Ter Halle A., Guyot G., Ciavatta C., Richard C. Rates of production of hydroxyl radicals and singlet oxygen from irradiated compost. *Chemosphere* (2011) 85:630.

- 
92. Song W., Chen W., Cooper W. J., Greaves J., Miller G. E. Free-Radical Destruction of  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Aqueous Solution *J. Physical Chemistry A* (2008) 112:7411.
  93. Dail M. K., Mezyk S. P. Hydroxyl-Radical-Induced Degradative Oxidation of  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Water: Absolute Rate Constant Measurements. *J. Physical Chemistry A* (2010) 114:8391.
  94. Vialaton D., Richard C. Phototransformation of aromatic pollutants in solar light: Photolysis versus photosensitized reactions under natural water conditions. *Aquatic Science* (2002) 64:207.
  95. Huang C. P., Dong Ch., Tang Z. Advanced chemical oxidation: Its present role and potential future in hazardous waste treatment. *Waste Management* (1993) 13:361.
  96. Hoigné J., Bader H. The role of hydroxyl radical reactions in ozonation processes in aqueous solutions. *Water Research* (1976) 10:377.
  97. Hoigné J., Bader H. Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water—I: Non-dissociating organic compounds. *Water Research* (1983) 17:173.
  98. Brillas E., Mur E., Sauleda R., Sánchez L., Peral J., Doménech X., Casado J. Aniline mineralization by AOP's: anodic oxidation, photocatalysis, electro-Fenton and photoelectro-Fenton processes. *Applied Catalysis B: Environmental* (1998) 16:31.
  99. Makogon O., Flyunt R., Asmus K. D. Formation and degradation of halogenated organic acid. Radiation versus photocatalytically induced processes. *J. Advance Oxidation Technologies* (1998) 3:11.
  100. Chaychian M., Silverman J., Al-Sheikhly M. Ionizing Radiation Induced Degradation of Tetrachlorobiphenyl in Transformer Oil. *Environmental Science and Technology* (1999) 33:2461.
  101. Doménech X., Jardim W. F., Litter M. I. Procesos Avanzados de Oxidación para la eliminacion de contaminantes (2001)
  102. Legrini O., Oliveros E., Braun A. M. Photochemical processes for water treatment. *Chemical Reviews* (1993) 93:671.
  103. Handbook of Advanced Photochemical Oxidation Processes, United States Environmental Protection Agency publication (1998)
  104. González M.C., Braun A. M. VUV photolysis of aqueous solutions of nitrate and nitrite. *Research on Chemical Intermediates* (1995) 21:837.
  105. Hatchard C.G., Parker C. A. A New Sensitive Chemical Actinometer. II. Potassium Ferrioxalate as a Standard Chemical Actinometer. *Proceeding of the Royal Society of London: A* (1956) 235:518.
  106. Safarzadeh-Amiri A., Bolton J.R., Cater S.R. Ferrioxalate-mediated photodegradation of organic pollutants in contaminated water. *Water Research* (1997) 31:787.

- 
107. Zuo Y., Hoigné J. Formation of hydrogen peroxide and depletion of oxalic acid in atmospheric water by photolysis of iron(III)-oxalato complexes. *Environmental Science and Technology* (1992) 26:1014.
108. Nogueira R. F. P., Jardim W.F. Solar photodegradation of water contaminants using potassium ferrioxalate. *J. Advance Oxidation Technologies* (1999) 4:1.
109. Weavers L. K., Hua I., Hoffmann M. R. Degradation of Triethanolamine and chemical oxygen demand reduction in wastewater by photoactivated periodate. *Water Environment Reserach* (1997) 69:1112.
110. Mills A., Le Hunte S. An overview of semiconductor photocatalysis. *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (1997) 108:1.
111. Shinde S.S., Bhosale C. H., Rajpure K.Y. Hydroxyl radical's role in the remediation of wastewater. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* (2012) 116:66.
112. Kamat P. V. Photochemistry on nonreactive and reactive (semiconductor) surfaces. *Chemical Reviews* (1993) 93:267.
113. Galoppini E. Linkers for anchoring sensitizers to semiconductor nanoparticles. *Coordination Chemistry Reviews* (2004) 248:1283.
114. Scaiano J. C. Handbook of Organic Photochemistry. CRC Press, Florida (1989)
115. Schenk G. O., Koch E. X4. Zwischenreaktionen bei photosensibilisierten Prozessen in Lösungen. *Elektrochem.* (1960) 64:170.
116. Murgida D. H., Aramendia P. F., Balsells R. E., Photosensitized Oxidation of Oxopurines by Rose Bengal. *Photochemistry and Photobiology* (1998) 68:467.
117. Foote C. S. Mechanisms of photooxygenation. Porphyrin Localisation and Treatment of Tumours. Doiron D., Gomer C. (Eds), Alan R. Liss, New York (1984)
118. Foote C. S. Definition of Type I and Type II Photosensitized oxidation. *Photochemistry and Photobiology* (1991) 54:659.
119. García N. A., Criado S. N., Massad W. A. Riboflavin as a visible-light-sensitiser in aerobic photodegradation of ophthalmic and sympathomimetic drugs in: Comprehensive Series in Photosciences. Flavins: Photochemistry and Photobiology. Silva E., Edwards A. M. (Eds). *The Royal Society of Chemistry* (2006) 176:6.
120. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* (1997) 39:1.
121. Lee P. C. C., Rodgers M. A. Laser flash Photokinetic studies of Rose Bengal sensitized Photodynamic interactions of nucleotides and DNA. *Photochemistry and Photobiology* (1987) 45:79.
122. Saito I., Kato S., Matsuura T. Photoinduced reactions. XL addition of singlet oxygen to monocyclic aromatic ring. *Tetrahedron Letters* (1970) 11:230.

- 
123. Foote C. S., Thomas M., Ching T. Y. Photooxidation of phenols. *J. Photochemistry* (1976) 5:172.
  124. Smith W. F. Kinetic evidence for both quenching and reaction of singlet oxygen with triethylamine in pyridine solution. *J. American Chemical Society* (1972) 94:186.
  125. Pecci L., Costa M., Antonucci A., Montefoschi G., Cavallini D. Methylene Blue photosensitized oxidation of cysteine sulfinic acid and other sulfinates: the involvement of singlet oxygen and the azide paradox. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2000) 270:782.
  126. Nonell S. L., Moncayo F., Trull F., Amat-Guerri F., Lissi E., Soltermann A, T. Solvent influence on the kinetics of the photodynamic degradation of Trolox, a water-soluble model compound for vitamin E. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* (1995) 29:157.
  127. Linke G., Jingwen C., Xianliang Q., Jing L., Xiyun C. Light source dependent effects of main water constituents on photodegradation of Phenicol antibiotics: Mechanism and Kinetics. *Environmetal Science and Technology* (2009) 43:3101.
  128. Sharman W. M., Allen C. M., Van Lier J. E. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods in Enzymology* (2000) 319:376.
  129. Miskoski S. Fotooxidaciones sensibilizadas de compuestos de importancia biológica: Tetraciclinas y hormonas tiroideas. *Tesis Doctoral en Ciencias Químicas* (2004)
  130. Neckers D. C. Rose Bengal. Review. *J Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (1989) 47: 1.
  131. Nonell S., Gozález M., Trull F. R. H-phenalen-1-ona-2-sulfonic acid: an extremely efficient singlet oxygen sensitizer for aqueous media. *Afinidad* (1993) 448:445.
  132. Tayler M. B., Radda G. K. Flavins as photosensitizers. *Methods in Enzymology* (1971) 18:496.
  133. Strohl W. R. Biotechnology of Antibiotics. *Drugs and the pharmaceutical science.* (1997) 82:842.
  134. Neu H. C. The crisis in antibiotic resistance. *Science* (1992) 257:1064.
  135. Harrison. Principios de Medicina Interna. Décimo sexta edición, Editorial Mac Graw-Hill Interamericana, México (2006)
  136. Llop Hernández A., Valdés-Dapena Vivanco M. M., Zuazo Silva J. L. Microbiología y Parasitología médica. Tomo I. Editorial Ciencias Médicas, Ciudad de la Habana (2001).
  137. Marin M., Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (2003) 21:42.
  138. Basualdo J. A., Coto C. E., Torres R. A. Microbiología Médica: Bacteriología-Micología-Virología-Parasitología-Inmunología. Segunda Edición, Editorial Atlante, Bs. As., Argentina (2006)
  139. Joklik W. K., Willett H. P., Amos D. G., Wilfert C. Zinnsser Microbiología. 20ª Edición, Editorial panamericana, Bs. As., Argetina (1994)

- 
140. Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. Brock-Biología de los Microorganismos. Décima Edición, Editorial Pearson. Educacion S. A., Madrid, España (2003)
141. Poole K. Multidrug resistance in gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology* (2001) 4:500.
142. Smith A. M., Klugman K. P., Coffey T. J., Spratt B. G. Genetic diversity of penicillin-binding protein 2B and 2X genes from *Streptococcus pneumoniae* in South Africa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1993) 37:1938.
143. De Lencastre H., Sa Figueiredo A. M., Urban C., Rahal J., Tomasz A. Multiple mechanisms of methicillin resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1991) 35:632.
144. Frère J. M. Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Molecular Microbiology* (1995) 16:385.
145. Datta N., Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature* (1968) 208:239.
146. Miller L. A., Ratnam K., Payne D. J.  $\beta$ -lactamase-inhibitor combinations in the 21st century: current agents and new developments. *Current Opinion in Pharmacology* (2001) 1:451.
147. Georgopapadakou N. H.  $\beta$ -Lactamase inhibitors: evolving compounds for evolving resistance targets. *Expert Opinion on Investigational Drugs* (2004) 13:1307.
148. Bush K. The impact of  $\beta$ -lactamases on the development of novel antimicrobial agents. *Current Opinion in Investigational Drugs* (2002) 3:1284.
149. Reading C., Cole M. Clavulanic acid: a beta-lactamase inhibiting betalactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1977) 11:852.
150. Tortora G. J., Funke B. R., Case C.L. Introducción a la Microbiología. Novena Edición, Editorial médica Panamericana, Bs. As., Argentina (2007)
151. Tenover F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control* (2006) 34:3.
152. Litter M. Farmacología Experimental y Clínica. Sexta Edición, Editorial El Ateneo, Bs. As., Argentina (1980)
153. Espinosa M., Bosch A. J., Ruiz Sánchez F., Sánchez Rojas C., Bosch O. Recent developments in the analytical determination of Cefadroxil. *Analytical determination of Cefadroxil. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* (2008) 3:217.
154. Cona E. T. Etapas en la evaluación de diferentes cefalosporinas: Un flujograma lógico. *Revista Chilena de Infectología* (2002) 19:88.
155. Jawetz E., Melnick J. L., Adelberg E. A. Microbiología Médica. Décimo cuarta Edición, Editorial El Manual Moderno, México (1992)

- 
156. Gnann J., Goetter W., Elliot A., Cobbs E. Ceftriaxone: in vitro studies and clinical evaluation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1982) 22:1.
157. Neu H., Merepol N., Fu K. Antibacterial Activity of Ceftriaxone (Ro 13-9904) a  $\beta$  lactamase stable Cephalosporin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1981) 19:414.
158. Bergoglio R. M. Antibióticos. Quinta Edición, Editorial Médica Panamericana, Bs. As., Argentina (1993)
159. Suddhasattya D., Kalyani K., Samyuktha B., Kumar Sahoo S., Subhasis M., Murthy P. N., Dhiraj K. Development and validation of UV-Vis spectrophotometric method for the estimation and degradation monitoring of Cefadroxil in bulk and pharmaceutical dosage forms. *International Journal of Chemistry Research* (2010) 1:1.
160. Geddes A. M., Klugman K. P., Rolinson G. N. Introduction: historical perspective and development of amoxicillin/clavulanate. *International Journal of Antimicrobial Agents* (2007) 30:109.
161. Marín Zamora R., Areu Regateiro A., Gundian J., Manresa R., Sánchez J., Morales Sirgado R. Cefalosporinas. *Acta Médica* (1998) 8:40.
162. Mensa J., Gatell J. M., Azanza J. R., Dominguez-Gil A., García J. E., Jiménez de anta M. T., Prats G. Guía terapéutica antimicrobiana. Décimo octava Edición, Elsevier Masson, Barcelona (2008)
163. Koneman E. W., Allen S. D., Janda W. M., Schreck enberger P. C., Winn W. C. Diagnóstico Microbiológico. Quinta Edición, Editorial médica Panamericana, Bs. As., Argentina (1999)
164. Jawetz E., Melnick J. L. Microbiología Médica. Editorial El manual moderno S.A., México. (2002)
165. Bhanu S., Martin F. Mini review *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *International Journal of Medical Microbiology* (2010) 300:170.
166. Speziale P., Visai L., Rindi S., Pietrocola G., Provenza G., Provenzano M. Prevention and treatment of *Staphylococcus* biofilms. *Current Medicinal Chemistry* (2008) 15:3185.
167. Stewart P. S., Costerton J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* (2001) 358:135.
168. Ma Y., Ryan C., Barbano D. M., Galton D. M., Rudan M. A., Boor K. F. Effects of somatic cell count of quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *J. Dairy Science* (1999) 83:264.
169. López Meza J. D., Higuera Ramos J. E., Ochoa Zarzosa A., Chassin Noria O., Valdez Alarcón J. J., Bravo Patiño A., Baizabal Aguirre V. M. Caracterización molecular de aislamientos de *Staphylococcus* spp. asociados a mastitis bovina en Tarímbaro, Michoacán. *Tecpecu Mexico* (2006) 1:44.
170. Fox L. K., Zadoks R. N., Gaskins C. T. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Veterinary Microbiology* (2005) 107:295.
171. Redvet. Revista electrónica de veterinaria. ISSN 1695-7504 (2007) Vol.8.

172. San Marín B., Kruze J., Morales M. A., Agüero H., León B., Espinoza S., Iragüen D., Puga J., Borie C. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis bovina en vacas lecheras de la Vª Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria, Valdivia, Vol 34 (2002)*

173. Watts J. L., Salmon S. A., Yancey R. S., Nickerson S. C., Weaver L. J., Hoemberg C., Pankey J. W., Fox L. K. Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mammary glands of dairy heifers. *J. Dairy Science (1995) 78:1637.*

# CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

---

## II-1. REACTIVOS Y SOLVENTES

### II-1.1. Sensibilizadores

Perinaftenona (PN) 97%, Rosa de Bengala (RB) y Riboflavina (Rf) fueron adquiridos de Aldrich Chemical Company.

### II-1.2. Sustratos de estudio

Antibióticos (Atb): Amoxicilina (Amx), Cefalexina hidratada (Cfx) Ceftriaxona sal disódica heptahidratada (Cft), Ampicilina trihidratada (Amp), Cefadroxil (Cfd) y Cefotaxima sal sódica (Ctx) fueron provistos por Sigma-Aldrich Argentina S.A.

### II-1.3. Solventes

Para las experiencias de irradiación fotosensibilizada se utilizó como solvente soluciones reguladoras de pH en agua tridestilada o agua deuterada, D<sub>2</sub>O (en experiencias resueltas en el tiempo). El ajuste del pH o pD se realizó de la siguiente manera<sup>1</sup>:

pH= 7,4: 50 ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M y 39,1 ml de NaOH 0,1 M diluidos a 100 ml.

pH= 10: 50 ml de NaCO<sub>3</sub>H 0,05 M y 10,7 ml de NaOH 0,1 M diluidos a 100 ml.

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCO<sub>3</sub>H, NaOH fueron provistos por Aldrich Chemical Company, y D<sub>2</sub>O (99.9%) por Sigma-Aldrich.

Para las experiencias de HPLC/masa se utilizó Acetato de Amonio y Metanol Sintorgan grado HPLC.

### II-1.4. Otros reactivos

Azida sódica (NaN<sub>3</sub>), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y D-manitol fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.



### II-1.5. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron adquiridos de Britania.

Agar Mueller Hinton (AMH) composición por cada 1000 ml de agua: infusión de carne 300,00 g; peptona ácida de caseína 17,50 g; almidón 1,50 g y agar 15,00 g.

Caldo Nutritivo (CN) composición por cada 1000 ml de agua: pluripeptona 5,00 g y extracto de carne 3,00 g.

Agar-agar (A-A).

### II-1.6. Cepas de *S. aureus* utilizadas

Las cepas de *Staphylococcus* empleadas en este trabajo de Tesis fueron:

- *S. aureus* ATCC 25923: cepa de referencia utilizada como control en ensayos de susceptibilidad a antibióticos.
- *S. aureus* DM1 y DM2: cepas aisladas de infecciones intrahospitalarias en humanos. Estas cepas pertenecen a la colección bacteriana del Departamento de Microbiología e Inmunología, de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Las cepas bacterianas fueron mantenidas a -20 °C en glicerol al 30% v/v.

## II-2. DETERMINACIONES FISICOQUÍMICAS Y FOTOQUÍMICAS

### II-2.1. Preparación de soluciones

Se preparó el sensibilizador en la solución reguladora de pH correspondiente. La absorbancia se ajustó según la experiencia realizada. En determinaciones cinéticas estacionarias se empleó una absorbancia de 0,5-0,6 a la longitud de onda donde el coeficiente de extinción molar es máximo en la banda de la región visible y en determinaciones cinéticas dinámicas fue de 0,2-0,3, a la longitud de onda de excitación del pulso del láser.

En las medidas de fotólisis estacionaria, la solución de PN, RB ó Rf se preparó en la mezcla reguladora y luego, a partir de esta solución del colorante se prepararon soluciones independientes del sustrato con una concentración del orden de  $10^{-4}$  M (las concentraciones fueron determinadas por pesada). Las experiencias se realizaron con agitación para asegurar la homogeneidad del medio iluminado y se mantuvieron cubiertas de la luz hasta el momento de comenzar la experiencia.

En las medidas cinéticas resueltas en el tiempo por la técnica de láser flash fotólisis, los sustratos se disolvieron en una solución del colorante y la mezcla reguladora, utilizando H<sub>2</sub>O como disolvente. Previo a las medidas, la solución es desoxigenada por burbujeo con gas Argón, durante 30 minutos.

Para medidas cinéticas por la técnica de detección de la fosforescencia de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) resuelta en el tiempo, los sustratos se disolvieron en una solución del colorante en D<sub>2</sub>O, con el fin de aumentar el tiempo de vida de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) en dichas determinaciones<sup>2</sup>. Es importante destacar que en D<sub>2</sub>O esta especie reactiva tiene un tiempo de vida de 60 μs aproximadamente mientras que en H<sub>2</sub>O se reduce a unos 4 μs<sup>3</sup>. A pH 7,4 y 10 se utilizó una mezcla reguladora tal como se indicó anteriormente. Cabe aclarar que el agregado de sales para ajustar el pH de las soluciones disminuye el tiempo de vida de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>), de todas maneras esto no afecta los resultados ya que para determinar k<sub>t</sub> se realizan medidas relativas, como se explicará más adelante en este capítulo.

En las determinaciones cinéticas competitivas en presencia de los inhibidores NaN<sub>3</sub>, SOD, CAT y D-manitol los mismos fueron agregados a la mezcla de Atb y sensibilizador, en experimentos independientes, en una concentración de 1 mM para NaN<sub>3</sub> y D-manitol y 1mg/100 mL para SOD y CAT.

Cabe aclarar que todas las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente con soluciones preparadas recientemente, por duplicado y en algunos casos por triplicado.

## **II-2.2. Equipos utilizados**

### **II-2.2.1. Determinaciones estacionarias**

Las experiencias de fotooxidación sensibilizada en condiciones estacionarias fueron realizadas por irradiación con luz visible de una solución conteniendo el sensibilizador y el sustrato fotooxidable en un fotolizador fabricado en nuestro laboratorio<sup>4,5</sup> (Figura II.1).

El equipo cuenta con una lámpara de cuarzo-halógeno de 150 W de potencia (OSRAM XENOPHOT HPLX 64640) focalizada según la experiencia, en el porta celda o en el recipiente que contiene el electrodo de oxígeno. Además cuenta con filtro térmico (para absorber la radiación IR emitida por la lámpara), filtros de corte adecuados (de modo que el colorante sea el único capaz de absorber la luz irradiada), lentes, un espejo móvil y un agitador magnético. Se entiende por fotólisis estacionaria la que se realiza a través de una iluminación con una fuente de irradiación continua.

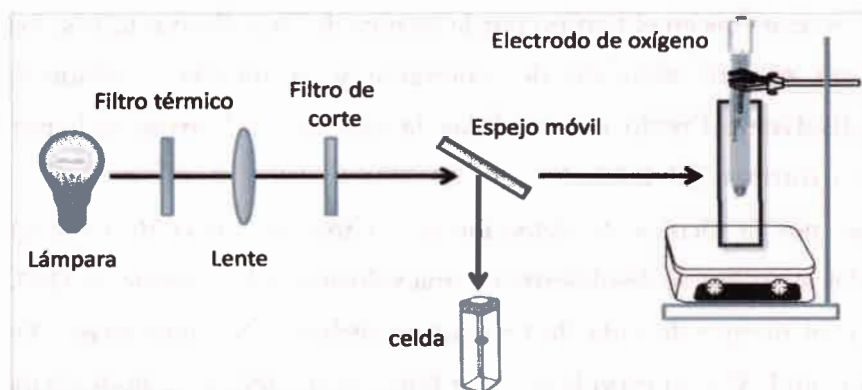


Figura II.1. Esquema del dispositivo utilizado en las experiencias en condiciones estacionarias.

La cinética de fotooxidación se siguió por consumo de oxígeno utilizando un electrodo ORION 97-08 específico para oxígeno disuelto, acoplado a un pH-metro Orion 720. Este consiste en un par de electrodos de plata polarizados, separados de la solución de medida por una membrana permeable a los gases. El oxígeno disuelto en la solución, difunde y penetra selectivamente a través de la membrana del electrodo, donde es reducido a ión hidroxilo. El flujo de iones genera una diferencia de potencial la cual es traducida en "partes por millón de oxígeno disuelto" (ppm) en la escala de pH. La calibración del electrodo se efectúa con agua equilibrada con aire en condiciones atmosféricas, y se realiza antes de cada experiencia. La membrana del electrodo solo opera correcta y reproduciblemente en medios con altos porcentajes de agua y en un intervalo de pH de 3 a 12. Se recomienda su uso en el intervalo de 0 a 14 ppm de oxígeno disuelto<sup>6,7</sup> con una exactitud de  $\pm 0,05$  ppm ó 2%.

Los espectros de absorción del estado fundamental se realizaron con un espectrofotómetro UV-Visible Hewlett Packard 8453A que opera entre 190 y 820 nm, provisto de un detector con arreglo de diodos y una lámpara de deuterio como fuente de excitación. En determinaciones en donde la corrección de blanco fue requerida con mayor exactitud, se utilizó un equipo Shimadzu modelo UV-2401 de doble haz.

#### II-2.2.2. Determinaciones dinámicas

Dado que la molécula de  $O_2 (^1\Delta_g)$  se encuentra en un estado excitado desde el cual puede emitir luz, las medidas dinámicas para la determinaciones de las constantes de desactivación global de  $O_2 (^1\Delta_g)$  ( $k_t$ ) por los sustratos, se realizaron por detección de la *fosforescencia resuelta en el tiempo de  $O_2 (^1\Delta_g)$  a 1270 nm (TRPD)*<sup>8</sup>. La fuente de

excitación es un láser Nd-Yag, Spectron Lasser System, SL400, con emisión a 1066, 532, 355 y 266 nm (primera, segunda, tercera y cuarta armónica, respectivamente). La tercera armónica de frecuencia, a 355 nm, fue empleada para excitar PN. La radiación fosforescente emitida atraviesa diferentes filtros y es detectada, en ángulo recto, con un diodo de germanio amplificado, Judson J16/85p. El detector se acopla a un osciloscopio digital Agilent Technologies DSO 6012 A. La señal luego es transferida a través de una interfase IEEE a una computadora personal para llevar a cabo el procesamiento. En general deben aplicarse 10-15 disparos para promediar y lograr una buena relación señal / ruido, a partir de la cual se determina el tiempo de vida de  $O_2(^1\Delta_g)$  por un ajuste monoexponencial<sup>9</sup>. Un esquema del equipamiento utilizado se muestra a continuación.

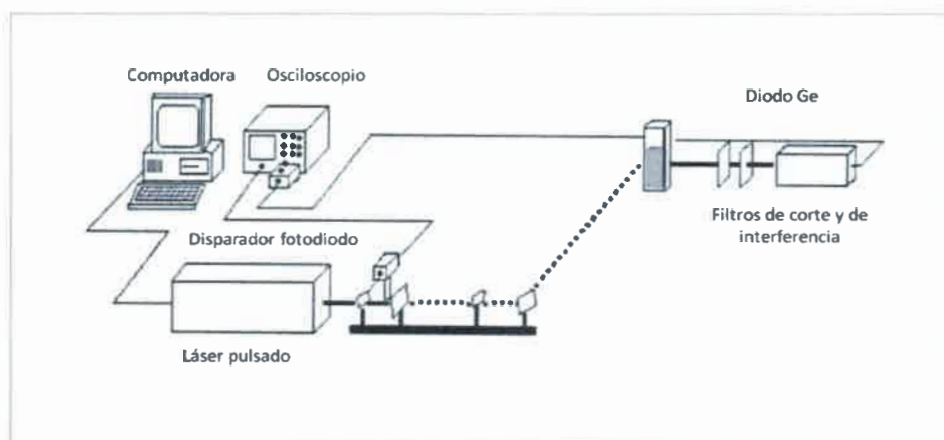


Figura II.2. Representación del equipamiento utilizado para la aplicación de TRPD6.

Por otro lado, la generación y desaparición del triplete excitado del sensibilizador ( $^3S^*$ ) se determinó empleando la técnica de *láser flash fotólisis (LFF)*, el equipamiento utilizado se muestra en la **Figura II.3**. Para excitar RB se utilizó un láser Nd-Yag, Spectron Lasser System, SL400 (armónico a 532 nm) y una lámpara de Xenón de 150 W de potencia como haz analizador, mientras que para excitar Rf se utilizó un láser de Nd:Yag, Brillant Quantel (armónico a 355 nm), y una lámpara de Xenón de 75 W de potencia. Ambos láser cuentan con un ancho de pulso en el intervalo de los nanosegundos. El sistema de detección del equipo comprende un monocromador PTI y un fotomultiplicador PMT extendido al rojo (Hamamatsu R666). La señal es adquirida y promediada por un osciloscopio digital (Agilent Technologies DSO 6012 A para Spectron Lasser System, SL400 y Hewlett Packard 54504A para Brillant Quantel ) y

luego es transferida a una PC vía una interface paralela HPIB donde es analizada y almacenada<sup>10,11</sup>.

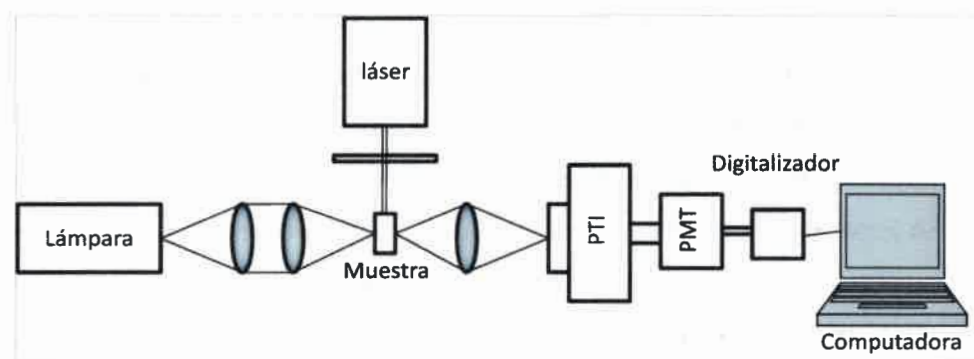


Figura II.3. Esquema del equipo utilizado para medidas de LFF.

Dado que el sensibilizador Rf es un colorante lábil a la luz, para la realización de los espectros de la especie excitada,  ${}^3\text{Rf}^*$ , en ausencia y presencia de los sustratos se utilizó el equipamiento de LFF descrito anteriormente, adaptado a un sistema de flujo continuo a través de una bomba peristáltica (Master Flex C/L, Cole Parmer, Modelo 77122-22) la cual permite recircular la solución desgasada del sensibilizador (o sensibilizador y sustrato) a través de la celda que recibe el pulso de láser y el haz analizador. El recipiente que contiene la solución de Rf que circula por la celda posee tuberías impermeables al oxígeno que permiten la entrada y salida del líquido, así como también la entrada de gas Argón de forma constante. Todas las conexiones y recipientes se encuentran protegidos de la luz durante el transcurso del experimento. Un esquema del sistema utilizado se presenta a continuación.



Figura II.4. Esquema del sistema utilizado para mantener flujo constante en medidas de LFF

Los espectros de fluorescencia del sensibilizador Rf en estado estacionario fueron registrados en un espectrofluorómetro Hitachi F-2500, mientras que las determinaciones de tiempos de vida de fluorescencia se realizaron con un equipo de Conteo de Fotón Único (TC-SPC) correlacionado el tiempo, en un instrumento Edinburgh Analytical Instruments FL-900 CDT. El mismo se encuentra equipado con diodos pulsados emisores de luz a distintas longitudes de onda (LEDs, PicoQuant). El diodo utilizado se seleccionó para maximizar la cantidad de fotones absorbidos por la muestra en base al espectro de absorción del sensibilizador en estudio. Las longitudes de onda de excitación y emisión de fluorescencia para Rf fueron 445 y 515 nm, respectivamente. En la Figura II.5 se muestra un diagrama de bloques del equipo TC-SPC.

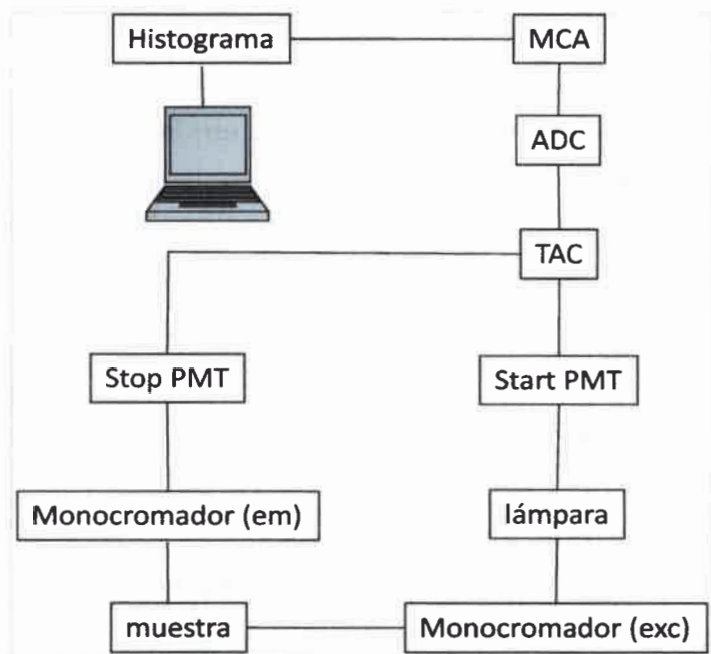


Figura II.5. Diagrama de bloques de un TC-SPC. PMT: fotomultiplicador, TAC: convertidor tiempo-amplitud, ADC: convertidor analógico digital, MCA: analizador multicanal.

El fotomultiplicador de largada (Start PMT) detecta el pulso de la lámpara y genera un pulso eléctrico disparador que está exactamente correlacionado con el pulso óptico. El pulso disparador es conducido al convertidor de tiempo a amplitud (TAC), el cual inicia la carga de un capacitor. Al mismo tiempo el pulso óptico excita la muestra que subsecuentemente emitirá. A lo sumo un fotón es detectado por cada excitación gracias

a una apertura regulable entre la lámpara y la muestra. Una vez detectado el fotón, se genera una señal que detiene la carga del capacitor en el TAC, luego el TAC envía un pulso de salida (stop PMT) cuyo potencial es proporcional a la diferencia de tiempo entre el pulso disparador y el pulso que se generó cuando se detectó el fotón, (en esencia el TAC actúa como cronómetro). Este pulso de salida es convertido en un valor numérico por un convertidor analógico digital (ADC), que luego es almacenado como una cuenta en el canal correspondiente del analizador multicanal (MCA). Es decir, el MCA mide entonces los pulsos de potencial provenientes del TAC y los ordena en cuentas a un determinado potencial (tiempo).

Repitiendo muchas veces esta experiencia se obtiene un histograma del número de cuentas en función de los canales temporales.

La detección e identificación de los fotoproductos se realizó en colaboración con la Dra. Patricia Alegretti del laboratorio LADECOR, División Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (Buenos Aires). Se utilizó un Cromatógrafo líquido Accela (THERMO SCIENTIFIC) configurado con bomba cuaternaria y muestreador automático. El instrumento cuenta con un sistema espectrométrico de trampa de iones LTQ XL (THERMO SCIENTIFIC) con interfase electrospray.

### **II-2.3. Metodología**

El mecanismo requerido para comprender la cinética de las reacciones fotosensibilizadas fue mostrado en la Figura I. 6, sección 3.4, capítulo I.

Las determinaciones se realizaron en presencia de RB ó PN como sensibilizadores a pH 7,4 y 10 con el propósito de investigar la influencia de esta variable sobre el proceso fotooxidativo. El pH 7,4 fue especialmente seleccionado dado que corresponde al valor fisiológico. En presencia de Rf las determinaciones se realizaron solo a pH 7,4 debido a que el sensibilizador resulta sensible a esta condición del medio<sup>12,13</sup>.

#### **II-2.3.1. Determinación de los tiempos de vida de $O_2(^1\Delta_g)$**

##### **a. Por resolución temporal de la fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$**

Aunque el rendimiento cuántico de fosforescencia de  $O_2(^1\Delta_g)$  es muy bajo en la mayoría de los solventes, el desarrollo de fotodiodos de germanio, acoplados con amplificadores de banda ancha, permiten detectar tiempos menores que los microsegundos y medir el tiempo de vida de  $O_2(^1\Delta_g)$  en muchos solventes por

monitoreo de la fosforescencia infrarroja a 1270 nm, utilizando la técnica de TRPD descrita anteriormente.

En la **Figura II.6** se muestra una señal típica del decaimiento de la fosforescencia de  $O_2(^1\Delta_g)$  a 1270 nm, utilizando PN como sensibilizador. Dicho decaimiento está representado por la siguiente ecuación:

$$I = I_0 e^{-t/\tau_0} \quad (1)$$

Donde  $I_0$  representa la intensidad de la luz incidente o intensidad de la señal,  $\tau_0$  el tiempo de vida de  $O_2(^1\Delta_g)$  en ausencia de sustrato y  $t$  el tiempo. El ajuste de las trazas del decaimiento a través de la ecuación (1) permite obtener el valor del tiempo de vida de  $O_2(^1\Delta_g)$ .

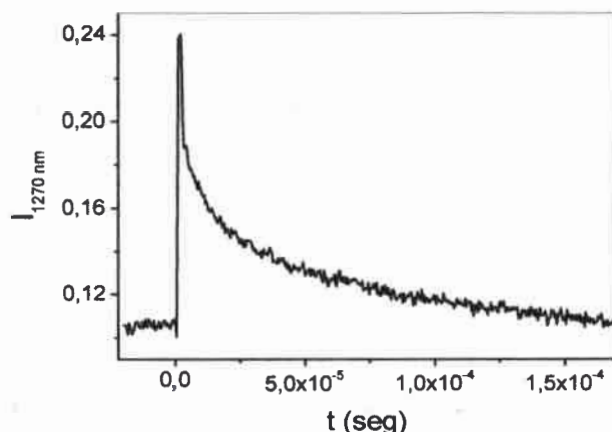


Figura II.6. Señal típica del decaimiento de la fosforescencia de  $O_2(^1\Delta_g)$  a 1270 nm en  $D_2O$ .

Generalmente los puntos iniciales de la señal de decaimiento están perturbados por señales espúreas provenientes de la fuente de excitación o por fluorescencia residual del sensibilizador. En consecuencia el análisis de las trazas de decaimiento se realizó a partir de 8-10  $\mu s$ . Se utilizó el programa Microcal™ Origin™ versión 7.5 para aproximar los decaimientos, el cual lleva a cabo un ajuste por cuadrados mínimos no lineales.

Estos decaimientos no requieren métodos de deconvolución debido a que tanto el ancho del pulso del láser como el tiempo de respuesta del sistema de detección (4-5  $\mu s$ ) no interfieren en la medida de tiempos de vida de  $O_2(^1\Delta_g)$  (valores típicos  $\geq 25 \mu s$ ).



Para evaluar los valores de las constantes de velocidad de desactivación total de  $O_2 (^1\Delta_g)$  ( $k_t$ ) por los sustratos, se determinaron los tiempos de vida de  $O_2 (^1\Delta_g)$  en ausencia ( $\tau_0$ ) y presencia de diferentes concentraciones del sustrato ( $\tau$ ).

$$k_q = k_d + k_t [A] \quad (2)$$

Donde  $k_q$  es  $1/\tau$  y  $k_d$  es  $1/\tau_0$ . De manera que la ecuación (2) puede escribirse como:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + k_t [A] \quad (3)$$

Esta última ecuación se puede reordenar de la siguiente manera:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_t \tau_0 [A] \quad (4)$$

La representación gráfica de  $\tau_0 / \tau$  vs.  $[A]$  (ecuación (4)) permite obtener el valor de  $k_t$ , determinando previamente  $\tau_0$ , o bien se puede representar  $1/\tau$  vs.  $[A]$  (ecuación (3)) y determinar  $k_t$  sin necesidad de medir  $\tau_0$ .

#### *b. Por fotólisis estacionaria*

Este método, conocido como el método de las dobles inversas (ecuación (5)), es una forma alternativa de evaluar  $k_t$ , suponiendo como única reacción la del sustrato con el  $O_2 (^1\Delta_g)$ . Es decir que solamente es válida en ausencia de cualquier interacción que involucre a estados excitados del sensibilizador con el sustrato fotooxidable.

$$(v)^{-1} = (\Phi_\Delta)^{-1}(I_a)^{-1}\{(k_d / k_r [A]) + (k_t / k_r)\} \quad (5)$$

Donde  $v$  es la velocidad de consumo de oxígeno por el sustrato,  $\Phi_\Delta$  el rendimiento cuántico de producción de  $O_2 (^1\Delta_g)$  por el sensibilizador y  $I_a$  la intensidad de luz absorbida por el sensibilizador.

La velocidad se midió como la desaparición de oxígeno en función del tiempo de irradiación para diferentes concentraciones de sustrato, utilizando el electrodo de oxígeno ya descrito. La deducción de la ecuación 5 se presenta en el apéndice II del capítulo VIII.

Representado la inversa de la velocidad de desaparición de oxígeno en función de la inversa de la concentración del sustrato A se obtiene una recta de pendiente  $(k_d/k_r) / \Phi_{\Delta} I_a$  y ordenada  $(k_t/k_r) / \Phi_{\Delta} I_a$ . Luego, mediante el cociente ordenada/pendiente y conociendo el valor de  $k_d$  en el solvente utilizado<sup>7</sup>, es posible calcular  $k_t$ .

### II-2.3.2. Determinación de las constantes de velocidad de desactivación de los estados excitados del sensibilizador por los sustratos

La probabilidad de que el sustrato y el sensibilizador puedan interactuar depende del tipo de solvente, de las concentraciones relativas de sustrato y sensibilizador, de las concentraciones relativas de sustrato y oxígeno, entre otras cosas. Muchas moléculas que no interactúan significativamente en estado fundamental pueden hacerlo cuando se hallan en estado excitado<sup>14</sup>.

Por esta razón las experiencias que se mencionan a continuación se llevaron a cabo con el fin de determinar si existe interacción entre los estados excitados del sensibilizador ( $^1S^*$  y  $^3S^*$ ) y los sustratos en estudio, y en caso de que existiera, establecer los valores de las constantes de velocidad de dicha interacción ( $^1k_q$  y  $^3k_q$  del esquema cinético, Figura I.6, sección 3.4, capítulo I).

#### II-2.3.2.1. Interacción sustrato- estado singlete excitado del sensibilizador

Dado que Rf es un sensibilizador fluorescente se puede determinar la interacción entre el sustrato y el estado singlete excitado de Rf ( $^1Rf^*$ ) mediante métodos estacionarios o resueltos en el tiempo.

##### a. *Método estacionario*

Se evalúan las intensidades de fluorescencia de Rf en ausencia ( $I_0$ ) y en presencia ( $I$ ) de distintas concentraciones del sustrato. Luego, a partir de un clásico tratamiento de Stern-Volmer, representando el cociente  $I_0/I$  en función de la concentración molar del sustrato A (ecuación 6) es posible, a partir de la pendiente y el valor del tiempo de vida de fluorescencia de Rf en ausencia de A ( $^1\tau_0$ ), determinar  $^1k_q$ .

$$\frac{I_0}{I} = 1 + ^1k_q \ ^1\tau_0 [A] \quad (6)$$

Donde  $I_0$  es la intensidad de fluorescencia de Rf en ausencia de A,  $I$  la intensidad de fluorescencia de Rf en presencia de A,  $^1k_q$  la constante de velocidad de desactivación de

${}^1R_f^*$ ,  ${}^1\tau_0$  el tiempo de vida de fluorescencia de Rf en presencia de A y  $K_{SV}$  la constante de Stern-Volmer =  ${}^1k_q{}^1\tau_0$ .

b. *Método resuelto en el tiempo*

Como se mencionó anteriormente, para la determinación de tiempos de vida de fluorescencia se utilizó el método de conteo de fotón único con correlación temporal TC-SPC.

Esta técnica se basa en el hecho de que la distribución de probabilidades para la emisión de un fotón aislado, después de la excitación de una muestra, describe el perfil de la intensidad de emisión en función del tiempo para todos los fotones emitidos como resultado de una excitación<sup>15</sup>. Para reconstruir un perfil de decaimiento lo más exacto posible, es necesario un gran muestreo estadístico de la distribución temporal de los fotones emitidos. Esto se logra midiendo el tiempo de emisión de fotones aislados, luego de un pulso de excitación, un gran número de veces, la cantidad suficiente como para obtener una curva de decaimiento estadísticamente confiable.

Con el fin de no considerar el aporte de la señal de excitación, la función respuesta obtenida debe ser corregida (*deconvolucionada*). De manera que el perfil temporal de los pulsos de excitación es registrado bajo las mismas condiciones reemplazando la muestra con una solución dispersante de luz, por ejemplo Ludox (silica coloidal)<sup>16</sup>.

Los tiempos de vida de fluorescencia de Rf en ausencia ( ${}^1\tau_0$ ) y en presencia de diferentes concentraciones del sustrato ( ${}^1\tau$ ) obtenidos son utilizados en un tratamiento clásico de Stern-Volmer (ecuación 7) de manera que, representando  ${}^1\tau_0/{}^1\tau$  vs. concentración molar de A es posible, a partir de la pendiente determinar  ${}^1k_q$ .

$$\frac{{}^1\tau_0}{{}^1\tau} = 1 + {}^1k_q {}^1\tau_0 [A] \quad (7)$$

Para determinar el valor de la constante independientemente del valor de  ${}^1\tau_0$  también puede utilizarse la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{{}^1\tau} = \frac{1}{{}^1\tau_0} + {}^1k_q [A] \quad (8)$$

En ambos casos  ${}^1\tau_0$  corresponde a el tiempo de vida de fluorescencia de  $Rf$  en ausencia de  $A$ ,  ${}^1\tau$  el tiempo de vida de fluorescencia de  $Rf$  en presencia de  $A$ ,  ${}^1k_q$  la constante de velocidad de desactivación de  ${}^1Rf^*$  y  $K_{SV}$  la constante de Stern-Volmer =  ${}^1k_q{}^1\tau_0$ .

La interacción entre el sustrato y  ${}^1Rf^*$  puede ser estática, dinámica (colisional) o ambas. El primer caso involucra una asociación en el estado fundamental de los reactivos para dar un complejo no fluorescente que al absorber luz inmediatamente retorna al estado fundamental emitiendo un fotón, el segundo caso requiere difusión de los mismos para que ocurra la desactivación y el tercer caso es una combinación de los anteriores en donde una fracción del sensibilizador se acompleja y otra no, la fracción no acomplejada es la que sufre desactivación dinámica<sup>17</sup>.

Las constantes de Stern-Volmer determinadas por fluorescencia estática y resuelta en el tiempo resultan idénticas cuando se trata de un proceso dinámico y la representación gráfica  $I_0/I$  ó  ${}^1\tau_0/{}^1\tau$  vs  $[A]$  es una recta de pendiente  $K_{SV} = {}^1k_q{}^1\tau_0$ . Si la inactivación es de tipo estática, la representación  ${}^1\tau_0/{}^1\tau$  vs  $[A]$  es un constante independiente de  $[A]$  y  ${}^1k_q$  se obtiene de la representación de  $I_0/I$  vs  $[A]$ . Por último, cuando el sistema procede por una combinación de desactivación estática y dinámica el valor de  $K_{sv}$  es mayor que el producto entre  ${}^1k_q{}^1\tau_0$  y la representación grafica  $I_0/I$  vs  $[A]$  se curva respecto a  ${}^1\tau_0/{}^1\tau$  vs  $[A]$  hacia el eje de las ordenadas como consecuencia de que la población acomplejada del sensibilizador resulta inaccesible a la desactivación por el sustrato.

En el presente trabajo de Tesis la determinación de  ${}^1k_q$  se realizó a través de medidas resueltas en el tiempo.

#### II-2.3.2.2. Interacción sustrato- estado triplete excitado del sensibilizador

La posible interacción del estado triplete excitado del sensibilizador ( ${}^3S^*$ ) con los sustratos se estudió mediante Láser flash fotólisis.

Esta es una técnica de resolución temporal que permite el estudio espectroscópico y cinético de especies de corta vida (del orden de los mili o micro segundos), también llamadas especies transitorias, las cuales son generadas por el empleo de luz pulsada, pudiéndose obtener espectros y decaimientos de dichas especies<sup>18,19</sup>. Las especies transitorias generadas mediante la excitación de la muestra por un pulso láser, pueden ser: tripletes, iones radicales, especies zwitteriónicas, etc.

Estas especies se producen en la concentración suficiente como para detectar cambios en las características de absorción de luz, los cuales son detectados por un espectrofotómetro convencional con una fuente de luz continua.

La interacción de  $^3S^*$  con el sustrato fue evaluada mediante la determinación de la constante  $^3k_q$ , realización de espectros de especies transitorias y determinación de rendimientos cuánticos de generación de radicales como se explicará a continuación.

a. *Determinación de  $^3k_q$*

La desaparición del estado  $^3S^*$ , generado por el pulso del láser a 355 nm ó 532 nm para Rf ó RB respectivamente, fue monitoreado por el decaimiento de primer orden de la absorbancia a una longitud de onda donde la interferencia de otras posibles especies resulta insignificante (670 y 650 nm para Rf y RB respectivamente). Los decaimientos fueron realizados a bajas concentraciones de S y a una energía del láser lo suficientemente baja como para evitar efectos indeseables tales como la auto-inhibición o la aniquilación triplete-triplete<sup>8,9</sup>.

El tiempo de vida del  $^3S^*$  fue evaluado en presencia ( $^3\tau$ ) y en ausencia ( $^3\tau_0$ ) de los sustratos y el valor de la constante de interacción ( $^3k_q$ ) fue determinado a través de un tratamiento de *Stern-Volmer* el cual permite, por la representación gráfica de  $^3\tau_0 / ^3\tau$  vs. [A] (ecuación 9) ó  $1 / ^3\tau$  vs. [A] (ecuación 10), obtener el valor de  $^3k_q$  de la pendiente.

$$\frac{^3\tau_0}{^3\tau} = 1 + ^3k_q \ ^3\tau_0 [A] \quad (9)$$

$$\frac{1}{^3\tau} = \frac{1}{^3\tau_0} + ^3k_q [A] \quad (10)$$

La ecuación 10 además presenta la ventaja de que permite obtener el valor de la constante de desactivación sin necesidad de determinar previamente  $^3\tau_0$ .

b. *Espectros del estado  $^3S^*$  en presencia y ausencia de los sustratos*

La muestra es irradiada con un pulso de luz de alta intensidad ( $10^{20}$  fotones) para poblar el estado triplete vía entrecruzamiento de sistema desde el primer estado excitado singlete. Las moléculas en el estado triplete (u otros estados excitados) son detectadas por una segunda fuente de luz (haz analizador) mediante absorción (promoción a niveles tripletes de energía superior), antes de volver al estado

fundamental. El cambio de la densidad óptica debido a las especies transitorias puede ser monitoreado en función del tiempo a una longitud de onda en particular, seleccionada con un monocromador colocado en el camino óptico de la luz de prueba entre la muestra y el detector.

Los cambios temporales de absorción son detectados por un fotodetector de rápida respuesta. Dichos detectores generan una señal eléctrica proporcional a la transmitancia de la especie transitoria de la muestra que es digitalizada y procesada para convertirla en señales de absorbancia. La conversión de la señal eléctrica a valores de absorbancia se realiza de acuerdo a la ley de Lambert y Beer de manera que la relación entre la absorbancia y transmitancia a una dada longitud de onda está dada por la siguiente expresión:

$$A_t = -\log \frac{I_t}{I_0} \quad (11)$$

Luego, la absorbancia de una especie transitoria en función de la longitud de onda y a un dado tiempo, se puede calcular mediante la siguiente ecuación:

$$A_\lambda = -\log \frac{I_t}{I_0} = \epsilon_\lambda b c \quad (12)$$

Donde  $I_t$ : es la intensidad de luz transmitida (mV),  $I_0$ : es la intensidad de luz incidente (mV),  $\epsilon_\lambda$ : es el coeficiente de extinción molar ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $b$ : es el paso óptico del haz analizador a través de la muestra (cm) y  $c$ : es la concentración molar de la especie transitoria. En la **Figura II.7** se muestra una representación de una señal transitoria típica obtenido por LFF.

Los espectros de absorción del  $^3S^*$  en ausencia y presencia de los sustratos, se obtuvieron registrando el cambio de absorbancia a un tiempo fijo, en función de la longitud de onda. Las señales fueron tomadas cada 10 nm desde 300 a 800 nm y analizadas mediante el programa Labview 5.1.

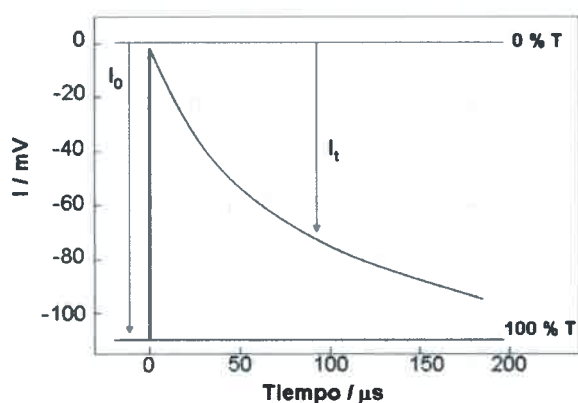


Figura II.7. Representación de una señal transitoria típica obtenida por LFF.

c. *Determinación del rendimiento cuántico de generación de radicales*

El rendimiento cuántico de formación de un producto en particular ( $\Phi$ ) puede definirse en términos generales como la cantidad del producto formado (en moles o moléculas) por cantidad de radiación absorbida (en einstein o fotones)<sup>20</sup>.

El rendimiento cuántico ( $\Phi_{RfH\cdot}$ ) de generación del radical neutro del sensibilizador Rf ( $RfH\cdot$ ) en solución acuosa fue determinado relativo al rendimiento cuántico de  ${}^3Rf^*$  en el mismo solvente ( $\Phi_T=0.5$ )<sup>21,22</sup> empleando la siguiente expresión matemática:

$$\Phi_{RfH\cdot} = \frac{OD_T \epsilon_R}{OD_R \epsilon_T} \Phi_T \quad (13)$$

Donde  $OD_T$  es la absorbancia de  ${}^3Rf^*$  a 670 nm inmediatamente después del pulso del láser,  $OD_R$  es la absorbancia de  $RfH\cdot$  a 570 nm,  $\epsilon_T$  corresponde al coeficiente de extinción molar de  ${}^3Rf^*$  ( $4,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>23</sup> y  $\epsilon_R$  al coeficiente de extinción molar para  $RfH\cdot$  ( $5,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )<sup>24</sup>.

II-2.3.3. Determinación de las velocidades relativas de consumo de oxígeno por los sustratos ( $v_T$ )

La cinética de fotooxidación sensibilizada de los antibióticos se siguió a través del consumo de oxígeno en condiciones aeróbicas de fotoirradiación utilizando el electrodo específico de oxígeno descrito en la sección 2.2.1.

Las velocidades relativas fueron obtenidas a partir de las pendientes iniciales de los gráficos de consumo de oxígeno en función del tiempo de irradiación, de soluciones

conteniendo el sustrato y el sensibilizador, normalizadas al máximo valor de pendiente obtenido ( $v_r$ ).

Para establecer la posible participación de las diferentes EROs en la fotodegradación sensibilizada de los sustratos en estudio, el consumo de oxígeno en condiciones aeróbicas de fotoirradiación estacionaria fue evaluado en ausencia y en presencia de inhibidores específicos de tales especies y los resultados fueron expresados como la relación de las pendientes iniciales de los gráficos de consumo de oxígeno *vs.* tiempo de irradiación en presencia y ausencia de inhibidores ( $v_{inh}/v_0$ ).

Para confirmar la participación de  $O_2(^1\Delta_g)$  se utilizó azida sódica ( $NaN_3$ ), un conocido desactivador físico de esta especie excitada de oxígeno<sup>25,26</sup>. Para determinar la intervención de  $O_2^{\cdot-}$  se utilizó la enzima superóxido dismutasa (SOD). Esta enzima, que cataliza la dismutación de  $O_2^{\cdot-}$ , ha sido ampliamente utilizada con propósitos cuali y cuantitativos como inhibidor de dicha especie oxidativa<sup>27,28,29</sup>. La enzima catalasa (CAT) se utilizó para evaluar la participación de  $H_2O_2$  mientras que D-manitol fue utilizado como inhibidor específico<sup>30</sup> de  $OH^{\cdot}$ .

#### II-2.3.4. Análisis de los fotoproductos

Soluciones 2 mM de los Atb a pH 7,4 y 10 en presencia del sensibilizador RB ( $Abs_{RB}^{549} = 0,5$ ) fueron irradiadas en una celda de fluorescencia de 1 cm de paso óptico abierta a la atmósfera y con agitación permanente. Una vez terminada la fotólisis, las muestras se conservaron cubiertas de la luz en heladera hasta el momento de su análisis.

La determinación de fotoproductos se realizó por HPLC-Masa en el Laboratorio LADECOR de la Universidad Nacional de La Plata por la Dra. Patricia Alegretti.

Se utilizó una columna C18 de 150 mm x 2,1 mm x 5  $\mu$ m. Se trabajó en modo isocrático con mezclas metanol: agua (9:1) + acetato de amonio (0,2 mM), con un flujo de 0,2 ml/min y un volumen de inyección de 10  $\mu$ l.

Las determinaciones se realizaron tanto en modo positivo como en modo negativo, a temperatura ambiente.



### **II-3. DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS**

A continuación se detallan los aspectos metodológicos empleados en los ensayos microbiológicos que permitirán relacionar los efectos de la fotodegradación de los antibióticos por procesos de fotooxidación sensibilizada, y los cambios en las propiedades antimicrobianas de los mismos sobre distintas cepas de *S. aureus*.

Las experiencias de fotodegradación sensibilizada fueron realizadas utilizando el colorante xanténico artificial rosa de bengala (RB) un sensibilizador capaz de generar  $O_2$  ( $1\Delta_g$ )<sup>31</sup>, ampliamente utilizado en ensayos biológicos<sup>32</sup>, y a pH 7,4 dado que este corresponde al valor fisiológico.

#### **II.3.1. Preparación de medios de cultivo**

Para preparar los medios de cultivo se siguió el instructivo que indica el envase: AMH (37 g/L) y CN (8 g/L). Para la preparación de agar nutritivo (AN) se utilizó una mezcla de CN (8 g/L) y A-A (15 g/L). Los medios se hidrataron con agua destilada, se disolvieron y luego se llevaron a autoclave durante 15 minutos a 121 °C para la esterilización.

#### **II-3.2. Equipos utilizados**

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave Stainless Steel Gas/Electric Powered. Handheld Compressed Steam Sterilizer Type YXQ-280 MD.

Los cultivos bacterianos fueron incubados en estufa de cultivo marca FERCA modelo TT400 a 37°C con agitación continua a 100 rpm.

Por otro lado, la densidad óptica (D.O) de los cultivos bacterianos fue medida en un espectrofotómetro Barnstead Turner SP-830.

#### **II-3.3. Metodología**

Previo a la realización de los ensayos cada una de las cepas de *S. aureus* mantenidas en glicerol se sembraron en estrías por agotamiento en placas de AN y se incubaron a 37 °C por 24 hs para obtener colonias aisladas.

##### **II-3.3.1. Realización de las curvas de crecimiento de las cepas estudiadas**

Una curva de crecimiento puede definirse en términos muy generales como la representación gráfica de la determinación periódica de la cantidad de células que

existen en un líquido inoculado con células microbianas provenientes de un cultivo que ha crecido previamente hasta la saturación. Para la realización de las mismas se procedió de la siguiente manera:

A partir de un cultivo *over night*, ON, de cada cepa (realizado tomando 2-3 colonias crecidas en AN que luego son resuspendidas en un tubo con CN e incubadas en agitación a 37°C por 24 hs) se preparó una suspensión microbiana (de concentración  $3 \times 10^5$  UFC/mL) en CN y se incubó en estufa con agitación a 37°C. La D.O. a 660 nm de la suspensión fue tomada cada 1 hora en espectrofotómetro. Simultáneamente a las curvas de crecimiento de cada cepa, también se realizaron curvas en presencia de RB y de antibiótico con el fin de evaluar el efecto del agregado de estos componentes sobre el crecimiento del microorganismo.

II-3.3.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) por macrodilución en caldo

La concentración mínima inhibitoria (CIM) puede definirse como la menor concentración de antibiótico en la cual no hay crecimiento visible (turbidez)<sup>33</sup>.

La determinación de la CIM se realizó por la técnica de macrodilución en caldo. Se preparó una solución "stock" de cada antibiótico en el intervalo adecuado de concentración para el microorganismo sobre el cual será ensayado, dicho intervalo se obtuvo de bibliografía<sup>34</sup>. Para cepas de *S.aureus* se recomiendan los siguientes:

Antibiótico	Intervalo (mg/L)
Amx	0,03-128
Amp	0,03-128
Cfx	0,5-128
Cfd	0,5-128
Cft	0,25-128
Ctx	0,25-128

Por otro lado, a partir de un cultivo ON se preparó una suspensión microbiana. La suspensión para el ensayo CIM debe contener entre  $10^4$  a  $10^6$  UFC/mL de manera que el cultivo ON que posee  $\sim 5 \times 10^8$  UFC/mL fue convenientemente diluido. Esta suspensión fue utilizada dentro de los 30 min de preparada para evitar que el número de UFC/mL aumente.

Para corroborar el número de UFC/mL utilizado se realizó recuento en placas con AN para cada uno de los microorganismos a ensayar.

Por último, se colocó 1 mL de la solución "stock" del antibiótico en un tubo conteniendo 1 mL de CN y luego se realizaron diluciones seriadas factor 2. Los tubos fueron inoculados con 1 mL de la suspensión bacteriana. Simultáneamente se realizaron controles de esterilidad (CE= CN + antibiótico, sin inocular) y controles de crecimiento (CC= CN inoculado, sin antibiótico). Todos los tubos se mezclaron para homogenizar y se llevaron a incubación a 37°C durante 18-24 hs<sup>35</sup>.

La interpretación de los resultados se realizó de acuerdo a tablas de referencia que proveen los protocolos de *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*<sup>36</sup>.

### II-3.3.3. Prueba de sensibilidad a los antibióticos por difusión en placa

La evaluación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos se realizó mediante el método de difusión en placa descrito por *Kirby-Bauer*<sup>37</sup>. Este es un ensayo esencialmente cualitativo que permite determinar si un microorganismo es sensible, intermedio o resistente a los antimicrobianos ensayados y resulta una técnica muy simple, aplicable a microorganismos de crecimiento rápido<sup>38</sup>. Un cultivo ON fue realizado para cada una de las cepas. Para ajustar la concentración de cada cepa, se realizaron diluciones decimales seriadas en tubos conteniendo CN, posteriormente se sembró un volumen conocido en la superficie de las placas con AN. Estas placas se incubaron a 37 °C durante 24 hs. Al cabo de ese tiempo se procedió al recuento de colonias, con el objetivo de ajustar la suspensión a una concentración correspondiente a  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL (0.5 de la escala de turbidez de Mc Farland)<sup>39</sup>.

Las suspensiones obtenidas se sembraron con hisopos estériles sobre placas conteniendo AMH, realizando estrías en todas las direcciones con el fin de cubrirlas completamente.

Los antimicrobianos fueron ensayados a diferentes concentraciones, disueltos en solución reguladora de pH 7,4. Los discos embebidos con 10 µl de los antibióticos a distintas concentraciones se depositaron en condiciones de esterilidad sobre placas de 100 mm usando una pinza metálica, se distribuyeron a razón de 5 discos por placa con una distancia de 24 mm desde el centro de un disco al centro de otro vecino y se presionaron para asegurar el completo contacto con la superficie del agar. Las placas se incubaron invertidas en estufa a 37 °C por 24 hs.

Durante la incubación el agente antimicrobiano difunde por el agar desde los discos formando los *halos de inhibición*. Este fenómeno se debe a que los discos absorben agua del medio, el fármaco se disuelve y difunde a través del agar formando un gradiente de concentración alrededor del disco, simultáneamente los microorganismos se multiplican formando un crecimiento confluyente hasta la zona donde la concentración del antibiótico inhibe el desarrollo de los mismos<sup>38</sup>.

Por último se midieron los radios de los halos desde el centro del disco hasta el borde de inhibición con regla graduada al mm. En general, mientras mayor sea el radio del halo, más sensible es el microorganismo a la concentración del antibiótico que se prueba<sup>33</sup>.

Se usó la cepa *S. aureus* ATCC 25923 como cepa de referencia para control de calidad de los medios, esterilidad de los discos y metodología empleada. Esta cepa ya ha sido previamente utilizada como cepa de referencia en similares ensayos microbiológicos<sup>40,41</sup>.

Cada muestra se analizó por duplicado y se estableció gráficamente la concentración a la cual los microorganismos presentan sensibilidad a los antibióticos.

#### II-3.3.4. Prueba de sensibilidad a los antibióticos Fotodegradados

##### a. *Por modificación del tamaño del halo de inhibición*

La evaluación de los cambios en las propiedades antibióticas en función de la fotodegradación se evaluó a diferentes tiempos de irradiación fotosensibilizada, empleando una modificación de la técnica de *Kirby-Bauer*<sup>37</sup> en la cual se reemplazaron los discos con diferentes concentraciones de antibióticos por discos, con concentración constante del mismo, a diferentes tiempos de fotólisis.

La actividad bactericida de los antibióticos en solución irradiada con luz visible en presencia de RB, fue evaluada a pH 7,4 midiendo el radio del halo de inhibición antes y después de la fotólisis.

De la solución irradiada de los antibióticos a la concentración a la cual los microorganismos resultan sensibles, se tomaron alícuotas fotolizadas a distintos tiempos con las cuales se impregnaron discos estériles. Estos fueron colocados en placas con AMH previamente hisopadas con una concentración aproximada de 10<sup>8</sup> UFC/mL de las diferentes cepas de *S. aureus* DM1, DM2 y ATCC 25923. Las placas fueron luego llevadas a estufa a 37 °C durante 24 hs. Al cabo de ese tiempo se midió el

radio del halo de inhibición y se evaluó la actividad antimicrobiana de los antibióticos en función del tiempo de irradiación.

*b. Por recuento de viables*

A partir de un cultivo ON se realizó una suspensión del microorganismo en CN colocando 20  $\mu\text{L}$  del cultivo ON en 50 ml de CN estéril ( $3 \times 10^5$  UFC/mL). Alícuotas de la suspensión fueron colocadas en tubos estériles, a los cuales se les agregó antibiótico-RB, a una dada concentración, antes de la fotólisis y después de un determinado tiempo de fotólisis. Simultáneamente, uno de los tubos se mantuvo sin el agregado de antibiótico, como control de crecimiento.

Todos los tubos fueron incubados en agitación a  $37^\circ\text{C}$  durante 6 horas aproximadamente.

Luego de la incubación se realizaron diluciones seriadas factor 10 de cada tubo y 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las mismas fueron sembrados en placas de AN con espátula de Drigalski. Las placas fueron incubadas en estufa a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 hs.

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el recuento de colonias.

Este método de recuento se basa en que cada bacteria crece y se divide para producir una única colonia, como estrictamente esto no es cierto, para reflejar la realidad, el recuento de viables se expresa como unidades formadoras de colonias por mL<sup>33</sup> (UFC/mL) y se calcula de la siguiente manera:

$$UFC/mL = X_{prom} \cdot Factor\ dilución \cdot Factor\ alícuota \quad (14)$$

Donde  $X_{prom}$  es el promedio del número de colonias contadas en ensayos por triplicado. El valor de UFC/mL obtenido puede ser interpretado como la cantidad de microorganismos vivos presentes en el medio.

## II-4. REFERENCIAS

---

1. Handbook of Chemistry and Physics. West R. (Ed), CRC, Boca Ratón, Florida (1981)
2. Nonell S. L., Moncayo F., Trull F., Amat-Guerri F., Lissi E., Soltermann A, T. Solvent influence on the kinetics of the photodynamic degradation of Trolox, a water-soluble model compound for vitamin E. *J Photochemistry and Photobiology B: Biology* (1995) 29:157.
3. Rodgers M. A. J., Snowden P. T. Lifetime of O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δg) in liquid water as determined by time-resolved infrared luminescence measurements. *J. American Chemical Society* (1982) 104:5541.
4. Miskoski S., García N. A. Dark and photoinduced interactions between riboflavin and indole auxins. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* (1991) 56:1838.
5. Bertolotti S. G., Arguello G. A., García, N. A. Effect of the peptide bond on the singlet molecular oxygen mediated photooxidation of tyrosine and tryptophan dipeptides. A kinetic study. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* (1991) 10:57.
6. Posadaz A. Estudio cinético de procesos fotosensibilizados, mediados por oxígeno singlete, en derivados de aminoácidos, péptidos y proteínas. *Tesis doctoral en Ciencias químicas* (2006)
7. Criado S. N. Fotooxidaciones sensibilizadas de compuestos de importancia biológica. *Tesis doctoral en Ciencias Químicas* (1997)
8. Schweitzer C., Schmidt R. Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chemical Reviews* (2003) 103:1685.
9. Miskoski S. Fotooxidaciones sensibilizadas de compuestos de importancia biológica: Tetraciclinas y hormonas tiroideas. *Tesis doctoral en Ciencias Químicas* (2004)
10. Barbieri Y., Massad W., Diaz D., Sanz J., Amat-Guerri F., García N. A. Photodegradation of bisphenol A and related compounds under natural-like conditions in the presence of Riboflavin: Kinetics, Mechanism and Photoproducts. *Chemosphere* (2008) 73:564.
11. Díaz M., Luiz M., Alegretti P., Furlong J., Amat-Guerri F., Massad W., Criado S., García N. A. Visible-light-mediated photodegradation of 17β-estradiol: Kinetics, Mechanism and Photoproducts. *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (2009) 202:221.
12. Schuman Jorns M., Schollhammer G., Hemmerich P. Intramolecular addition of the riboflavin side chain. Anion-catalysed neutral photochemistry. *European Journal of Biochemistry* (1975) 57:35.
13. Ahmad I., Fasihullah Q., Noor A., Ansari I. A., Ali Q. N. M. Photolysis of riboflavin in aqueous solution: a kinetic study. *International Journal of Pharmaceutics* (2004) 280:199.
14. Wayne C. E., Wayne R. P. Photochemistry. Oxford University Press, Oxford (1996)
15. O'Connor D. V., Philips D. Time-Correlated Single Photon Counting. Academic Press Inc., London (1984)
16. Valeur B. Molecular Fluorescence. Principles and Applications. Weinheim, Federal Republic of Germany (2002)

17. Lakowicz J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition, Springer, USA (2006)
18. Montejano H. A., Gervaldo M., Bertolotti S. G. The excited states quenching of resazurin and resorufin by p-benzoquinones in polar solvents. *Dyes and Pigment* (2005) 64:117.
19. Broglia M. F., Bertolotti S. G., Previtali C. M. Proton and Electron Transfer in the Excited State Quenching of Phenosafranin by Aliphatic Amines. *Photochemistry and Photobiology* (2007) 83:535.
20. Barltrop J. A., Coyle J. D. Principles of Photochemistry. John Wiley & Sons, London (1978)
21. Moore W. M., McLearie J., McDaniels J. C., Hen J. A. The photochemistry of Riboflavin – VI. The photophysical properties of isoalloxacin. *Photochemistry and Photobiology* (1977) 25:505.
22. Orellana B., Rufs A.M., Encinas M.V., Previtali C.M., Bertolotti S. The photoinitiation mechanism of vinyl polymerization by Riboflavin/triethanolamine in aqueous medium. *Macromolecules* (1999) 32:6570.
23. Schreiner S., Steiner U., Kramer H. E. A. Determination of the pk values of the Lumiflavin triplet state by Flash Photolysis. *Photochemistry and Photobiology* (1975) 21:81.
24. Encinas M.V., Rufs A.M., Bertolotti S., Previtali C.M. Free radical polymerization photoinitiated by riboflavin/amines. Effect of the amine structure. *Macromolecules* (2001) 34:2845.
25. Wilkinson F., Brummer J. G. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *J. Physical and Chemical Reference Data* (1981) 10:809.
26. Wilkinson F., Helman W., Ross A. B. Rate constants for the decay of the lowest electronically excited singlet state molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *J. Physical and Chemical Reference Data* (1995) 24:663.
27. Zang P. G., Misra H. P. EPR kinetic studies of superoxide radicals generated during the autoxidation of 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium, a bioactivated intermediate of parkinsonian-inducing neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Biological Chemistry* (1992) 267:23601.
28. Tratnyek P. G., Hoigné J. Oxidation of substituted phenols in the environment. A QSAR analysis of rate constants for reactions with singlet oxygen. *J. Environmental Science and Technology* (1991) 25:1596.
29. Silva E., Ugarte R., Andrade A., Edwards A. M. Riboflavin-sensitized photoprocesses of tryptophan. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* (1994) 23:43.
30. Iuliano L., Pratico D., Ghiselli A., Bonavita M. S., Violi F. Reaction of dipyridamole with hydroxyl radical. *Lipids* (1992) 27:349.
31. Neckers D. C. Rose Bengal. Review. *J Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (1989) 47:1.

- 
32. Theodossiou T., Hothersall J. S., Woods E. A., Okkenhaug K., Jacoson J., Mac Robert A. Firefly Luciferin-activated Rose Bengal In Vitro Photodynamic Therapy by Intracellular Chemiluminescence in Transgenic NIH 3T3 Cells. *J. Cancer Research* (2003) 63:1818.
  33. Tortora J., Funke B., Case C. Introducción a la microbiología. Novena Edición, Editorial Médica Panamericana, Bs. As., Argentina (2007)
  34. Andrews J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrobial Chemotherapy* (2001) 48:5.
  35. Finelgold S., Baron E. J. Diagnóstico microbiológico. Séptima Edición, Editorial Médica Panamericana, Bs. As., Argentina (1992)
  36. CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first informational supplement. M100-S21. (2011)
  37. Bauer A. W., Kirby M. M., Sherris J. C., Turck M. Antibiotic susceptibility-testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* (1996) 45:493.
  38. Basualdo J. A., Coto C. E., Torres R. A. Microbiología Médica: Bacteriología-Micología-Virología-Parasitología-Inmunología. Segunda Edición, Editorial Atlante, Bs. As., Argentina (2006)
  39. Win W., Alle S., Janda W., Koneman E. W., Procop G., Sckreckenberger P., Woods G. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Sixth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, USA (2006)
  40. Massidda O., Mingoia M., Fadda D., Whalen M. B., Montanari M. P., Varaldo P. E. Analysis of the  $\beta$  lactamase plasmid of borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: Focus on *bla* complex genes and cadmium resistance determinants *cadD* and *cadX*. *Plasmid* (2006) 55:114.
  41. Pesavento G., Ducci B., Comodo N., Lo Nostro A. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Food Control* (2007) 18:196.



## CAPÍTULO III. ANTECEDENTES DE LA FOTODEGRADACIÓN DE ANTIBIÓTICOS

La investigación acerca de los procesos de degradación de antibióticos ha tomado gran interés en los últimos años. Este hecho está asociado a que se ha reconocido a estos compuestos como una nueva e importante clase de contaminantes orgánicos debido a su persistencia y bioacumulación en el ambiente, provocando gran variedad de efectos negativos en ecosistemas acuáticos y terrestres, aún en muy bajas concentraciones<sup>1- 6</sup>.

El uso de antibióticos se ha extendido no solo al tratamiento de enfermedades infecciosas en humanos sino que también se los utiliza en ganadería, agricultura y acuicultura<sup>7,8</sup>. A este hecho se le suma que generalmente son eliminados de los organismos, a través de la orina y las heces, sin sufrir modificaciones metabólicas, es decir tal cual como fueron administrados, desembocando así en los sistemas acuáticos y siendo capaces de entrar en plantas de tratamiento de aguas residuales<sup>9,10</sup>. Dada su alta solubilidad en agua y baja biodegradabilidad, desafortunadamente estas sustancias no son eliminadas eficazmente por los procesos convencionales en plantas de tratamiento y pueden finalmente terminar en aguas naturales de ríos, lagos y embalses e incluso en aguas de consumo<sup>11,12,13</sup>.

Los efectos adversos que genera su presencia en el medio ambiente incluyen tanto la alteración de la vida acuática como el desarrollo de resistencia a antibióticos por diversas poblaciones de bacterias, generando un aumento en la posibilidad de infecciones así como la necesidad de crear fármacos nuevos y más potentes<sup>14,15</sup>.

Dentro de este grupo de compuestos, los antibióticos  $\beta$  lactámicos quizás sean los más importantes contaminantes acuáticos por su excesivo uso en medicina humana y veterinaria a lo largo de los años, su alta estabilidad química y su baja o nula biodegradabilidad<sup>16,17,18</sup>.

Por esta razón la búsqueda de nuevos métodos alternativos para evitar la contaminación del agua por la presencia de esta clase de antibióticos se vuelve necesaria, considerando los riesgos que representan para la salud humana y el ambiente.

Se sabe que los principales procesos de eliminación de estos compuestos en aguas superficiales son la biodegradación, la adsorción y la fotodegradación<sup>19</sup>. Los dos primeros presentan complicaciones importantes, gran variedad de antibióticos han

sido diseñados para ser resistentes a la biodegradación y por otro lado se ha demostrado que el tipo de sedimento afecta significativamente el proceso de adsorción transformándose en un mecanismo sitio-específico<sup>20,21</sup>. De esta manera la fotodegradación, mediada por luz solar, se convierte en la metodología más prometedora para este fin.

Además, el hecho de que los antibióticos tienen la capacidad de ser compuestos altamente solubles y no volátiles, los convierte en blancos susceptibles a la fotodegradación en superficies tanto acuáticas como terrestres<sup>22,23</sup>.

Múltiples metodologías de fotodegradación han sido utilizadas para eliminar antibióticos del medio ambiente incluyendo tanto la fotólisis **directa** (absorción directa de luz por parte del compuesto) como **indirecta**, a través de la interacción de los compuestos con especies reactivas de oxígeno, altamente oxidantes<sup>24-27</sup>. Los procesos avanzados de oxidación aparecen como una de las herramientas más estudiadas y con mejores resultados en lo que respecta a la degradación de antibióticos, algunos ejemplos serán mencionados a continuación.

La reacción de Fenton y Foto-Fenton han resultado uno de los procesos más exitosos de fotodegradación (ver consideraciones teóricas sección 2.3.2 del capítulo I) dada su alta eficacia en generar radicales  $\text{OH}^\bullet$  altamente oxidantes, bajo costo y baja demanda energética.

La degradación de los antibióticos  $\beta$  lactámicos amoxicilina y ampicilina ha sido estudiada bajo los efectos de los procesos de Fenton y Foto-Fenton aún en muestras complejas como lo son los efluentes de plantas de tratamientos de aguas<sup>17,28,29,30</sup>. Los autores encontraron que el proceso de Foto-Fenton ofrecía un mayor porcentaje de degradación de los antibióticos estudiados frente al proceso de Fenton<sup>30</sup> debido a que el poder de oxidación en el primer caso se ve aumentado por la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  por acción de la luz siendo este último capaz de reaccionar con  $\text{H}_2\text{O}_2$  estableciéndose un ciclo, además de la generación de radicales  $\text{OH}^\bullet$  adicionales. También encontraron dependencia de la velocidad de fotodegradación con la fuente de  $\text{Fe}^{2+}$  utilizada en el proceso de Foto-Fenton<sup>28,30</sup>, reportando los mejores resultados cuando ferrioxalato es utilizado con este fin, debido a su alta absorción en la región UV-V y su elevado rendimiento cuántico<sup>31</sup>.

La degradación de amoxicilina también fue evaluada por otros autores<sup>32</sup> frente a los procesos de fotólisis directa y fotólisis en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  encontrando efectos significativamente incrementados cuando  $\text{H}_2\text{O}_2$  está presente.

La fotocatalisis es uno de los procesos avanzados de oxidación más investigado con el propósito de eliminar contaminantes ambientales. Sus efectos han sido comprobados en la degradación de fármacos<sup>33,34,35</sup>, fungicidas y herbicidas<sup>36,37</sup>, colorantes<sup>38</sup> y otros compuestos<sup>39,40</sup>. La degradación de amoxicilina y ampicilina fue evaluada mediante este proceso tanto con partículas de dióxido de titanio<sup>41</sup> como de óxido de zinc<sup>42</sup> encontrándose excelentes resultados especialmente para la primera en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la segunda a pH alcalino.

Otros mecanismos han sido estudiados con el fin de eliminar antibióticos de ambientes acuáticos, tal es el caso por ejemplo, del proceso de ozonización<sup>43</sup>, encontrándose muy buenos resultados en medio alcalino y en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

También el radical sulfato<sup>44</sup> y el radical hidroxilo<sup>18,45</sup> generados por radiólisis de pulso electrónico y radiólisis gamma han resultado oxidantes potentes, cuyos efectos se han demostrado frente a una gran variedad de antibióticos de las familias de las penicilinas y cefalosporinas incluyendo amoxicilina, ampicilina, cefalexina y cefotaxima.

Tratamientos más complejos se han estudiado, por ejemplo para cefalexina, por oxidación anódica, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> electro-generado y electro-Fenton lográndose alta eficacia en la degradación del mismo<sup>46</sup>.

La acción de especies reactivas de oxígeno, generadas a partir de procesos de fotooxidación sensibilizada por colorantes, sobre sustratos de relevancia en fotobiología y fotomedicina, es un tema de interés creciente en los últimos años<sup>47,48</sup>. Este proceso, que solo requiere la presencia conjunta de oxígeno, luz y un componente capaz de absorber esa luz, como se explicó en el capítulo I, se ha investigado para otras familias de antibióticos. Tal es el caso de los antimicrobianos sulfatiazol y succinil sulfatiazol, cuyo mecanismo de fotodegradación en presencia de Riboflavina y Rosa de bengala fueron estudiados por Posadaz *et.al.*<sup>49</sup>, revelando la participación de la especie oxígeno singlete en la oxidación de estos compuestos acompañado de la pérdida de la capacidad bacteriostática de los mismos como consecuencia del proceso degradativo. Por otro lado, para un conjunto de tetraciclinas, fue investigada<sup>50</sup> la fotodegradación en presencia del sensibilizador Riboflavina evidenciando que tanto anión superóxido como oxígeno singlete son responsables de la fotooxidación y como consecuencia de la misma también pierden su actividad antimicrobiana.

En este contexto se decidió abordar el estudio mecanístico y cinético del proceso de **fotodegradación sensibilizada** por colorantes artificiales y naturales sobre antibióticos de la familia de los β lactámicos ya que consideramos que el conocimiento acerca de las

vías de fotodegradación y la velocidad de las mismas son esenciales para predecir el comportamiento de estos compuestos en ambientes naturales y potencialmente pueden constituir un mecanismo que contribuya a la disminución de los mismos y por lo tanto la prevención de los múltiples efectos negativos que su presencia genera.

### III-REFERENCIAS

1. Halling-Sorensen B., Nielsen S. N., Lanzky P. F., Ingerslev F., Lutzhoft H. C. H., Jorgensen S. E. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review. *Chemosphere* (1998) 36:357.
2. Kummerer K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review. *Chemosphere* (2001) 45:957.
3. Heberer T. Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters* (2002) 131:5.
4. Boreen A. L., Arnold W. A., Mcneill K. Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: a review. *Aquatic Sciences* (2003) 65:320.
5. Bound J. P., Voulvoulis N. Pharmaceuticals in the aquatic environment—a comparison of risk assessment strategies. *Chemosphere* (2004) 56:1143.
6. Thiele-Bruhn S., Peters D. Photodegradation of pharmaceutical antibiotics on slurry and soil surfaces. *Landbauforschung Völkenrode* (2007) 57:13.
7. Lalumera G. M., Calamari D., Galli P., Castiglioni S., Crosa R., Fanelli R. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere* (2004) 54:661.
8. Cabello F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* (2006) 8:1137.
9. Calamari D., Zuccato E., Castiglioni S., Bagnati R., Fanelli R. Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in northern Italy. *Environmental Science and Technology* (2003) 37:1241.
10. Rizzo L., Meric S., Guida M., Kassinos D., Belgiorno V. Heterogenous photocatalytic degradation kinetics and detoxification of an urban wastewater treatment plant effluent contaminated with pharmaceuticals. *Water Research* (2009) 43:4070.
11. Snyder Shane A., Westerhoff P. Y., Yeomin Sedlak D. L. Pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disruptors in water: implications for the water industry. *J. Environmental Engineering Science* (2003) 5:449.
12. Grujic S., Vasiljevic T., Lausevic M. Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry. *J. Chromatography A* (2009) 25:4989.
13. Andreozzi R., Marotta R., Paxeus N. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* (2003) 50:1319.
14. Andreozzi R., Caprio V., Ciniglia C., Champdore M., Giudice R., Marotta R., Zuccato E. Antibiotics in the environment: occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin. *Environmental Science and Technology* (2004) 38:6832.

- 
15. Miranda C. D., Zemelman R. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture* (2002) 212:31.
  16. Bailón-Pérez M. I., García-Campaña A. M., Cruces-Blanco C., del Olmo Iruela M. Trace determination of [beta]-lactam antibiotics in environmental aqueous samples using off-line and on-line preconcentration in capillary electrophoresis. *J. Chromatography A* (2008) 1185:273.
  17. Rozas O., Contreras D., Mondaca M. A., Pérez-Moya M., Mansilla H. D. Experimental design of Fenton and photo-Fenton reactions for the treatment of ampicillin solutions. *J. Hazardous Materials* (2010) 177:1025.
  18. Dail M. K., Mezyk S. P. Hydroxyl-Radical-Induced Degradative Oxidation of  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Water: Absolute Rate Constant Measurements. *J. Physical Chemistry A* (2010) 114:8391.
  19. Zwiener C. Occurrence and analysis of pharmaceuticals and their transformation products in drinking water treatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2007) 387:1159.
  20. Khetan S. K., Collins T. J. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to green chemistry. *Chemical Reviews* (2007) 107:2319.
  21. Scheytt T., Mersmann P., Lindstadt R., Heberer T. Determination of sorption coefficients of pharmaceutically active substances Carbamazepine, Diclofenac, and Ibuprofen, in sandy sediments. *Chemosphere* (2005) 60:245.
  22. Miller G. C., Donaldson S. G. Factors affecting photolysis of organic compounds on soils. Eds. Helz G. R., Zepp R. G., Currier R. W. *Aquatic and Surface Photochemistry*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL (1994)
  23. Thiele-Bruhn S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils -a review. *J. Plant Nutrition and Soil Science* (2003) 166:145.
  24. Liu Q. T., Williams H. E. Kinetics and degradation products for direct photolysis of  $\beta$ -Blockers in water. *Environmental Science and Technology* (2007) 41:803.
  25. Vaughan P. P., Blough N. V. Photochemical formation of hydroxyl radical by constituents of natural waters. *Environmental Science and Technology* (1998) 32:2947.
  26. Haag W. R., Hoigne J. Singlet oxygen in surface waters. Photochemical formation and steady-state concentrations in various types of waters. *Environmental Science and Technology* (1986) 20:341.
  27. Cory R. M., Cotner J. B., McNeill K. Quantifying interactions between singlet oxygen and aquatic fulvic acids. *Environmental Science and Technology* (2009) 43:718.
  28. Trovó A. G., Santos Melon S. A., Fernandes Pupo Nogueira R. Photodegradation of the pharmaceuticals amoxicillin, bezafibrate and paracetamol by the photo-Fenton process— Application to sewage treatment plant effluent. *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (2008) 198:215.

- 
29. Elmolla E. S., Chaudhuri M. Degradation of the antibiotics amoxicillin, ampicillin and cloxacillin in aqueous solution by the photo-Fenton process. *J. Hazardous Materials* (2009) 172:1476.
  30. Trovó A. G., Fernandes Pupo Nogueira R., Aguera A., Fernandez-Alba A. R., Malato S. Degradation of the antibiotic amoxicillin by photo-Fenton process e Chemical and toxicological assessment. *Water Research* (2011) 45:1394.
  31. Hatchard C. G., Parker C. A. A New Sensitive Chemical Actinometer. II. Potassium Ferrioxalate as a Standard Chemical Actinometer. *Proc. R. Soc. Lond. A* (1956) 235:518.
  32. Yeon J. J., Kim W. G., Yoon Y., Kang J. W., Hong Y. M., Kim H. W. Removal of amoxicillin by UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes. *Science of the Total Environment* (2012) 420:160.
  33. Sioi M., Bolosis A., Kostopoulou E., Poullos I. Photocatalytic treatment of colored wastewater from medical laboratories: Photocatalytic oxidation of hematoxylin. *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (2006) 184:18.
  34. Abellán M. N., Bayarri B., Giménez J., Costa J. Photocatalytic degradation of sulfamethoxazole in aqueous suspension of TiO<sub>2</sub>. *Applied Catalysis B: Environmental* (2007) 74:233.
  35. Yang L., Yu L. E., Ray M. B. Degradation of paracetamol in aqueous solutions by TiO<sub>2</sub> photocatalysis. *Water Research* (2008) 42:3480.
  36. Khodja A. A., Sehili T., Pilichowski J. F., Boule P. Photocatalytic degradation of 2-phenylphenol on TiO<sub>2</sub> and ZnO in aqueous suspensions. *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (2001) 141:231.
  37. Haque M. M., Muneer M. Heterogeneous photocatalysed degradation of a herbicide derivative, isoproturon in aqueous suspension of titanium dioxide. *J. Environmental Management* (2003) 69:169.
  38. Essam T., Amin M. A., El Tayeb O., Mattiasson B., Guieysse B. Sequential photochemical–biological degradation of chlorophenols. *Chemosphere* (2007) 66:2201.
  39. Lathasree S., Nageswara R., Sivasankar B., Sadasivam V., Rengaraj K. Heterogeneous photocatalytic mineralization of phenols in aqueous solutions. *J. Molecular Catalysis A: Chemical* (2004) 223:101.
  40. Kansal S. K., Singh M., Sud D. Studies on TiO<sub>2</sub>/ZnO photocatalysed degradation of Lignin. *J. Hazardous Materials* (2007) 153:412.
  41. Elmolla E. S., Chaudhuri M. Photocatalytic degradation of amoxicillin, ampicillin and cloxacillin antibiotics in aqueous solution using UV/TiO<sub>2</sub> and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> photocatalysis. *Desalination* (2010) 252:46.

- 
42. Elmolla E. S., Chaudhuri M. Degradation of amoxicillin, ampicillin and cloxacillin antibiotics in aqueous solution by the UV/ZnO photocatalytic process. *J. Hazardous Materials* (2010) 173:445.
43. Andreozzi R., Canterino M., Marotta R., Paxeus N. Antibiotic removal from wastewaters: The ozonation of amoxicillin. *J. Hazardous Materials* (2005) 122:243.
44. Rickman K. A., Mezyk S. P. Kinetics and mechanisms of sulfate radical oxidation of  $\beta$ -lactam antibiotics in water. *Chemosphere* (2010) 81:359.
45. Song W., Chen W., Cooper W. J., Greaves J., Miller G. E. Free-Radical Destruction of  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Aqueous Solution. *J. Physical Chemistry A* (2008) 112:7411.
46. Ledezma Estrada A., Li Y. Y., Wang A. Biodegradability enhancement of wastewater containing cefalexin by means of the electro-Fenton oxidation process. *J. Hazardous Materials* (2012) 227:41.
47. García N. A., Criado S. N., Massad W. A. Riboflavin as a visible-light-sensitizer in aerobic photodegradation of ophthalmic and sympathomimetic drugs in: Comprehensive Series in Photosciences. Flavins: Photochemistry and Photobiology. Silva E., Edwards A. M. (Eds). *The Royal Society of Chemistry* (2006) 176:61.
48. Díaz M., Luiz M., Bertolotti S., Miskoski S., García N. A. Scavenging of photogenerated singlet molecular oxygen and superoxide radical anion by sulphur drugs. Kinetics and Mechanism. *J. Chemistry* (2004) 82:1752.
49. Posadaz A., Sánchez E., Gutiérrez M. I., Calderón M., Bertolotti S., Biasutti M. A., García N. A. Riboflavin and Rose bengal sensitized photooxidation of sulphathiazole and succinylsulphathiazole. Kinetic study and microbiological implications. *Dyes and Pigments* (2000) 45:219
50. Castillo C., Criado S., Díaz M., García N. A. Riboflavin as a sensitizer in the photodegradation of tetracyclines. Kinetics, mechanism and microbiological implications. *Dyes and Pigments* (2007) 72:178.



# CAPÍTULO IV. FOTODEGRADACIÓN SENSIBILIZADA DE ANTIBIÓTICOS EN PRESENCIA DE RB Y PN

## IV-1. RESULTADOS

### IV-1.1. *Características de los sensibilizadores empleados*

Dos sensibilizadores fueron utilizados en la primer etapa de este trabajo de Tesis: Rosa de bengala (RB), un colorante xanténico artificial<sup>1</sup> el cual resulta uno de los fotosensibilizadores mas empleados en experimentos fotodinámicos en general<sup>2,3,4</sup>; y Perinaftenona (PN) un fotosensibilizador generador exclusivo de la especie reactiva de oxígeno, oxígeno singlete ( $O_2 (^1\Delta_g)$ ). Ambos producen  $O_2 (^1\Delta_g)$  con rendimientos cuánticos en agua de 0,7 y 1 para RB<sup>2,5</sup> y PN<sup>6,7</sup>. En particular, para RB se ha reportado también<sup>2,8,9</sup> un rendimiento cuántico de 0,2 para la generación de anión radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ).

A continuación se presentan los espectros de absorción normalizados de ambos sensibilizadores en solución reguladora a diferentes valores de pH. Las estructuras químicas de los mismos se incluyen en el apéndice I del capítulo VIII.

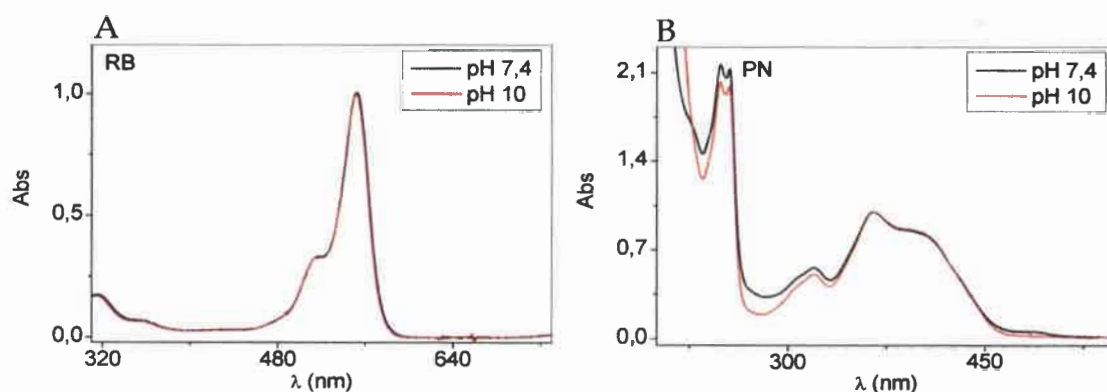


Figura IV.1. Espectros de absorción normalizados de los sensibilizadores (A) RB y (B) PN a pH 7,4 y 10.

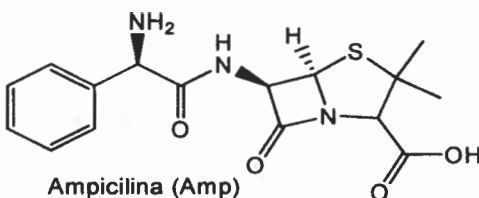
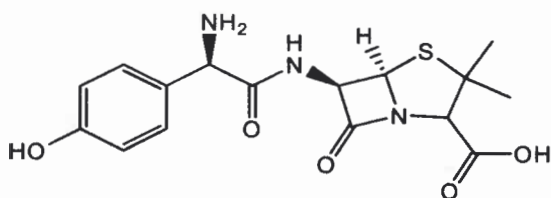
RB presenta una única banda en la región visible del espectro con un máximo a 549 nm (Figura IV.1 A). En los valores de pH de trabajo, este colorante se encuentra en su forma neutra ya que tiene un valor de pKa en agua de 3,72. A pH por debajo del pKa, se forma la especie protonada de RB la cual es incolora<sup>10</sup> por lo que no absorbe en la región de interés de este trabajo.

En la Figura IV.1 B se muestra el espectro de absorción de PN a los dos pH de estudio con un máximo en la región visible a 365 nm, este sensibilizador, almacenado en oscuridad, es químicamente estable a ambos valores de pH lo cual fue controlado hasta 2 horas después de preparadas las soluciones, al igual que para RB.

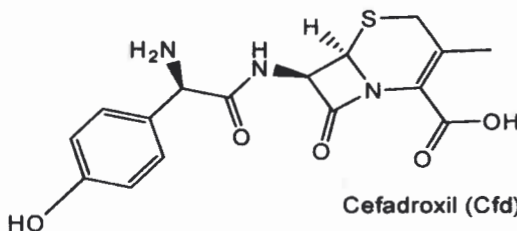
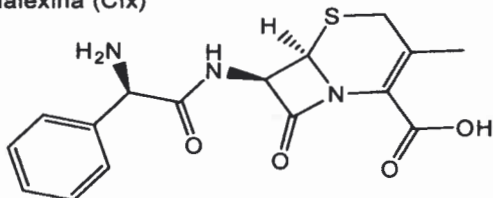
IV-1.2. Características de los compuestos estudiados

A continuación se muestran las estructuras químicas de los antibióticos (Atb) estudiados.

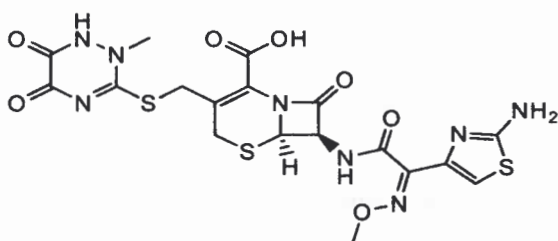
Amoxicilina (Amx)



Cefalexina (Cfx)



Ceftriaxona (Cft)



Cefotaxima (Ctx)

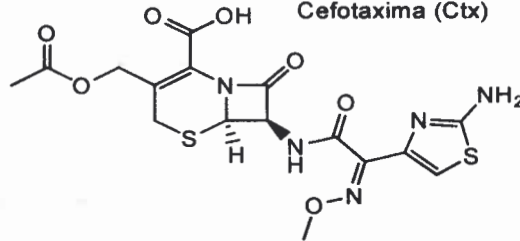
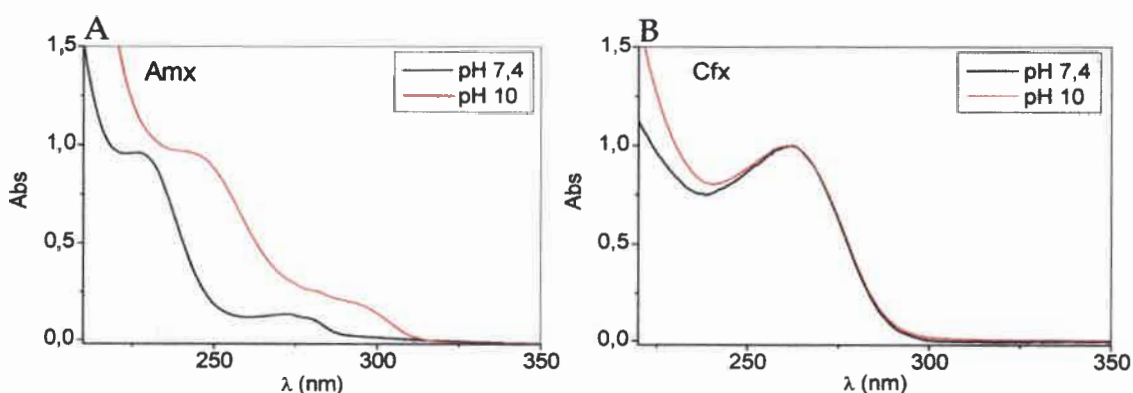


Figura IV.2. Estructuras químicas de los sustratos estudiados.

Como se puede observar a partir de las estructuras químicas, todos los compuestos poseen el anillo  $\beta$  lactámico tetragonal característico de este grupo de Atb. En el caso de Amx y Amp, dicho grupo está unido a un anillo pentagonal de tiazolidina, constituyendo un núcleo denominado "6 amino penicilánico" presente en todos los Atb de la familia de las penicilinas<sup>11</sup>. Particularmente Amx posee una cadena lateral, unida por enlace peptídico al núcleo, constituida por un grupo amino y un grupo fenol, mientras que Amp solo presenta un grupo amino en la cadena lateral.

Los otros cuatro Atb también presentan el anillo  $\beta$  lactámico característico, a diferencia que este se encuentra unido a un anillo hexagonal de dihidrotiazina conformando un núcleo denominado "7 amino cefalosporámico" presente en todos los Atb  $\beta$  lactámicos de la familia de las cefalosporinas<sup>11</sup>. Cfx y Cfd se diferencian en que el primero posee en su cadena lateral un grupo amino, mientras que Cfd además, presenta un grupo fenol. Cft y Ctx son cefalosporinas que poseen grupos metoxiiminos en cadenas laterales complejas.

En las Figuras IV.3 y IV.4 se muestran los espectros de absorción normalizados a la longitud de onda del máximo, obtenidos para los sustratos seleccionados en este trabajo de Tesis a pH 7,4 y 10 con el propósito de investigar la influencia de esta variable sobre el proceso fotooxidativo. El pH 7,4 fue especialmente seleccionado dado que corresponde al valor fisiológico.



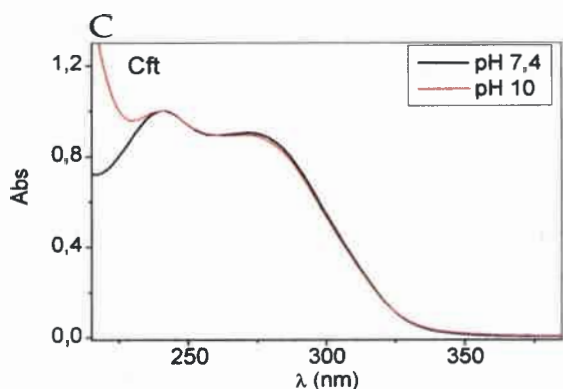


Figura IV.3. Espectros de absorción normalizados de (A) Amx, (B) Cfx y (C) Cft a pH=7,4 y 10.

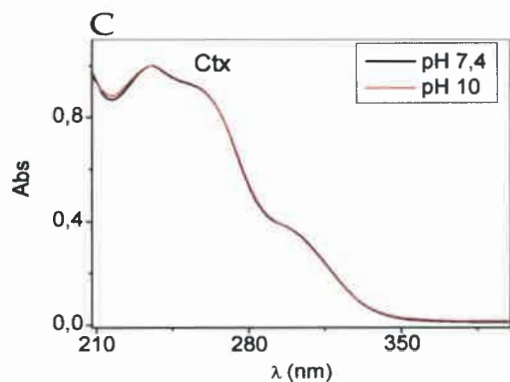
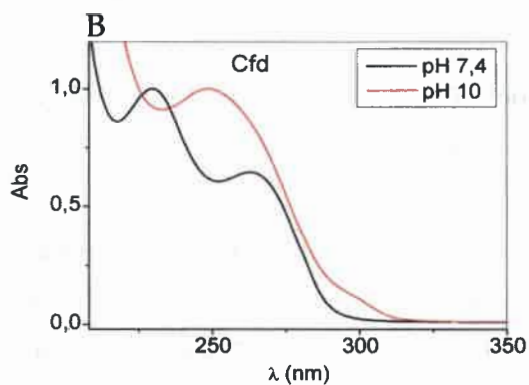
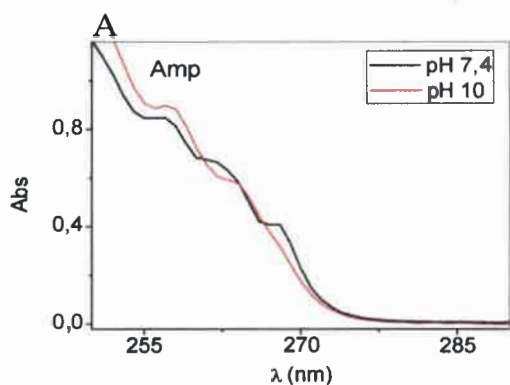


Figura IV.4. Espectros de absorción normalizados de (A) Amp, (B) Cfd y (C) Ctx a pH=7,4 y 10.

Los valores de pKa de los Atb se obtuvieron de bibliografía. Para Amx se reportan tres valores<sup>12,13</sup> de pKa siendo estos 2,4; 7,4; y 9,6. A pH < 2,4 predomina la especie protonada, a 2,4 < pH < 7,4 la especie sin carga neta (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>; COO<sup>-</sup>) y a pH > 9,6 predomina la especie aniónica. Espectrofotométricamente se pueden distinguir las

especies sin carga neta (observable a pH 7,4) de la especie aniónica, la cual se observa a pH 10 (**Figura IV.3 A**).

Para Cfx se han reportado<sup>14</sup> valores de pKa de 2,5 y 7,3 de manera que en los pH estudiados predomina la especie sin carga neta.

Para el caso de Cft los valores de pKa informados son: 3 (COOH), 3,2 (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) y 4,1 (OH)<sup>15,16</sup> por lo que tanto a pH 7,4 como a pH 10 existe el predominio de una única especie, la aniónica.

En cuanto a Amp los valores de pKa reportados son: 2,96 (COOH) y 7,22 (NH<sub>2</sub>)<sup>17</sup>. A pH 7,4 existe una mezcla con diferente proporción de las especies protonada y neutra mientras que a pH 10 predomina la especie neutra.

Cfd presenta tres valores de pKa: 2,64 (COOH), 7,31 (NH<sub>2</sub>) y 9,69 (OH)<sup>12</sup>. A pH 7,4 abunda la especie protonada y existe una pequeña proporción de la especie neutra, mientras que a pH 10 predomina la especie aniónica, la cual puede diferenciarse espectrofotométricamente de la especie a pH 7,4 (**Figura IV.4 B**). A los valores de pH estudiados, para Ctx, cuyos valores de pKa reportados<sup>12</sup> son 2,1; 3,4 y 10,9 predomina la especie aniónica.

Los coeficientes de absorción molar ( $\epsilon$ ) de los Atb fueron determinados experimentalmente en solución acuosa de buffer fosfatos a pH 7,4 y 10; los resultados obtenidos se incluyen en la **Tabla IV.1**. En la **Figura IV.5** se muestra un ejemplo de la determinación de dicho coeficiente por la ley de Lambert -Beer<sup>18</sup> para Cft a pH 7,4. En primer lugar se registraron los espectros de absorción a concentración creciente del Atb y luego se gráfico la absorbancia a la longitud de onda máxima de absorción en función de la concentración de Atb. De la pendiente de la recta obtenida es posible determinar  $\epsilon$ .

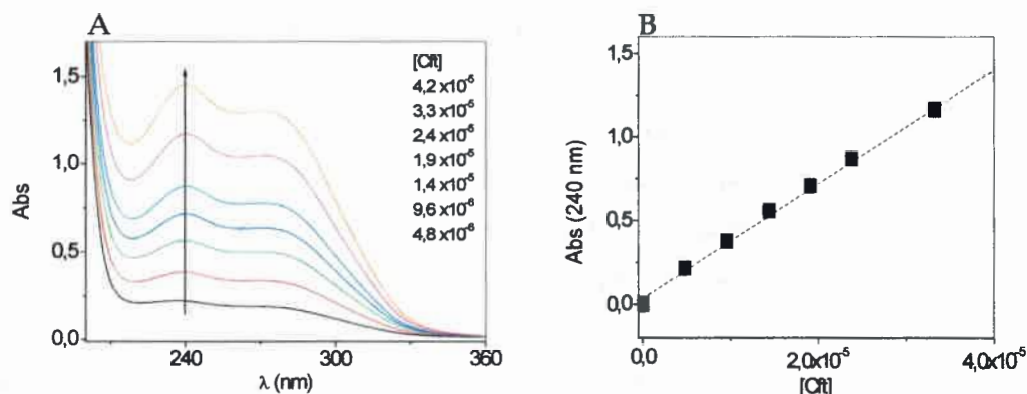


Figura IV.5. (A) Espectros de absorción de Cft a pH 7,4 en función de la concentración molar; (B) Absorbancia a 240 nm en función de la concentración molar de Cft.

Tabla IV.1. Coeficientes de absorción molar ( $\epsilon$ ) de los Atb en buffer fosfato de pH 7,4 y 10.

$\epsilon$ M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> a pH 7,4		$\epsilon$ M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> a pH 10	
Amx 230 nm	8391	Amx 240 nm	6447
270 nm	1111		
Cfx 260 nm	7813	Cfx 260 nm	7380
Cft 240 nm	34162	Cft 240 nm	34624
Amp 257 nm	302	Amp 257 nm	304
Cfd 230 nm	12932	Cfd 248 nm	13536
263 nm	8305		
Ctx 235 nm	18850	Ctx 235 nm	16164

IV-1.3. Fotodegradación sensibilizada de los antibióticos en presencia de RB ó PN

La irradiación fotosensibilizada de soluciones acuosas equilibradas con aire de los Atb en presencia de RB ( $Abs^{549}=0,5$ ) ó PN ( $Abs^{365}=0,5$ ) en algunos casos produce claras modificaciones en los espectros de absorción de los Atb, mientras que no se observan cambios en el espectro UV-V de los sensibilizadores.

Para ciertos Atb, como ocurre para Cft/PN a pH 10 se observa disminución de la bandas de absorción a medida que aumenta el tiempo de irradiación (Figura IV.6 A). Para el caso de Amx/RB a pH 10 y Ctx/PN pH 7,4 (Figura IV.6 B y C) se presenta un aumento de la absorbancia a medida que aumenta el tiempo de fotólisis, posiblemente

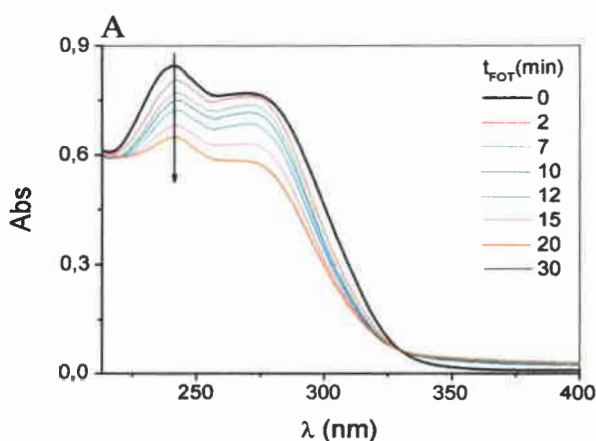
esto se deba a la absorción de los productos de reacción en la misma región espectral donde absorben los Atb. Además también se observa un punto isobéptico para Amx a 263 nm y para Ctx a 288 nm aproximadamente, indicando la presencia de especies en equilibrio.

En Amx/RB a pH 7,4 no se observaron cambios apreciables en los espectros de absorción, posiblemente debido a que la disminución de la banda como consecuencia de la fotólisis esté compensada por el aumento, en la misma zona, que produce la absorción de los fotoproductos (Figura IV.6 D).

En general, que se produzcan cambios significativos o no en los espectros de absorción depende tanto de cada sustrato, como del pH del medio y la zona donde absorban los fotoproductos.

Sin embargo, estas modificaciones observadas como consecuencia de la irradiación, aunque en algunos casos puede ser muy pequeña, indica la existencia de transformaciones químicas en los Atb como consecuencia de interacciones entre los mismos y los estados excitados de los sensibilizadores y/o con las EROs generadas a partir de dichos estados.

Cabe aclarar que en la fotoirradiación de las soluciones conteniendo Atb/S no se observaron cambios espectrales cuando las mismas fueron mantenidas en la oscuridad, indicando que no hay asociación entre sustrato y sensibilizador en el estado fundamental.



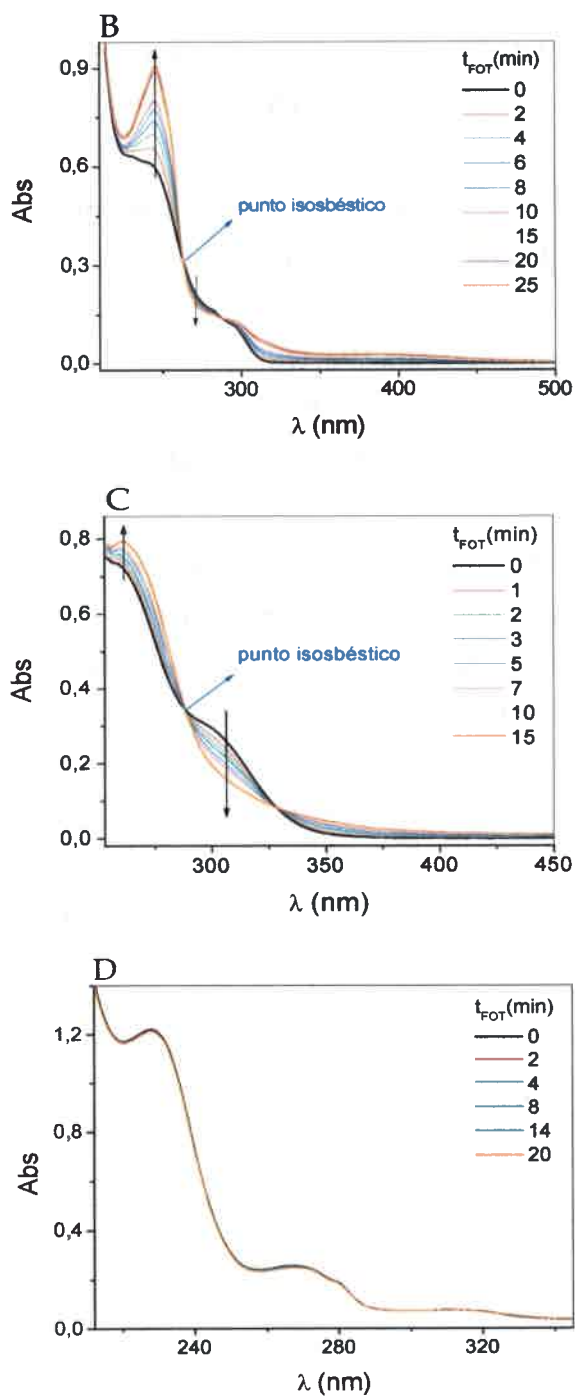


Figura IV.6. Evolución de los espectros de absorción en función del tiempo de fotólisis para (A) Cft vs. PN a pH 10 (B) Amx vs. RB a pH 10 (C) Ctx vs. PN a pH 7,4 y (D) Amx vs. RB a pH 7,4.  $Abs_{RB}^{549} = 0,5$ ;  $Abs_{PN}^{365} = 0,5$ ;  $[Amx] = 1 \times 10^{-4} M$ ;  $[Cft] = 3 \times 10^{-5} M$ ;  $[Ctx] = 5 \times 10^{-5} M$ .



IV-1.4. Determinación de las velocidades relativas de consumo de oxígeno por los antibióticos ( $v_r$ ).

La cinética de fotooxidación sensibilizada de los antibióticos se siguió a través del consumo de oxígeno en condiciones aeróbicas de fotorradiación utilizando el electrodo específico de oxígeno descrito en la sección 2.2.1 del capítulo II.

En las Figuras IV.7 y IV.8 se muestran los gráficos de consumo de oxígeno vs. tiempo de irradiación por los Atb obtenidos a pH 7,4 y 10 en presencia de RB ó PN como sensibilizador.

De dichos gráficos, las pendientes iniciales fueron determinadas con el propósito de evaluar la velocidad de consumo de oxígeno bajo fotodegradación sensibilizada. Los resultados se expresan como velocidades relativas de consumo de oxígeno ( $v_r$ ) por los Atb de forma comparativa en presencia de ambos sensibilizadores en la **Tabla IV.2**.

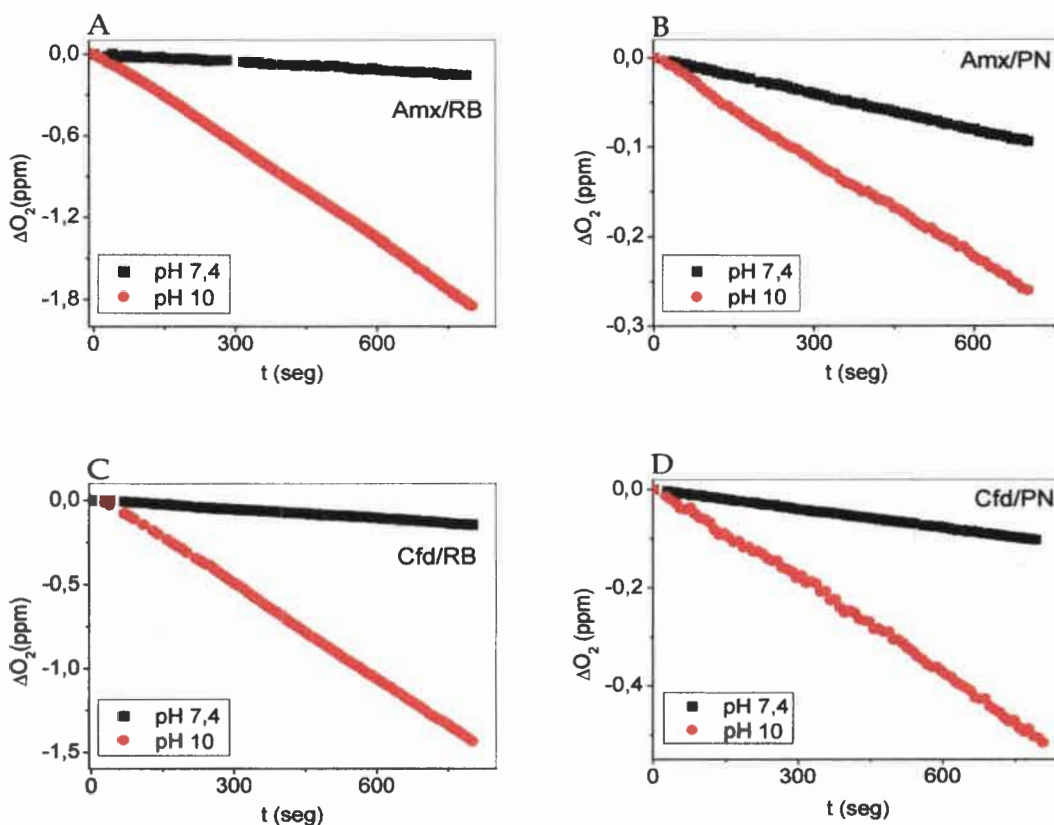


Figura IV.7. Gráficos de consumo de oxígeno por los Atb en función del tiempo de fotólisis para (A) Amx/RB, (B) Amx/PN, (C) Cfd/RB y (D) Cfd/PN en solución reguladora de pH 7,4 y 10.  $Abs_{RB}^{549} = 0,5$ ;  $Abs_{PN}^{365} = 0,5$ ;  $[Atb] = 5 \times 10^{-4}$  M.

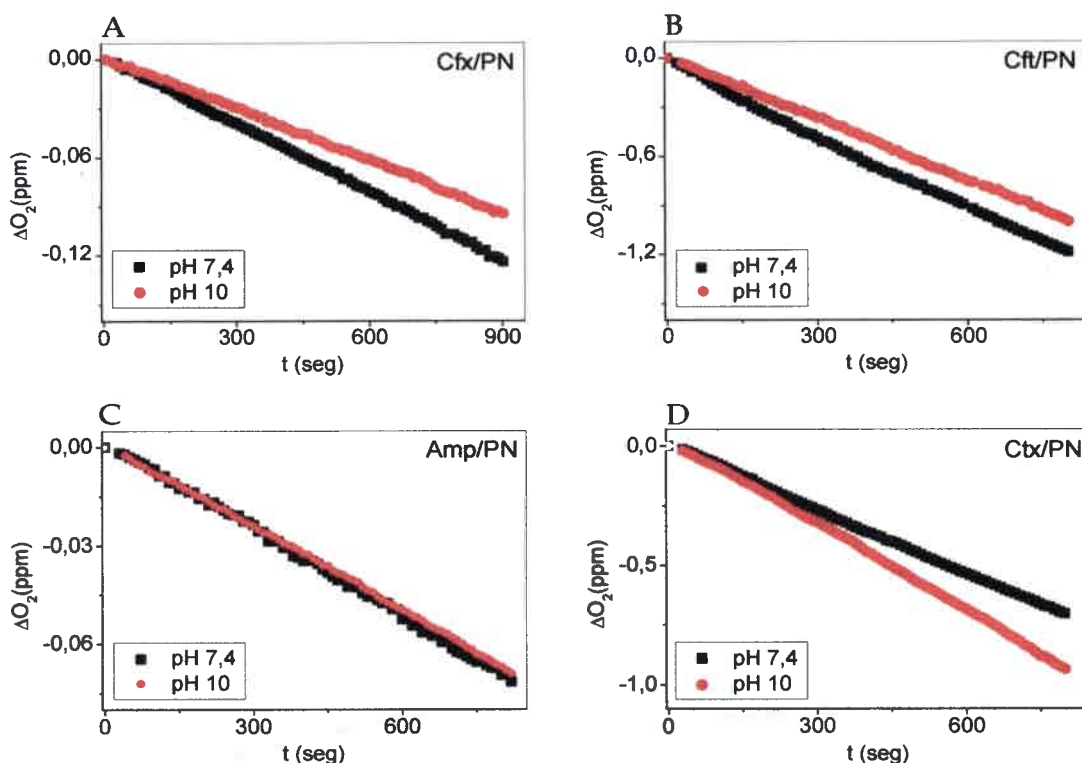


Figura IV.8. Gráficos de consumo de oxígeno por los Atb en función del tiempo de fotólisis para (A) Cfx/PN, (B) Cft/PN (C) Amp/PN y (D) Ctx/PN en solución reguladora de pH 7,4 y 10.  $Abs_{RB}^{549} = 0,5$ ;  $Abs_{PN}^{365} = 0,5$ ;  $[Atb] = 5 \times 10^{-4}$  M.

Tabla IV.2. Velocidades relativas de consumo de oxígeno ( $v_r$ ) de los Atb a pH 7,4 y 10 en presencia de RB ó PN como sensibilizador; constantes de velocidad para la desactivación total de  $O_2 (^1\Delta_g)$  por los Atb ( $k_t$ )

Atb	$v_r$ (RB)	$v_r$ (PN)	$k_t \times 10^{-7}$ $M^{-1}s^{-1}$ (PN)	Atb	$v_r$ (RB)	$v_r$ (PN)	$k_t \times 10^{-7}$ $M^{-1}s^{-1}$ (PN)
Amx pH 7,4	0,03	0,29	$0,90 \pm 0,04$	Amp pH 7,4	0,83	1,0	$0,40 \pm 0,02$
pH 10	1,0	1,0	$20,9 \pm 1,0$	pH 10	1,0	0,86	$0,70 \pm 0,03$
Cfx pH 7,4	1,0	1,0	$14,0 \pm 0,7$	Cfd pH 7,4	0,09	0,34	$1,10 \pm 0,05$
pH 10	0,87	0,81	$1,0 \pm 0,1$	pH 10	1,0	1,0	$38,0 \pm 1,9$
Cft pH 7,4	0,92	0,79	$6,8 \pm 0,3$	Ctx pH 7,4	1,0	0,88	$5,80 \pm 0,29$
pH 10	1,0	1,0	$7,1 \pm 0,3$	pH 10	0,97	1,0	$7,30 \pm 0,36$

Cabe aclarar que los Atb cuyas velocidades relativas de consumo de oxígeno resultaron en los mayores valores encontrados a ambos pH fueron Cft y Ctx, mientras que la menor velocidad de consumo se observó para Amp.

En los resultados mostrados en la **Tabla IV.2**, se puede observar claramente que los valores de  $v_r$  aumentan con el incremento del pH para Amx y Cfd indicando que el proceso fotooxidativo se ve favorecido a pH 10 probablemente debido a la ionización del grupo fenólico presente solo en las estructuras químicas de estos dos antibióticos. Esta observación también se pone en evidencia cuando se comparan Atb estructuralmente relacionados. Por ejemplo, la reactividad a pH alcalino se ve significativamente aumentada para Amx y no así para Amp, dado que la única diferencia entre ambos Atb es la presencia del grupo -OH en la cadena lateral de Amx. Lo mismo ocurre entre Cfx y Cfd, el grupo fenol se presenta en la cadena lateral del último mencionado para el cual se observa la influencia del pH.

Para Amp, Cfx, Cft y Ctx parece no haber una relación directa entre los valores obtenidos de  $v_r$  y el pH del medio, de hecho se observa que esta variable no produce modificaciones significativas sobre las  $v_r$ .

Además, es importante destacar que la similitud en los valores de  $v_r$  obtenidos para Cft y Ctx podría estar indicando que la estructura química compartida por estos dos Atb es la responsable del comportamiento observado independientemente de la cadena lateral que los diferencia.

De la comparación entre las  $v_r$  obtenidas con RB y PN que se muestran en la **Tabla IV.2**, se encontraron diferencias que podrían estar indicando que los mecanismos de reacción o las EROs fotogeneradas involucradas son diferentes en presencia de uno u otro sensibilizador. Por esta razón se abordó un estudio sistemático que consistió en evaluar posibles interacciones de los estados excitados de los sensibilizadores RB y PN con los Atb y las diferentes EROs que se puedan estar generando en cada caso, como se explica en la siguiente sección.

#### *IV-1.5. Interacción de los estados excitados del sensibilizador con los antibióticos*

La desactivación del estado singlete excitado de RB ( $^1\text{RB}^*$ ) por los Atb no pudo ser detectada en solución acuosa, debido principalmente a que en este solvente el tiempo de vida de  $^1\text{RB}^*$  resulta muy bajo, del orden de los picosegundos<sup>2</sup>, por lo que esta especie excitada no puede ser interceptada por los Atb en el rango de concentraciones utilizadas (por encima de 10 mM).

Se puede considerar entonces que el proceso de desactivación de  $^1\text{RB}^*$  no es significativo, bajo las condiciones experimentales empleadas en los ensayos de fotodegradación (0,5 mM).

La desaparición del estado triplete excitado de RB,  $^3\text{RB}^*$ , en solución reguladora generado por un pulso láser a 532 nm en ausencia de oxígeno, fue seguida por el decaimiento de primer orden de la absorbancia a 650 nm mediante la técnica de LFF descrita en la sección 2.3.2.2 del capítulo II, observándose una disminución apreciable del tiempo de vida de dicha especie en presencia de los Atb. Las trazas de decaimiento se tomaron a dicha longitud de onda, dado que en esta región, la interferencia debido a otras especies transitorias de RB ( $\text{RB}^{\cdot-}$  y  $\text{RB}^{\cdot+}$ ) es despreciable<sup>19</sup>.

Se determinaron los tiempos de vida de  $^3\text{RB}^*$  en ausencia ( $^3\tau_0$ ) y en presencia ( $^3\tau$ ) de distintas concentraciones de los Atb y mediante un tratamiento de Stern-Volmer se obtuvieron los valores de las constantes de velocidad bimoleculares,  $^3k_q$ , que cuantifican la interacción  $^3\text{RB}^*\text{-Atb}$ . Los resultados obtenidos se incluyen para todos los Atb en la **Tabla IV.3** a los dos valores de pH estudiados. En la **Figura IV.9** se muestran los gráficos de Stern-Volmer para ciertos Atb a modo representativo.

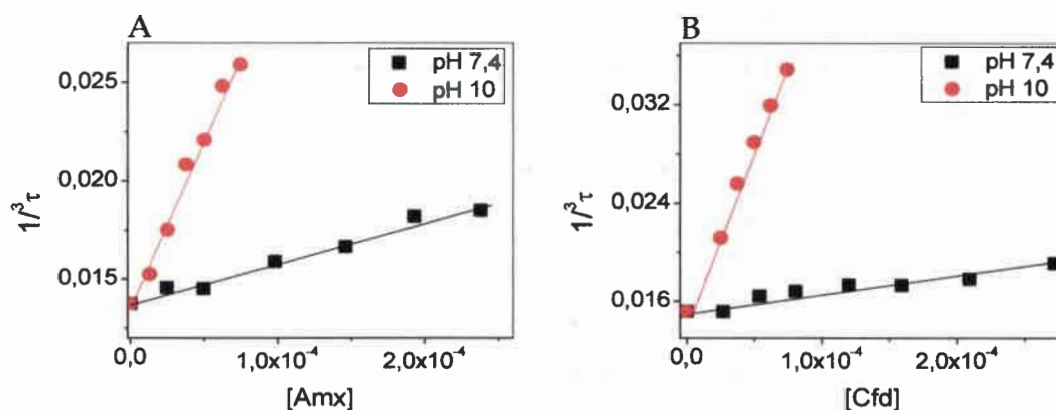


Figura IV.9. Gráficos de Stern-Volmer para la desactivación del estado triplete excitado de RB por (A) Amx y (B) Cfd en solución reguladora de pH 7,4 y 10.  $\text{Abs}_{\text{RB}}^{532}=0,3$ .

Tabla IV.3. Constantes de velocidad para la desactivación del estado triplete excitado de RB por los Atb ( $^3k_q$ ).

Atb	$^3k_q \times 10^{-7} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	Atb	$^3k_q \times 10^{-7} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
Amx pH 7,4	2,1±0,1	Amp pH 7,4	N.O.
pH 10	19,0±0,9	pH 10	1,8±0,1
Cfx pH 7,4	1,5±0,1	Cfd pH 7,4	2,20±0,11
pH 10	2,30±0,11	pH 10	28,0±1,4
Cft pH 7,4	N.O.	Ctx pH 7,4	N.O.
pH 10	2,40±0,12	pH 10	3,20±0,16

N.O.= no se observó desactivación del estado triplete excitado de RB hasta una concentración de Atb=  $2 \times 10^{-3} \text{M}$ .

A partir de los valores obtenidos para  $^3k_q$  que se muestran en la **Tabla IV.3** se puede decir que efectivamente existe interacción entre los Atb y el  $^3\text{RB}^*$ .

Por otro lado, la interacción del estado electrónico singlete excitado de PN ( $^1\text{PN}^*$ ) puede ser ignorada al igual que para  $^1\text{RB}^*$ . Este colorante es una cetona aromática de carácter no fluorescente debido a que sufre un rápido cruzamiento de sistemas al estado triplete excitado  $^3\text{PN}^*$ . Como consecuencia, el estado  $^3\text{PN}^*$  es poblado en una escala de tiempo del orden de los sub-nanosegundos con una eficiencia del 100% aproximadamente<sup>6,7</sup>. Por lo tanto deben ser considerados solo los procesos que ocurren desde el estado  $^3\text{PN}^*$ .

La amplitud de la señal para la generación de  $\text{O}_2$  ( $^1\Delta_g$ ) empleando PN como un fotosensibilizador se mantuvo invariable tanto en ausencia como en presencia de los Atb en el intervalo de concentración empleado (hasta 0,5 mM), como se muestra a modo de ejemplo en la **Figura IV.10** en ausencia y presencia de  $1 \times 10^{-4} \text{M}$  de Cft. Esta evidencia experimental permite descartar la interacción Atb- $^3\text{PN}^*$ , en las condiciones de trabajo. Podríamos decir entonces que en la fotodegradación sensibilizada por PN de los Atb opera un mecanismo mediado exclusivamente por  $\text{O}_2$  ( $^1\Delta_g$ ).

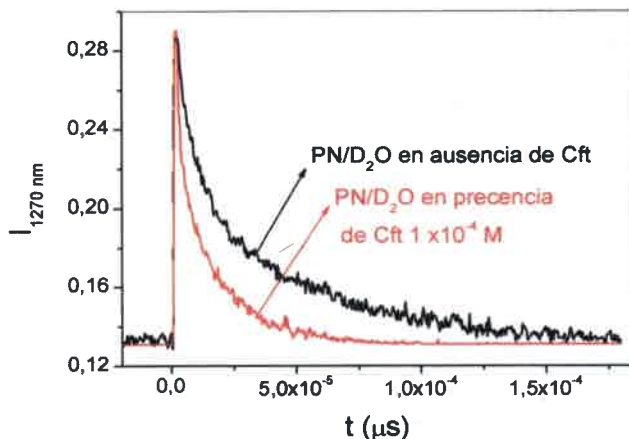


Figura IV.10. Decaimiento de la fosforescencia de  $O_2 (^1\Delta_g)$  a 1270 nm en ausencia y presencia de  $1 \times 10^{-4} M$  de Cft a pD 10.

Para obtener más detalles acerca del mecanismo de reacción, para RB se investigó la participación en la fotodegradación de los Atb de las diferentes EROs.

#### IV-1.6. Participación de las diferentes EROs en la fotodegradación sensibilizada por RB

Con el objetivo de poder discernir que EROs estarían involucradas en el proceso fotooxidativo, se realizaron experimentos de consumo de oxígeno en presencia de inhibidores específicos de tales especies. Se utilizó  $NaN_3$  y SOD como inhibidores específicos de  $O_2 (^1\Delta_g)$  y  $O_2^{\bullet-}$ , respectivamente<sup>20,21</sup>. Amx y Cfx fueron los Atb seleccionados para este ensayo como representantes de la familia de las penicilinas y cefalosporinas, respectivamente. En las **Figura IV.11** se muestran gráficos representativos de los cambios producidos en la velocidad de consumo de oxígeno de Amx y Cfx a pH 10 y 7,4 respectivamente en presencia y ausencia de dichos inhibidores. En la **Tabla IV.4** se incluyen los valores obtenidos para las velocidades relativas, calculadas como la relación entre la velocidad de consumo de oxígeno por el Atb en presencia del inhibidor y en ausencia del mismo ( $v_{inh}/v_0$ ).

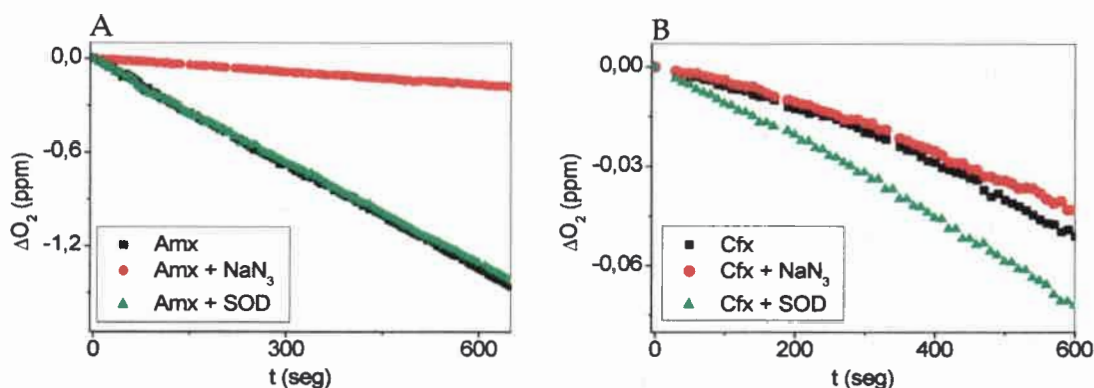


Figura IV.11. Consumo de oxígeno por (A) Amx a pH 10 y (B) Cfx a pH 7,4 sensibilizado por RB, en ausencia y en presencia de NaN<sub>3</sub> y SOD. Abs<sub>RB</sub><sup>549</sup>= 0,5; [Atb]= 5 x10<sup>-4</sup> M; [NaN<sub>3</sub>]=1 mM; [SOD]= 1mg/100 mL.

Tabla IV.4. Velocidades relativas de consumo de oxígeno del sistema Atb/RB/solución reguladora de pH 7,4 y 10 en ausencia y presencia de inhibidores específicos (v<sub>inh</sub>/v<sub>0</sub>). NaN<sub>3</sub> (1 mM), SOD (1 mg%)

Atb	v <sub>inh</sub> /v <sub>0</sub>		Atb	v <sub>inh</sub> /v <sub>0</sub>	
	pH 7,4	pH 10		pH 7,4	pH 10
Amx	1,0	1,0	Cfx	1,0	1,0
Amx + NaN <sub>3</sub>	1,0	0,1	Cfx + NaN <sub>3</sub>	1,0	1,0
Amx + SOD	2,2	1,0	Cfx + SOD	1,6	1,7

Para Amx a pH 10 se observó que el agregado de NaN<sub>3</sub> produce una disminución en la velocidad de la reacción mientras que no se vió efecto con el agregado de SOD, este resultado podría sugerir la participación de la especie O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) en la fotodegradación de este Atb y a este pH, mientras que la especie O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en principio no estaría involucrada. Por el contrario a pH 7,4, el efecto sobre la velocidad de consumo de oxígeno se presenta en presencia de SOD, no así en presencia de NaN<sub>3</sub> sugiriendo entonces la participación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en el mecanismo de fotodegradación.

Para Cfx tanto a pH 7,4 como a pH 10 se observó que el agregado de NaN<sub>3</sub> no produce efecto en la velocidad de consumo de oxígeno sensibilizada por RB, con lo cual se podría decir que O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) no estaría involucrado en la fotodegradación de este Atb, a ambos pH. Sí se observó efecto con el agregado de SOD, lo cual confirmaría la

participación de la especie  $O_2^{\cdot-}$  en dicho proceso.

Estos resultados sugieren que en presencia de RB, tanto  $O_2 (^1\Delta_g)$  como  $O_2^{\cdot-}$  son generados y pueden participar de la fotodegradación de los Atb.

Cabe aclarar que el tiempo de vida de  $O_2 (^1\Delta_g)$  no sufre variaciones con la concentración de SOD utilizada en esta experiencia.

Con el propósito de evaluar la contribución solo de la especie  $O_2 (^1\Delta_g)$  en el proceso fotodegradativo de los sustratos estudiados, se escogió PN como sensibilizador para la determinación de la constante de desactivación total de dicha especie por los Atb ( $k_t$ ).

#### IV-1.7. Determinación de las constantes de velocidad de desactivación total de $O_2 (^1\Delta_g)$ por los Atb

Los valores de  $k_t$  ( $k_t = k_r + k_q$ ) fueron determinados mediante la técnica de TRPD para Amx, Cfx, Cfd, Cft y Ctx a pD 7,4 y 10 mientras que para Amp se determinó por el método de fotólisis estacionaria descrito en la sección 2.3.1 del capítulo II. Los resultados obtenidos se incluyen en la **Tabla IV.2**.

En la **Figura IV.12** se presentan los gráficos de Stern-Volmer para la determinación de dicha constante por TRPD. En la **Figura IV.13** se muestra el gráfico de dobles recíprocas para la determinación de  $k_t$  para Amp la cual se realizó por este método dado que, por dificultades experimentales, en el intervalo de concentraciones utilizado en las medidas de TRPD no fue posible detectar cambios significativos en el  $\tau$  de  $O_2 (^1\Delta_g)$ . Cabe aclarar que se midió dicho  $\tau$  en ausencia y en presencia de  $2 \times 10^{-3}$  M de Amp y luego se utilizó la ecuación 4 (sección 2.3.1, capítulo II) para el cálculo de  $k_t$ , dando valores del orden de los determinados por el método de dobles recíprocas.

Como se mencionó previamente, esta metodología puede ser aplicada solamente en aquellos casos en donde no existe interacción entre el estado triplete del sensibilizador y el sustrato. Dado que no se encontraron evidencias de interacción entre  $^3PN^*$  y el Atb, el método de dobles recíprocas resulta un método válido para determinar  $k_t$  en el caso de Amp.



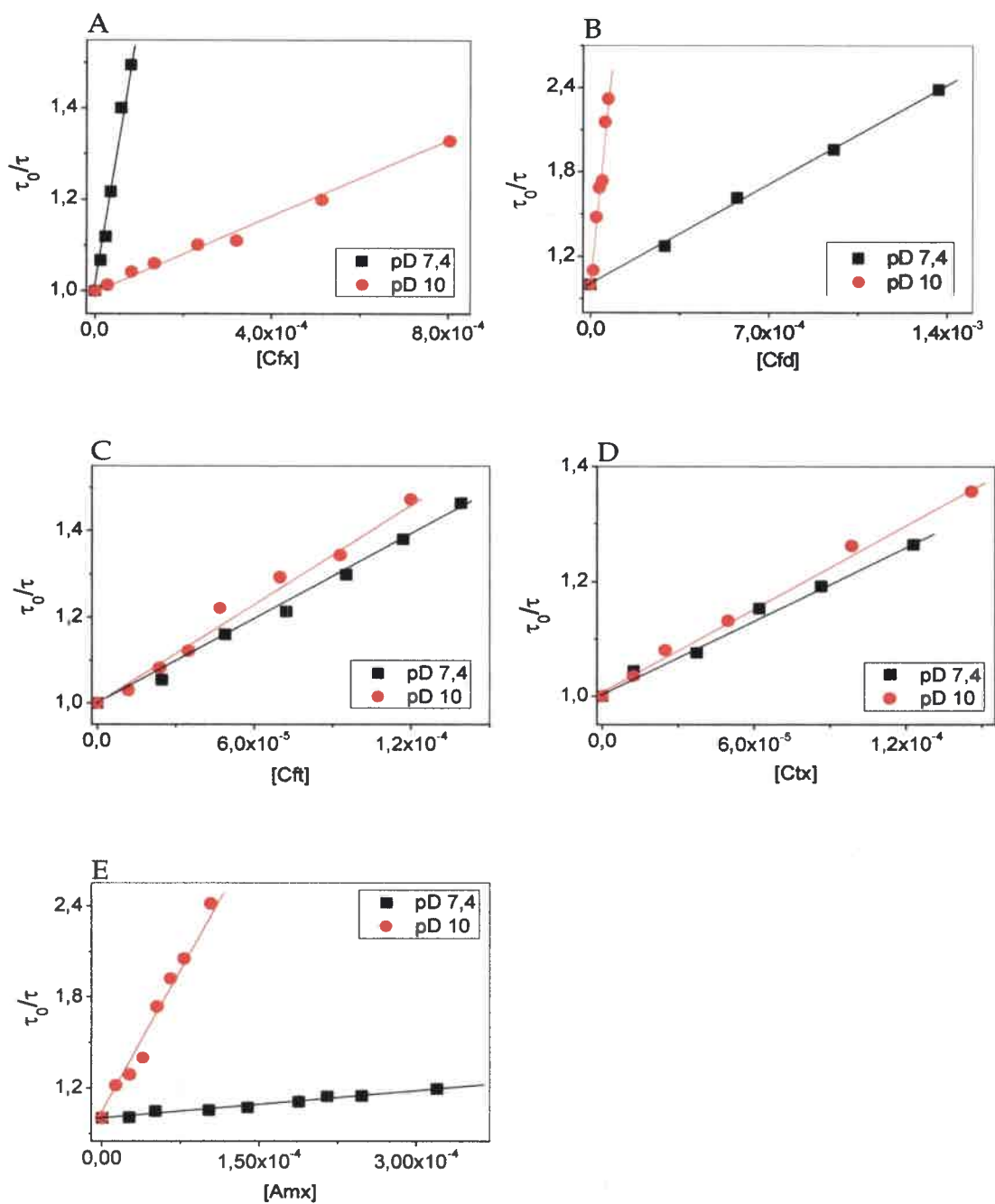


Figura IV.12. Gráficos de Stern- Volmer para la desactivación total de la fosforescencia de  $O_2 (^1\Delta_g)$  por (A) Cfx (B) Cfd (C) Cft (D) Ctx y (E) Amx en PN/ $D_2O$  de pD 7,4 y 10.  $Abs_{PN}^{355} = 0,3$ .

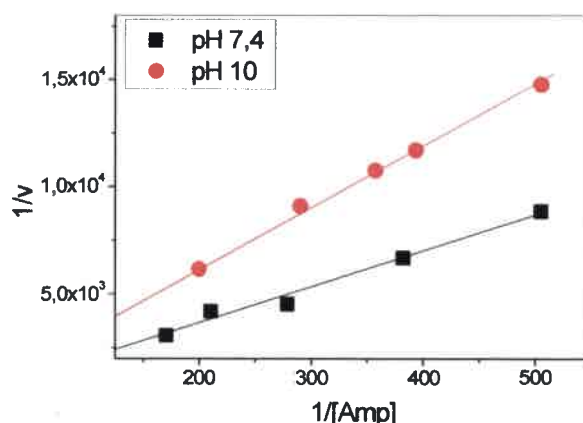


Figura IV.13. Gráfico de dobles recíprocas para la determinación de  $k_t$  para Amp a pH 7,4 y 10.  $Abs_{PN}^{365} = 0,5$ .

Como se observa en la **Tabla IV.2** los valores de  $k_t$  aumentan con el incremento del pH para Amx y Cfd indicando que el proceso fotooxidativo se ve favorecido en medio alcalino debido a que el grupo fenol presente solo en la cadena lateral de estos Atb se encuentra ionizado a pD 10 y consecuentemente la reactividad frente a  $O_2(^1\Delta_g)$  aumenta, resultados semejantes se obtuvieron en los valores de  $v_r$ . En los demás Atb este efecto del pH no fue observado. Para Cfx, el mayor valor de  $k_t$  se presentó a pD 7,4.

Nuevamente, al igual que en lo observado en las  $v_r$ , para Cft y Ctx los valores de  $k_t$  obtenidos resultaron muy semejantes indicando posiblemente que la cadena lateral que diferencia a estos dos Atb aparentemente no estaría involucrada en la reactividad de los mismos frente a  $O_2(^1\Delta_g)$ .

#### IV-1.8. Análisis de Fotoproductos

La determinación de los fotoproductos se realizó con el objetivo de dilucidar la naturaleza de los compuestos generados como consecuencia de la degradación de los Atb bajo fotooxidación sensibilizada.

Los resultados obtenidos para la detección e identificación de los fotoproductos por HPLC-masa para Amx y Cfx, Atb representativos de penicilinas y cefalosporinas respectivamente, se muestran en la siguiente tabla.

Tabla IV.5. Análisis por HPLC-masa para los productos de degradación fotosensibilizada de Amx (fotolizada 5 horas) y Cfx (fotolizada 1 hora) a pH 7,4; [Atb]= 2 mM;  $t_r$ = tiempo de retención; peso molecular de Amx ( $M_{Amx}$ )= 365; peso molecular de Cfx ( $M_{Cfx}$ )= 347. ND: no detectado.

Antibiótico	$t_r$ (min)	[M - H] <sup>-</sup>	[M + H] <sup>+</sup>	Asignación
Amx	3,1-3,4	364	366	$M_{Amx}$
	3,1-3,4	424	426	$M_{Amx} + 2(45) - 2(15)$
	3,1-3,4	N.D	442	$M_{Amx} + 2(45) - 2(15) + (17)$
Cfx	5,1-6,9	346	N.D	$M_{Cfx}$
	5,1-6,9	392	N.D	$M_{Cfx} + (45) - (15) + (17)$
	5,1-6,9	408	N.D	$M_{Cfx} + (45) - (15) + 2(17)$
	5,1-6,9	424	N.D	$M_{Cfx} + (45) - (15) + 3(17)$

El análisis por HPLC-masa de las soluciones de los Atb, irradiadas en presencia de RB durante 5 horas para el caso de Amx y durante 1 hora para Cfx, indica que los productos resultan de la oxidación de los grupos  $-CH_3$ , del anillo  $\beta$  lactámico, a  $-COOH$  y posterior adición de átomos de oxígeno al anillo aromático presente en la cadena lateral de los Atb.

Así mismo, se produce la entrada de un grupo  $-OH$  para el caso de Amx mientras que en el caso de Cfx se incorporan tres grupos  $-OH$  en el anillo aromático. Idénticos resultados fueron obtenidos para Amx a pH alcalino.

Cabe destacar que la presencia del Atb (compuesto con el mismo valor de M) en las mezclas analizadas indica que el sustrato no se degrada totalmente bajo las condiciones experimentales utilizadas. Este hecho es de gran importancia teniendo en cuenta la función farmacológica de los sustratos en estudio.

Las estructuras químicas tentativas detectadas en el análisis se muestran en la **Figura IV.14**. Además se incluye el posible mecanismo de ataque de oxígeno al anillo aromático y al grupo metilo presentes en los compuestos analizados, a modo de ejemplo para el antibiótico Amx (**Figura IV.15**).

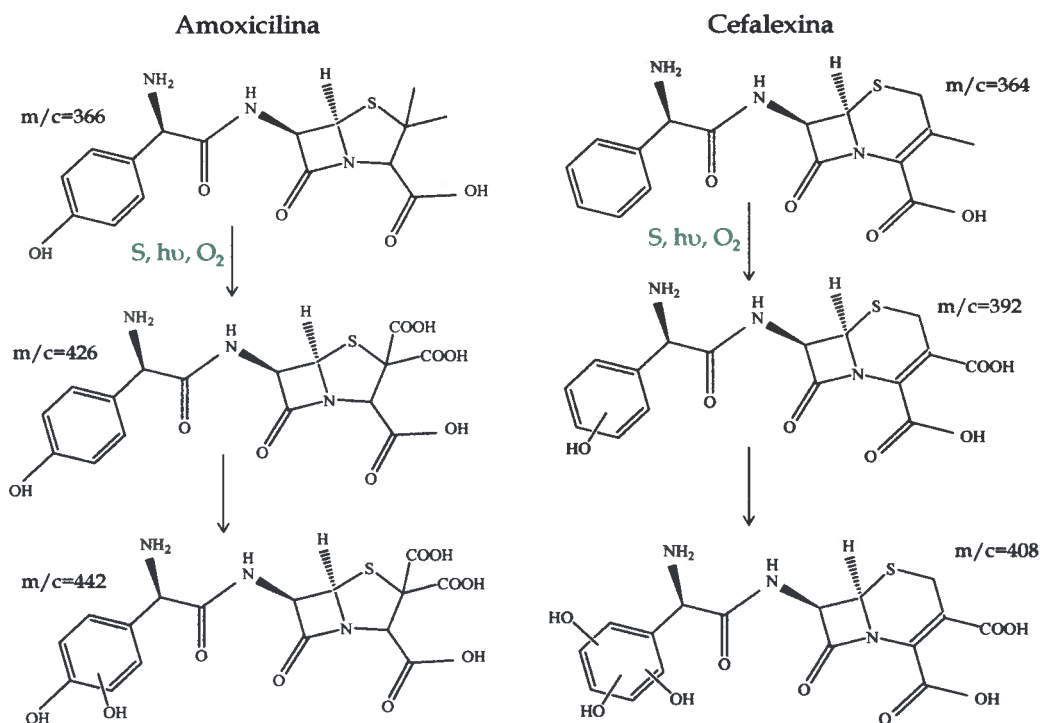
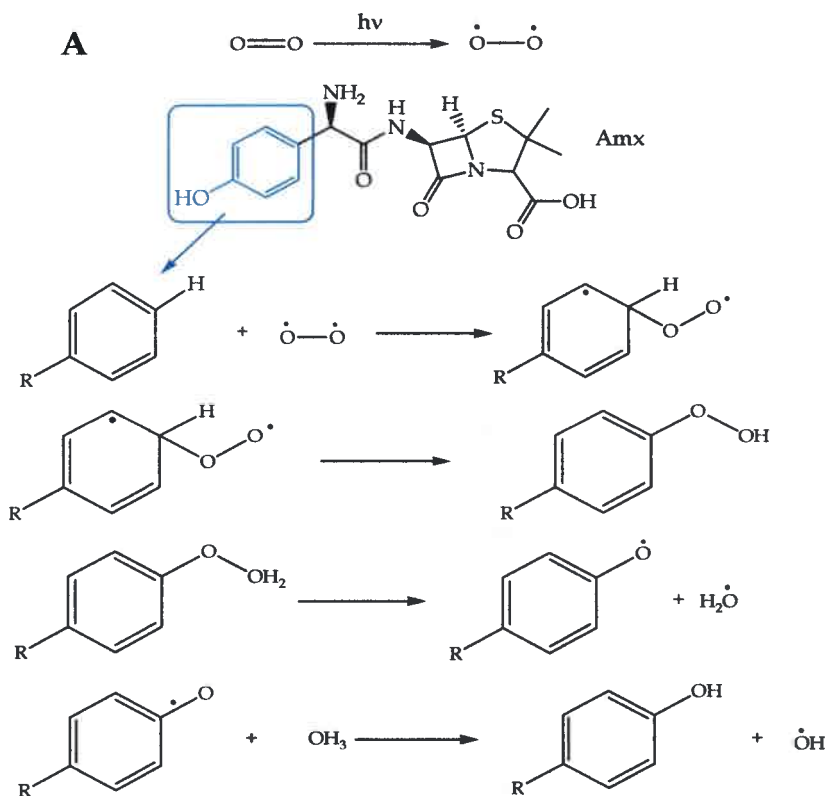


Figura IV.14. Estructuras químicas tentativas de los fotoproductos detectados en la fotodegradación sensibilizada en presencia de RB para los antibióticos Amoxicilina y Cefalexina (S: sensibilizador).



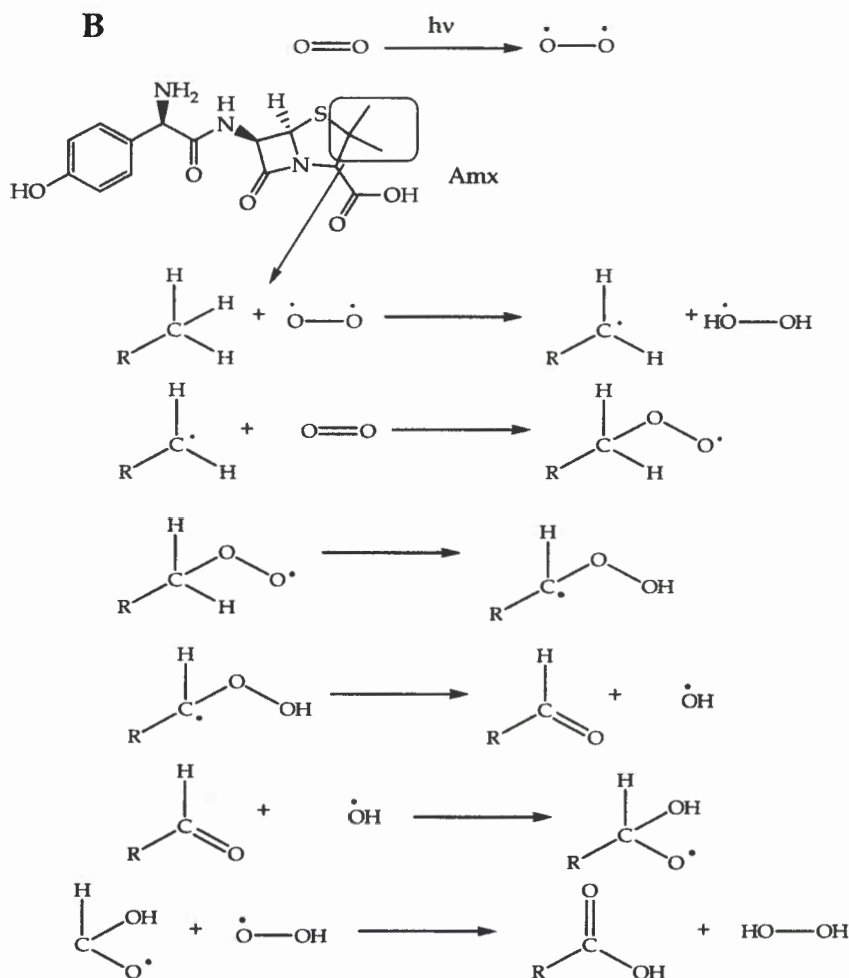


Figura IV.15. Posible mecanismo de ataque de oxígeno (A) al anillo aromático y (B) al grupo metilo, presentes en la estructura química de Amx.

## IV-2. DISCUSIÓN

El colorante RB es, probablemente el fotosensibilizador más empleado en reacciones de fotooxidación que involucran  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ , sin embargo, los resultados obtenidos indicarían que no representa un buen sensibilizador para estudiar la cinética del proceso fotodegradativo de los sustratos seleccionados por la especie reactiva  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  únicamente.

Si bien RB sensibiliza la fotooxidación de los Atb como demuestran los experimentos de consumo de oxígeno, por otro lado las diferencias en las  $v_r$  encontradas en presencia

de este colorante y en presencia de PN, un generador exclusivo de  $O_2(^1\Delta_g)$ , claramente indican interacciones químicas entre los sustratos y los estados excitados de RB y/o con las especies reactivas de oxígeno generadas a partir de dichos estados.

Confirmando esta observación, los ensayos en presencia de inhibidores también evidencian que el proceso fotodegradativo en presencia de RB es netamente diferente al que ocurre cuando PN sensibiliza la fotooxidación de los Atb, es decir además de  $O_2(^1\Delta_g)$  otras EROs pueden estar involucradas.

Cuando RB está presente, el agregado de  $NaN_3$  frena radicalmente la velocidad de consumo de oxígeno por parte de Amx a pH 10 indicando la participación de  $O_2(^1\Delta_g)$  en la fotodegradación, mientras que el agregado de SOD no produce ningún efecto.

Por otro lado para Amx a pH 7,4 y Cfx a pH 7,4 y 10 el agregado de  $NaN_3$  no modifica la velocidad de consumo de oxígeno mientras que el agregado de SOD la acelera, sugiriendo la presencia de  $O_2^{\bullet-}$ . Se sabe que SOD puede inhibir o estimular la oxidación mediada por  $O_2^{\bullet-}$  dependiendo del sustrato<sup>22</sup>. Para los Atb anteriormente mencionados el aumento en la velocidad de consumo de oxígeno podría explicarse ya que SOD inhibe específicamente a  $O_2^{\bullet-}$ , pero como consecuencia de la dismutación de esta especie reactiva aparece como producto  $H_2O_2$ , otra EROs que puede contribuir al consumo de oxígeno, la reacción involucrada se muestra a continuación:



Los resultados obtenidos evidencian que tanto  $O_2(^1\Delta_g)$  como  $O_2^{\bullet-}$  son generados en presencia de RB como sensibilizador, mientras que solo  $O_2(^1\Delta_g)$  es generado en presencia de PN<sup>23</sup>. Es decir, la fotodegradación de los Atb empleando RB como sensibilizador puede incluir la participación de  $O_2(^1\Delta_g)$  generado por transferencia de energía desde el estado excitado triplete de RB al oxígeno en estado fundamental, y/o de  $O_2^{\bullet-}$  formado por transferencia irreversible de electrones desde el estado excitado triplete de RB al oxígeno en estado fundamental. Luego, el  $O_2(^1\Delta_g)$  generado puede decaer al estado fundamental por colisiones con moléculas de solvente e interactuar de forma química y/o física con los sustratos presentes en el medio, por otro lado,  $O_2^{\bullet-}$  es capaz de intervenir en una serie de reacciones de oxido-reducción siendo su principal destino la desproporción a  $H_2O_2$  en medio ácido<sup>24</sup>.

La generación de  $O_2^{\bullet-}$  por parte del colorante sintético RB no es un hallazgo novedoso, Lee y Rodgerds<sup>9</sup> reportaron en 1987 que la inhibición del estado triplete de RB por

oxígeno molecular en su estado fundamental conduce a aproximadamente a un 75% de  $O_2(^1\Delta_g)$  y un 20% de  $O_2(^3\Sigma_g^-)$ . Resultados similares fueron obtenidos en la fotodegradación sensibilizada por RB de triptófano y esteres derivados<sup>3</sup> y en la fotodegradación de  $\alpha$  y  $\beta$  quimotripsina<sup>10</sup>.

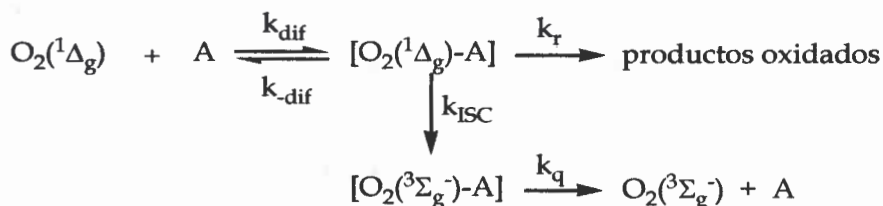
Cabe aclarar que, aunque los valores obtenidos para la desactivación del estado triplete excitado de RB,  $^3k_q$ , resultaron significativos (Tabla 3), el análisis cinético indica que en todos los casos estudiados  $^3k_q [Atb] \ll k_{ET} [O_2(^3\Sigma_g^-)]$  (con  $k_{ET} \approx 1/9$  del valor difusional<sup>25</sup>;  $[O_2(^3\Sigma_g^-)] \approx 0,2$  mM;  $[Atb] = 0,5$  mM). Es decir, la velocidad de generación de  $O_2(^1\Delta_g)$  supera a la de desactivación de  $^3RB^*$  por los Atb, de manera que las reacciones que puedan desencadenarse a partir de la interacción  $^3RB^*-Atb$  pueden no ser tenidas en cuenta.

En cuanto los valores de  $v_r$  y  $k_t$  obtenidos al aumentar el pH del medio, para los Atb Amx y Cfd un incremento significativo fue observado, no así para los demás Atb.

Como ha sido observado previamente<sup>26-28</sup>, los valores de  $k_t$  ( $k_r + k_q$ ) incrementan en compuestos aromáticos que presentan sustituyentes dadores de electrones, tales como OH y  $NH_2$ . El grupo  $NH_2$  favorece la desactivación física ( $k_q$ ) de  $O_2(^1\Delta_g)$ <sup>29</sup>, al igual que el grupo OH fenólico no ionizado<sup>30,31</sup> mientras que el grupo OH en su forma ionizada promueve la desactivación química de  $O_2(^1\Delta_g)$ <sup>32</sup>.

De manera que, para Amx y Cfd, el elevado valor de  $v_r$  y  $k_t$  podrían estar indicando que el proceso fotooxidativo en presencia de PN y mediado por  $O_2(^1\Delta_g)$  es favorecido a pH 10 debido a la ionización del grupo fenólico presente solo en las estructuras químicas de estos dos antibióticos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, al igual que aquellos reportados para reacciones bimoleculares entre  $O_2(^1\Delta_g)$  y varios compuestos, pueden ser explicados a través de un mecanismo que involucra un complejo de encuentro con carácter parcial de transferencia de carga actuando el  $O_2(^1\Delta_g)$  como aceptor de electrones<sup>33-36</sup>, el cual se estabiliza en presencia de grupos dadores de electrones y puede desactivarse por reacción química ( $k_r$ ) y/o física ( $k_q$ ), tal como se presenta en el esquema a continuación:



Gorman *et. al* <sup>34,35,36</sup> postula que la fotooxidación de compuestos tales como fenoles<sup>35</sup>, indoles<sup>34</sup>, furanos<sup>34</sup>, éteres enólicos<sup>37</sup>, alquenos<sup>36</sup> y aminas<sup>36</sup>, procede a través de este mecanismo el cual se forma de manera irreversible cuando  $(k_r + k_{ISC}) \gg k_{-dif}$  o cumple con la condición límite de pre-equilibrio cuando  $k_{-dif} \gg (k_r + k_{ISC})$ .

En el mecanismo postulado el proceso de desactivación física ( $k_q$ ) proviene de un cruce entre sistemas inducido por un acoplamiento espín-órbita dentro del complejo. El balance entre  $k_{ISC}$  y  $k_r$  es sensible a la función de acoplamiento espín-órbita y a factores de entropía <sup>34,35</sup>.

Naturalmente, dada la capacidad de transferencia de carga que ha sido propuesto para el complejo de encuentro, tanto su formación como su desactivación dependerá de la capacidad dadora de electrones del sustrato, debido a que este factor puede modificar las restricciones de entropía en el estado de transición y/o los requerimientos de reorganización del solvente<sup>37</sup>.

Por otra parte, cuanto mejor dador de electrones sea un grupo, más favorecido estará el ataque electrofílico por  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ), más pronunciado será el carácter de transferencia de carga dentro del complejo y por lo tanto mayor será la probabilidad de separación de carga en el encuentro que conducirá a reacción química y por lo tanto la formación de productos oxidados<sup>38</sup>.

En cuanto a los fotoproductos obtenidos por el estudio de HPLC-masa, se encontró<sup>23</sup> que los mismos provienen de la oxidación de los grupos  $-CH_3$ , del anillo  $\beta$  lactámico, a  $-COOH$  y posterior adición de átomos de oxígeno al anillo aromático que compone las cadenas laterales de los Atb. Estas evidencias sugieren que especies reactivas de oxígeno son generadas en presencia del sensibilizador y oxígeno, y las mismas son capaces de reaccionar químicamente con los Atb para dar productos oxidados por mecanismos que posiblemente involucren solo la incorporación de oxígeno a la molécula mediante una serie de reacciones en las que se generan y participan múltiples especies radicalarias.

En general, se sabe que los compuestos fenólicos reaccionan con especies reactivas de oxígeno dando quinonas y/o compuestos polihidroxilados<sup>27,39</sup>. Resultados similares fueron obtenidos en la evaluación de fotoproductos del compuesto estrogénico  $\beta$  estradiol luego de la fotodegradación sensibilizada en presencia de RB<sup>40</sup>.

Por otro lado, productos similares para la degradación de Amx y otras penicilinas fueron obtenidos en presencia del radical  $OH^\bullet$  generado por radiólisis  $\gamma$ . Los mismos presentaban grupos  $-OH$  adicionados en el anillo aromático de la cadena lateral de



estos antibióticos<sup>41</sup>. Por el mecanismo de Foto-Fenton, además de la hidroxilación del anillo aromático de Amx, se encontró apertura del anillo  $\beta$  lactámico seguido de la oxidación de los grupos  $\text{CH}_3$ <sup>42</sup>, mientras que por ozonización se obtuvieron intermediarios hidroxiderivados por ataque del ozono al anillo aromático de Amx, no hallándose evidencias de ataque a otras partes de la molécula<sup>43</sup>.

### IV-3. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos y discutidos en este capítulo demuestran que tanto RB como PN son colorantes sintéticos capaces de fotosensibilizar la degradación oxidativa de los Atb  $\beta$  lactámicos estudiados.
- En presencia de RB la fotodegradación puede darse por la participación de las especies  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  es generado por transferencia de energía desde el estado excitado triplete de RB al oxígeno en estado fundamental, mientras que  $\text{O}_2^{\bullet-}$  es formado por transferencia irreversible de electrones desde el estado excitado triplete de RB al oxígeno en estado fundamental. Por otro lado solo  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  está involucrado en la fotodegradación de los Atb en presencia de PN como sensibilizador.
- El proceso fotooxidativo en presencia de PN y mediado por  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  es favorecido a pH alcalino para Amoxicilina y Cefadroxil debido a la ionización del grupo fenólico presente solo en las estructuras químicas de estos antibióticos, mientras que no se observó efecto del pH en la reactividad frente a  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  por lo demás antibióticos estudiados.
- La reacción de fotooxidación entre  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  y los Atb puede ser explicada a través de un mecanismo que involucra un complejo de encuentro con carácter parcial de transferencia de carga, actuando el  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  como aceptor de electrones, el cual se estabiliza en presencia de grupos dadores de electrones y puede desactivarse por reacción química y/o física.
- Los fotoproductos obtenidos para Amoxicilina y Cefalexina provienen de la oxidación de los grupos  $-\text{CH}_3$ , del anillo  $\beta$  lactámico, a  $-\text{COOH}$  y posterior adición de átomos de oxígeno en el anillo aromático que poseen los Atb en su cadena lateral.

#### IV-4. REFERENCIAS

1. Martínez G., Bertolotti S. G., Zimerman O. E., Martire D. O., Braslavsky S. E., García N. A. A Kinetic study of photodynamic properties of the xanthene dye merbromin (mercurochrome) and its aggregates with amino acids in aqueous solutions. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* (1993) 17: 247.
2. Neckers D. C. Rose Bengal. *Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (1989) 47:1.
3. Criado S, Bertolotti SG, García NA. Kinetics aspects of the rose bengal-sensitized photo-oxygenation of tryptophan alkyl esters. Ground state and photopromoted dye-tryptophan derivative interactions. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* (1996) 34:79.
4. Theodossiou T., Hothersall J. S., Woods E. A., Okkenhaug K., Jacoson J., Mac Robert A. Firefly Luciferin-activated Rose Bengal In Vitro Photodynamic Therapy by Intracellular Chemiluminescence in Transgenic NIH 3T3 Cells. *J. Cancer Research* (2003) 63:1818.
5. Frimer A. A. Singlet Oxygen. CRC Press, Boca Raton (1985).
6. Oliveros E., Suardi-Murasecco P., Aminian-Saghafi T., Braun A. M., Hanseu H. J. 1H-Phenalen-1-one : Photophysical Properties and Singlet-Oxygen Production. *Helvetica Chimica Acta* (1991) 74:79.
7. Nonell S., González M., Trull F. R. H-phenalen-1-ona-2-sulfonic acid: an extremely efficient singlet oxygen sensitizer for aqueous media. *Afinidad* (1993) 448: 445.
8. Srinivasan V. S., Podolski D., Westrick N. J., Neckers D. C. Photochemical generation of  $O_2^{\cdot-}$  by rose Bengal and  $Ru(bpy)_3^{2+}$ . *J. American Chemical Society* (1978) 100:61.
9. Lee P. C. C., Rodgers M. A. J. Laser flash photokinetic studies of rose Bengal sensitized photodynamic interactions of nucleotides and DNA. *Photochemistry and Photobiology* (1987) 45:79.
10. Posadaz A. C. Estudio cinético de procesos fotosensibilizados, mediados por oxígeno singlete, en derivados de aminoácidos, péptidos y proteínas. *Tesis Doctoral en Ciencias Químicas* (2006)
11. Litter M. Farmacología Experimental y Clínica. Sexta Edición, Editorial El Ateneo, Bs. As., Argentina (1980)
12. Connors K. A., Amidon G. L., Stella j. V. Chemical stability of pharmaceuticals: a handbook for pharmacists, part two: stability monographs. Wiley, New York (1986)
13. Chemie V. F. New Methods for Determination of  $\beta$ -lactam Antibiotics by Means of Diffuse Reflectance Spectroscopy using Polyurethane Foam as a Sorbent. *Ph.D. Thesis. Duisburg University* (2005)
14. Mensa J., Gatell M. J., Azanza J. R., Dominguez Gil A., García J. E., Jiménez de Anta M. T., Prats G. Guía terapéutica Antimicrobiana. Décimo Octava Edición, Elsevier Masson, Barcelona (2008)

15. Budavari S. The Merck Index. Thirteenth Edition, Merck and Co., Inc., Rahway, N. J. (2001)
16. Quanyun A. Xu, Lawrence A. Trissel. Stability-indicating HPLC methods for drug analysis. Third Edition, Pharmaceutical Pr. (2008)
17. Rozas O., Contreras D., Mondaca M. A., Pérez-Moya M., Mansilla H. D. Experimental design of Fenton and photo-Fenton reactions for the treatment of ampicillin solutions. *J. Hazardous Materials* (2010) 177:1025.
18. Rossiter B. W., Baetzold R. C. (Eds), *Physical Methods of Chemistry*, Vol VIII, John Wiley & Sons, Inc., New York (1993)
19. Wintgens V., Scaiano J. C., Linden S. M., Neckers D. C. Transient phenomena in the laser flash photolysis of Rose Bengal C-2' ethyl ester C-6 sodium salt. *J. Organic Chemistry* (1989) 54:5242.
20. Wilkinson F., Herman 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. Physical Chemistry* (1995) 24: 663.
21. Criado S, Bertolotti S. G, García N. A. Kinetics aspects of the rose bengal-sensitized photo-oxygenation of tryptophan alkyl esters. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* (1996) 34: 79.
22. Afanas'ev I. B. Superoxide ion: Chemistry and Biological implications. CRC, Boca Ratón, Florida (1989)
23. Reynoso E., Nesci A., Allegretti P., Criado S., Biasutti M.A. Kinetic and mechanistic aspects of sensitized photodegradation of  $\beta$ -lactam antibiotics: Microbiological implications. *Redox Report* (2012) 17:275.
24. Rizzuto F., Spikes J. D. The eosin-sensitized photooxidation of substituted phenylalanine and tyrosine. *Photochemistry and Photobiology* (1977) 25:465.
25. Koizumi M., Kato S., Mataga N., Matsuura T., Isui I. *Photosensitized Reactions*. Kagakudogin, Kyoto. (1978)
26. García N. A., Amat-Guerri F. Photodegradation of hydroxylated N-heteroaromatic derivatives in natural-like aquatic environments. A review of kinetic data of pesticida model compounds. *Chemosphere* (2005) 59: 1067.
27. García N. A. New trends in Photobiology: singlet-molecular-oxygen mediated photodegradation of aquatic phenolic pollutants. A kinetics and mechanistic overview. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* (1994) 22:185.
28. Soltermann A. T., Biasutti M. A., Carrascoso M., Amat-Guerri F., Garcia N.A. Monosubstituted naphthalenes as quenchers and generators of singlet molecular oxygen. *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (1999) 129: 25.
29. Wilkinson F., Brummer J. G. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited state of molecular oxygen in solution. *J. Physical Chemistry* (1981) 10:809.

30. Okamoto K. I., Hondo F., Itayamand A., Kusabayashi S. Kinetics of dye sensitized photodegradation of aqueous phenol. *J. Chemical Engineering of Japan* (1982) 15:368.
31. Pizzocaro C., Bolte M., Hoffman M. Z. *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (1992) 68:115.
32. Bertolotti S. G., García N. A., Arguello G. Effect of the peptide bond on the singlet molecular oxygen-mediated photooxidation of tyrosine and tryptophan dipeptides. A kinetic study. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* (1991) 10:57.
33. Bellus D. Singlet Oxygen. Reactions with Organic Compounds and Polymers. Ranby B., Rabek J. F. (Eds), Jhon Wiley and Sons, New York (1978)
34. Gorman A. A., Lovering G., Rodgers M. A. J. The Entropy-Controlled Reactivity of Singlet Oxygen ( $^1\Delta_g$ ) toward Furans and Indoles in Toluene. A Variable-Temperature study by Pulse Radiolysis. *J. American Chemical Society* (1979) 101:3050.
35. Gorman A. A., Gould I. R., Hamblett I., Standen M. C. Reversible Exciplex Formation between Singlet Oxygen,  $^1\Delta_g$ , and Vitamin E. solvent and Temperature Effects. *J. American Chemical Society* (1984) 106:6956.
36. Gorman A. A., Hamblett I., Lambert C., Spencer B., Standen M. C. Identification of both Preequilibrium and Diffusion limits for Reaction of Singlet Oxygen,  $O_2^1\Delta_g$ , with Both Physical and chemical quenchers: Variable-Temperature, Time-Resolved Infrared Luminescence Studies. *J. American Chemical Society* (1988) 110:8053.
37. Gorman A. A., Gould I. R., Hamblett I. Time-Resolved Study of solvent and Temperature Dependence of singlet Oxygen ( $^1\Delta_g$ ) Reactivity toward Enol Ethers: Reactivity Parameters Typical of Rapid Reversible Exciplex Formation. *J. American Chemical Society* (1982) 104:7098
38. Criado S. N. Fotooxidaciones sensibilizadas de compuestos de importancia biológica. *Tesis Doctoral en Ciencias Químicas* (1997)
39. Barbieri Y., Massad W., Diaz D., Sanz J., Amat-Guerri F., García N. A. Photodegradation of bisphenol A and related compounds under natural-like conditions in the presence of Riboflavin: Kinetics, Mechanism and Photoproducts. *Chemosphere* (2008) 73:564.
40. Díaz M., Luiz M., Alegretti P., Furlong J., Amat-Guerri F., Massad W., Criado S., García N. A. Visible-light-mediated photodegradation of 17 $\beta$ -estradiol: Kinetics, Mechanism and Photoproducts. *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (2009) 202:221.
41. Song W., Chen W., Cooper W. J., Greaves J., Miller G. E. Free-Radical Destruction of  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Aqueous Solution. *J. Physical Chemistry A* (2008) 112: 7411.

- 
42. Trovó A. G., Pupo Nogueira R., Aguera A., Fernandez-Alba A. R., Malato S. Degradation of the antibiotic amoxicillin by photo-Fenton process e Chemical and toxicological assessment. *Water Research* (2011) 45:1394.
43. Andreozzi R., Canterino M., Marotta R., Paxeus N. Antibiotic removal from wastewaters: The ozonation of amoxicillin. *J. Hazardous Materials* (2005) 122:243.

# CAPÍTULO V. FOTODEGRADACIÓN SENSIBILIZADA DE ANTIBIÓTICOS EN PRESENCIA DE Rf (VIT. B2)

---

## V.1. RESULTADOS

### V.1.1. Características del sensibilizador empleado

El pigmento natural Riboflavina (Rf) o vitamina B2 fue elegido como sensibilizador para este trabajo de Tesis, debido a que es capaz de absorber luz visible y fotosensibilizar la degradación de un amplio rango de sustratos vía radicales libres (Mecanismo Tipo I) o mediados por  $O_2(^1\Delta_g)$  (Mecanismo tipo II)<sup>1</sup>.

Rf es una vitamina de complejo B que pertenece al grupo de pigmentos amarillos fluorescentes llamados Flavinas, su presencia en los seres vivos resulta indispensable, es requerida para una amplia variedad de procesos celulares, principalmente aquellos relacionados con el metabolismo energético<sup>2</sup>.

Esta vitamina, presente endógenamente en todos los organismos vivos<sup>3</sup> y prácticamente en todos los tipos de agua de superficie<sup>4</sup>, es conocida por la oxidación, promovida por luz visible, sobre sustratos de interés biológico, médico y ambiental<sup>5,6,7</sup>. Es importante tener en cuenta que Rf resulta sensible a la acción de la luz. La naturaleza y la magnitud de las reacciones fotoquímicas que ocurren como consecuencia de la interacción entre la luz y Rf dependen de varios factores tales como la polaridad del solvente<sup>8</sup>, el pH del medio<sup>9,10</sup>, tipo y composición del buffer<sup>9,11,12</sup>, fuerza iónica<sup>13</sup>, contenido de oxígeno<sup>9,14</sup>, intensidad de la luz y longitud de onda<sup>15,16</sup> y pueden proceder a través de la participación del estado singlete o triplete excitado<sup>9,17</sup> de la vitamina.

En los experimentos en presencia de Rf se trabajó a pH 7,4 dado que la fotodegradación de este colorante varía considerablemente con el pH del medio. Otros autores han demostrado<sup>10</sup> que a valores de pH cercanos a 10 la velocidad de degradación es mucho mayor que a valores de pH ligeramente neutros, en los cuales se logran soluciones de Rf más estables a la luz.

En la **Figura V.1** se muestra el espectro de absorción del colorante Rf en solución reguladora de pH 7,4. Se observan dos bandas en la región visible del espectro una aproximadamente a 375 nm y la otra a 445 nm, siendo esta última, la banda que presenta la mayor absorción en la región del espectro mencionada. En el apéndice I del capítulo VIII se incluye la estructura química de este sensibilizador.

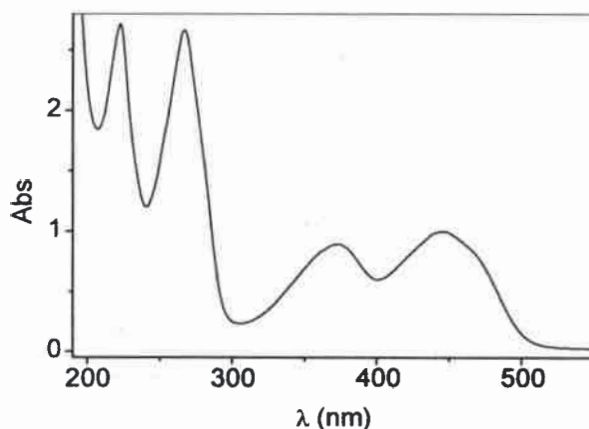


Figura V.1. Espectro de absorción normalizado del sensibilizador Rf a pH 7,4.

Los valores de pKa informados en bibliografía para este colorante son 1,7 y 10,2<sup>18</sup> de manera que, al valor de pH estudiado (7,4), Rf se presenta sin carga neta.

#### V-1.2. Fotodegradación sensibilizada de los antibióticos en presencia de Rf

Los sustratos seleccionados para este estudio fueron los antibióticos β lactámicos mencionados y caracterizados en el capítulo anterior.

La irradiación con luz visible de la mezcla Atb/Rf en solución reguladora de pH 7,4 produce cambios en el espectro de absorción de la solución. Estos cambios no pueden ser solo atribuidos a la fotodescomposición del Atb ya que Rf también sufre degradación por luz, de manera que, las modificaciones espectrales como consecuencia de la irradiación son atribuidas a las transformaciones químicas en ambos, Atb y sensibilizador.

En las **Figuras V.2** y **V.3** se muestra la evolución de los espectros de absorción de los Atb en función del tiempo de irradiación en presencia de Rf como sensibilizador.

Cabe aclarar que en la fotoirradiación de las soluciones conteniendo Atb/Rf no se observaron cambios espectrales cuando las mismas fueron mantenidas en la oscuridad, indicando que no hay asociación entre sustrato y sensibilizador en el estado fundamental.

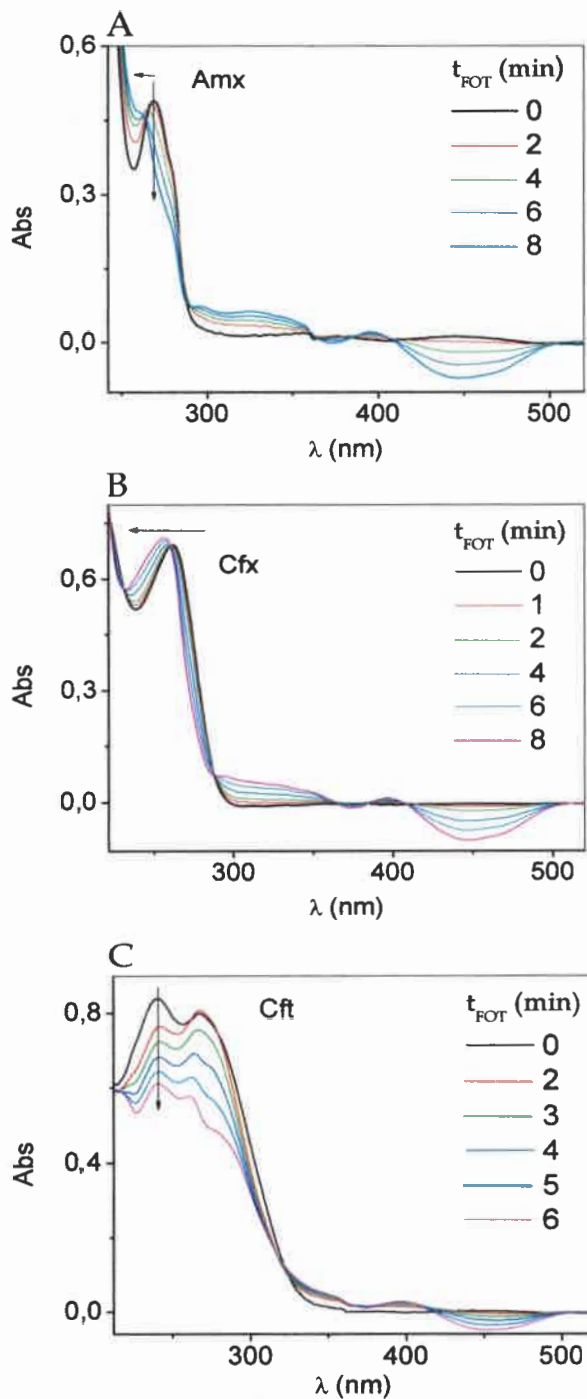


Figura V.2. Cambios en los espectros de absorción de los Atb en función del tiempo de irradiación para (A) Amx/Rf vs. Rf (B) Cfx/Rf vs. Rf, (C) Cft/Rf vs Rf en solución reguladora de pH 7,4; Abs<sub>Rf</sub><sup>445</sup> = 0,5; [Amx] = 4x10<sup>-4</sup> M; [Cfx] = 1x10<sup>-4</sup>M; [Cft] = 3x10<sup>-5</sup>M.



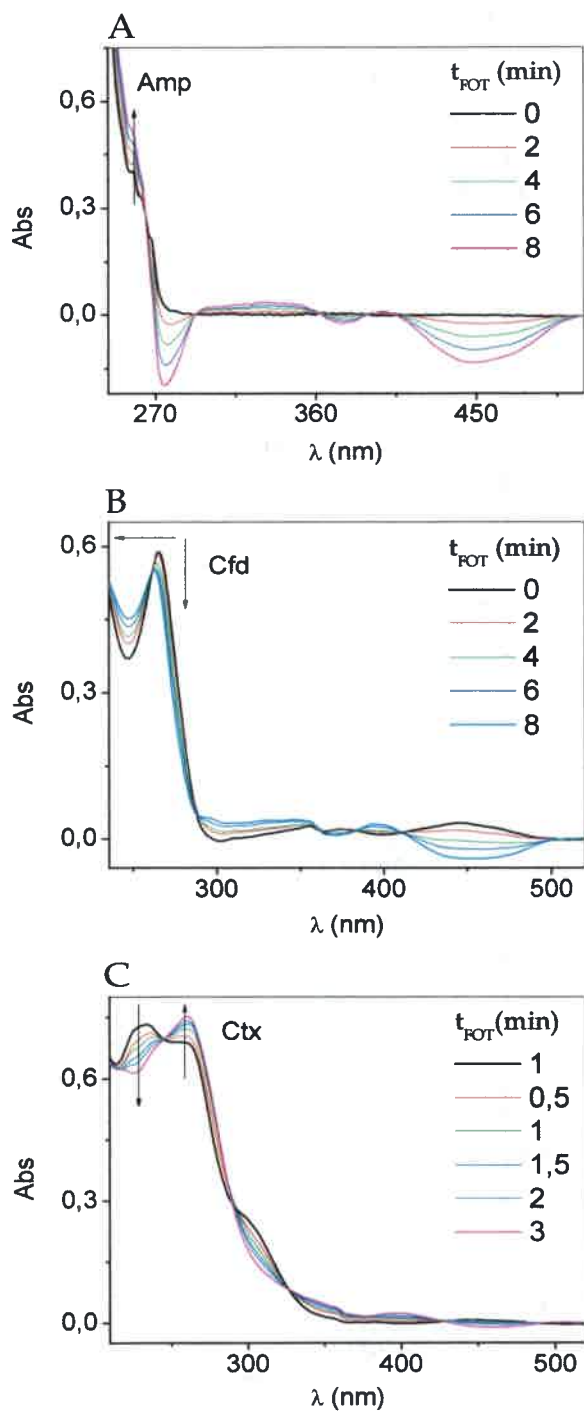


Figura V.3. Cambios en los espectros de absorción de los Atb en función del tiempo de irradiación para (A) Amp/Rf vs. Rf (B) Cfd/Rf vs. Rf, (C) Ctx/Rf vs Rf en solución reguladora de pH 7,4;  $Abs_{Rf}^{445} = 0,5$ ;  $[Amp] = 1,5 \times 10^{-3} M$ ;  $[Cfd] = 3,5 \times 10^{-5} M$ ;  $[Ctx] = 5 \times 10^{-5} M$ .

Para ciertos Atb se observa disminución de la banda de absorción máxima y corrimiento hipsocrómico a medida que aumenta el tiempo de fotólisis, tal es el caso de Amx y Cfd (Figura V.2 A y V.3 B respectivamente) mientras que para Cft solo se observa disminución del máximo de absorción (Figura V.2 C). En el caso de Cfx el corrimiento hipsocrómico está acompañado de un leve aumento en la absorbancia de la banda centrada en 260 nm, mientras que solo el aumento de la absorbancia se observa para Amp (Figura V.2 B y V.3 A respectivamente). Para Ctx la banda a 235 nm desaparece a medida que se define una nueva a 260 nm (Figura V.3 C) como consecuencia de la irradiación.

Paralelamente, la fotodegradación en condiciones anaeróbicas (por burbujeo de gas Argón) de Rf en presencia y en ausencia de los Atb, se evaluó a partir de los espectros de absorción a través de la disminución de la absorbancia a 445 nm, donde solo Rf absorbe. A modo de ejemplo, en la Figura V.4 se muestra comparativamente el espectro de absorción de una solución de Rf saturada de Argón en ausencia y presencia de Cft. En el gráfico se observa una clara disminución de la absorbancia luego de dos minutos de irradiación para Rf en ausencia del Atb como consecuencia de la inestabilidad de este sensibilizador a la acción de la luz, mientras que la presencia del mismo produce una marcada disminución en el consumo de Rf al mismo tiempo de irradiación.

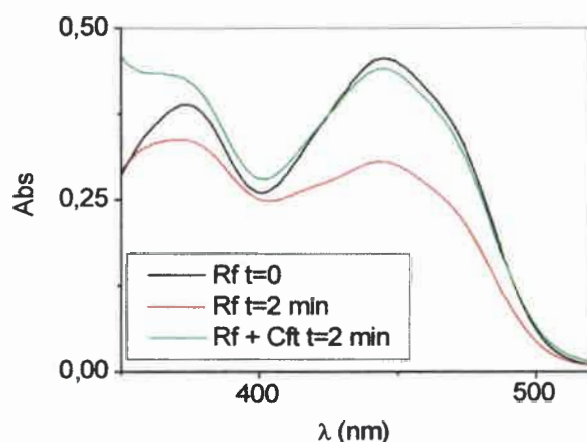


Figura V.4. Cambios en los espectros de absorción de Rf en ausencia y presencia de Cft a  $t=0$  y  $t=2$  min de irradiación, en solución saturada de Argón.  $Abs_{Rf}^{445} = 0,5$ ;  $[Cft] = 5 \times 10^{-4} M$ .

Las modificaciones espectrales como consecuencia de la irradiación fotosensibilizada en los Atb y Rf, así como la disminución en la banda a 445 nm de Rf en presencia de los

Atb y ausencia de oxígeno, resultan evidencias experimentales que podrían sugerir la existencia de interacciones químicas entre los sustratos estudiados con los estados excitados de Rf y/o con las especies reactivas de oxígeno (EROs) generadas a partir de dichos estados.

### V.1.3. Determinación de las velocidades relativas de consumo de oxígeno por los antibióticos ( $v_r$ )

La cinética de fotooxidación sensibilizada de los Atb se siguió a través del consumo de oxígeno en condiciones aeróbicas de fotoirradiación utilizando el electrodo específico de oxígeno ya descrito. Los resultados se muestran en la Figura V.5 (A y B) y se expresan en la Tabla V.1 como velocidades de consumo de oxígeno relativas al mayor valor de pendiente obtenido de los gráficos de consumo de oxígeno *vs.* tiempo de irradiación ( $v_r$ ) en presencia de Rf ó PN como sensibilizador (sección 2.3.3., capítulo II). Este último colorante, fue especialmente seleccionado para comparar la contribución solo de  $O_2(^1\Delta_g)$  ya que constituye un generador exclusivo de dicha especie<sup>19</sup> y que, como ya fue demostrado en el capítulo IV, es capaz de mediar la fotodegradación de los sustratos estudiados vía la especie reactiva de oxígeno mencionada.

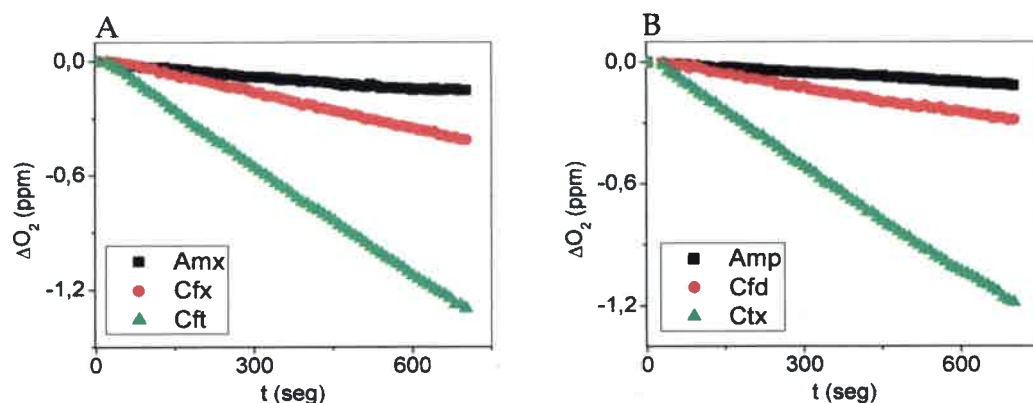


Figura V.5. Gráficos de consumo de oxígeno por los Atb en función del tiempo de fotólisis para (A) Amx, Cfx y Cft, y (B) Amp, Cfd y Ctx, en presencia de Rf como sensibilizador a pH 7,4;  $Abs_{Rf}^{445} = 0,5$ ;  $[Atb] = 5 \times 10^{-4}$  M.

Tabla V.1. Velocidades relativas de consumo de oxígeno del sistema Atb/Rf/solución reguladora de pH 7,4 ( $v_r$  Rf) y Atb/PN/solución reguladora de pH 7,4 ( $v_r$  PN); constante de velocidad para la desactivación de  $^1Rf^*$  por los Atb ( $^1k_q$ ) y constante de velocidad para la desactivación de  $^3Rf^*$  por los Atb ( $^3k_q$ )

Atb	$v_r$ (Rf)	$v_r$ (PN)	$^1k_q \times 10^{-9} M^{-1}s^{-1}$	$^3k_q \times 10^{-9} M^{-1}s^{-1}$
Amx	0,13	0,15	1,8	0,42
Amp	0,08	0,09	1,1	0,02
Cfx	0,33	0,13	2,1	0,09
Cfd	0,22	0,19	3,0	0,89
Cft	1,0	0,93	4,6	2,30
Ctx	0,91	1	3,2	2,10

Los valores poseen un 3% de error en su determinación

De acuerdo a lo observado en la **Tabla V.1** los resultados obtenidos en las experiencias de consumo de oxígeno utilizando Rf como sensibilizador son significativamente diferentes a los resultados obtenidos en presencia del colorante PN, el cual opera exclusivamente por un mecanismo que involucra a  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ), indicando que en el proceso de degradación fotosensibilizada de los Atb en presencia de Rf, existe una o más fuentes adicionales de consumo de oxígeno.

Estos resultados, conjuntamente con lo observado en los espectros de absorción de los Atb en presencia de Rf y como consecuencia de la irradiación, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, son una evidencia más que sugiere fuertemente que los estados electrónicos excitados de Rf participan en la generación de especies oxidativas y/o en la fotodegradación de los sustratos estudiados como se mencionó previamente. Para dilucidar aspectos cinéticos y mecanísticos, así como las posibles EROs involucradas en el proceso de fotodegradación de cada Atb, se desarrolló un estudio sistemático que consistió en evaluar las interacciones de los Atb con los estados excitados del sensibilizador,  $^1Rf^*$  y  $^3Rf^*$ , y las velocidades de consumo de oxígeno por los Atb en presencia de inhibidores específicos de las diferentes EROs. Los mismos se detallan a continuación.

#### V-1.4. Desactivación de $^1Rf^*$ por los antibióticos

Las posibles interacciones entre  $^1Rf^*$ - Atb fueron investigadas por métodos de fluorescencia estacionaria y resuelta en el tiempo.

Rf exhibe una intensa emisión de fluorescencia en solución acuosa equilibrada con aire, centrada aproximadamente a 520 nm, con un rendimiento cuántico reportado<sup>20,21</sup> de 0,25. En presencia de concentraciones de Atb superiores a 3 mM se produce una disminución en la intensidad de fluorescencia, no obstante la forma del espectro de emisión no se modifica. La **Figura V.6** muestra la variación de la fluorescencia de Rf en ausencia y en presencia 3 mM de Cfx y Cfd.

La interacción  $^1Rf^*$ - Atb fue cuantificada a través de la técnica de conteo de fotón único descrita en la sección 2.3.2.1, capítulo II. Se evaluaron los tiempos de vida de fluorescencia de  $^1Rf^*$  en ausencia ( $^1\tau_0$ ) y en presencia ( $^1\tau$ ) de diferentes concentraciones de Atb y luego, mediante un tratamiento de Stern-Volmer (**Figura V.7**), se determinaron las constantes de velocidad,  $^1k_q$ , que se incluyen en la **Tabla V.1**.

El decaimiento de fluorescencia de Rf en solución reguladora de pH 7,4 en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de los Atb fue monoexponencial, con un valor para el tiempo de vida de fluorescencia de Rf ( $^1\tau_0$ ) de 4,9 ns en excelente concordancia con datos publicados previamente<sup>22,23</sup>.

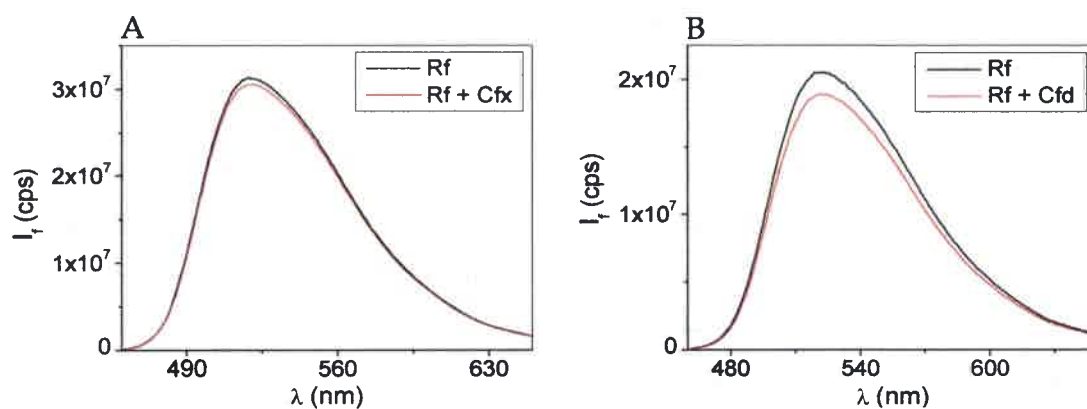


Figura V.6. Espectros de emisión de fluorescencia de Rf en presencia y en ausencia de 3 mM de (A) Cfx y (B) Cfd en solución reguladora de pH 7,4.

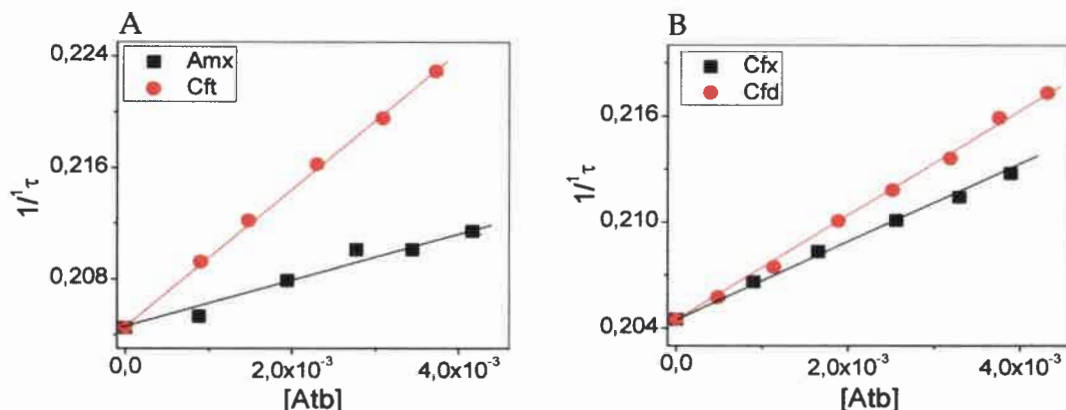


Figura V.7. Gráficos representativos de Stern-Volmer para la desactivación del estado singlete excitado de Rf por (A) Amx y Cft y (B) Cfx y Cfd en solución reguladora de pH 7,4.

Como se puede observar en la **Tabla V.1** los valores de constantes para la desactivación de  $^1Rf^*$  son elevadas, del orden de la constante de velocidad difusional en solución acuosa ( $k_{dif} = 7,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>24</sup>, aunque fueron necesarias altas concentraciones de Atb ( $> 3 \text{ mM}$ ) para desactivar efectivamente este estado excitado del sensibilizador.

#### V-1.5. Desactivación de $^3Rf^*$ por los antibiótico

La especie  $^3Rf^*$  es generada en agua<sup>25</sup> con un rendimiento cuántico de 0,5 aunque en solución reguladora de pH 7 ha sido reportado<sup>26</sup> un valor de 0.375.

La desaparición de la especie excitada  $^3Rf^*$ , generada por un pulso láser a 355 nm, en solución reguladora de pH 7,4 y en ausencia de oxígeno, fue seguida por el decaimiento de primer orden de la absorbancia a 670 nm mediante la técnica de LFF descrita en la sección 2.3.2.2 capítulo II, observándose una disminución apreciable del tiempo de vida de dicha especie en presencia de los Atb. Se determinaron los tiempos de vida de  $^3Rf^*$  en ausencia ( $^3\tau_0$ ) y en presencia ( $^3\tau$ ) de distintas concentraciones de los Atb y mediante un tratamiento de Stern-Volmer (**Figura V.8**) se obtuvieron los valores de las constantes de velocidad bimoleculares,  $^3k_q$ , que cuantifican la interacción  $^3Rf^*$ -Atb. Los resultados obtenidos se incluyen en la **Tabla V.1**.

Por otro lado, se realizaron los espectros de absorción de  $^3Rf^*$  en ausencia y en presencia de los sustratos en estudio (a una concentración de Atb que equivale aproximadamente a un 60 % de desactivación del  $^3Rf^*$ ). En la **Figura V.9** se muestran espectros representativos de  $^3Rf^*$  en ausencia y en presencia de Amx, Cfx, Cft y Ctx.

Cabe aclarar que menos del 10% de Rf es fotolizada durante la totalidad del experimento.

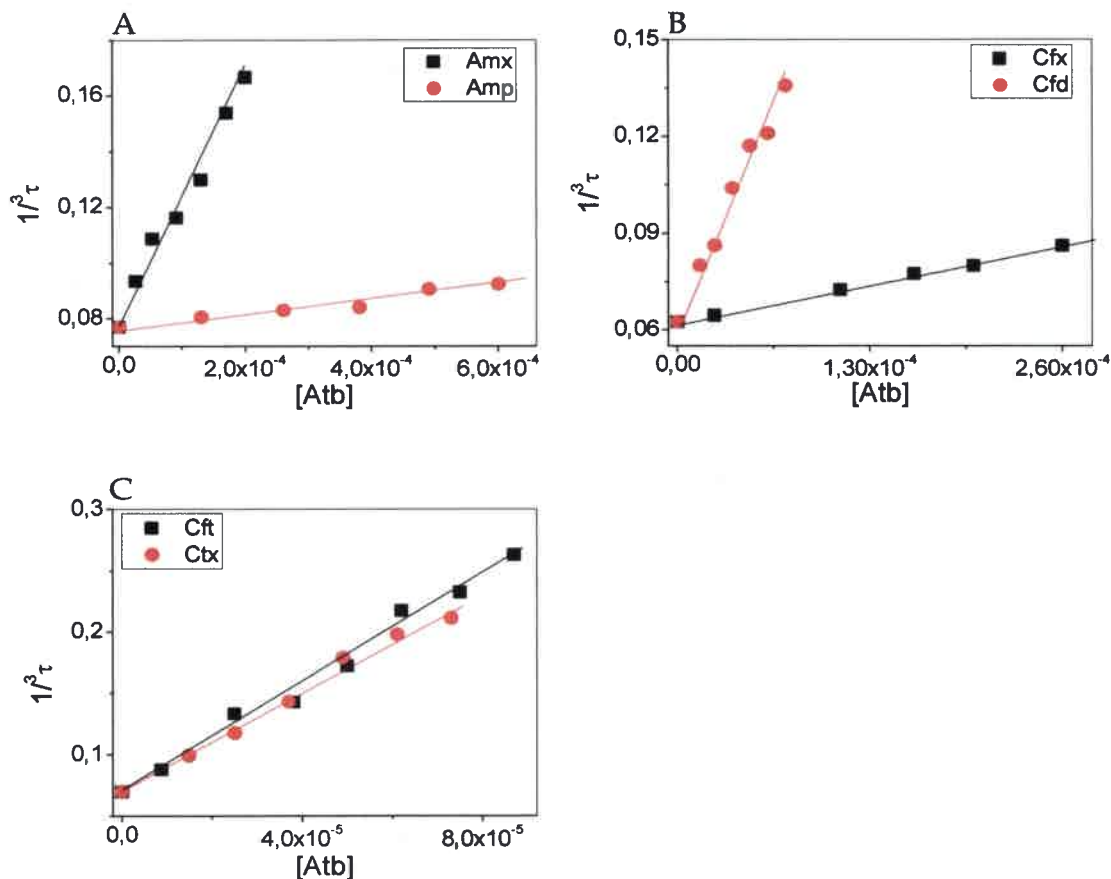
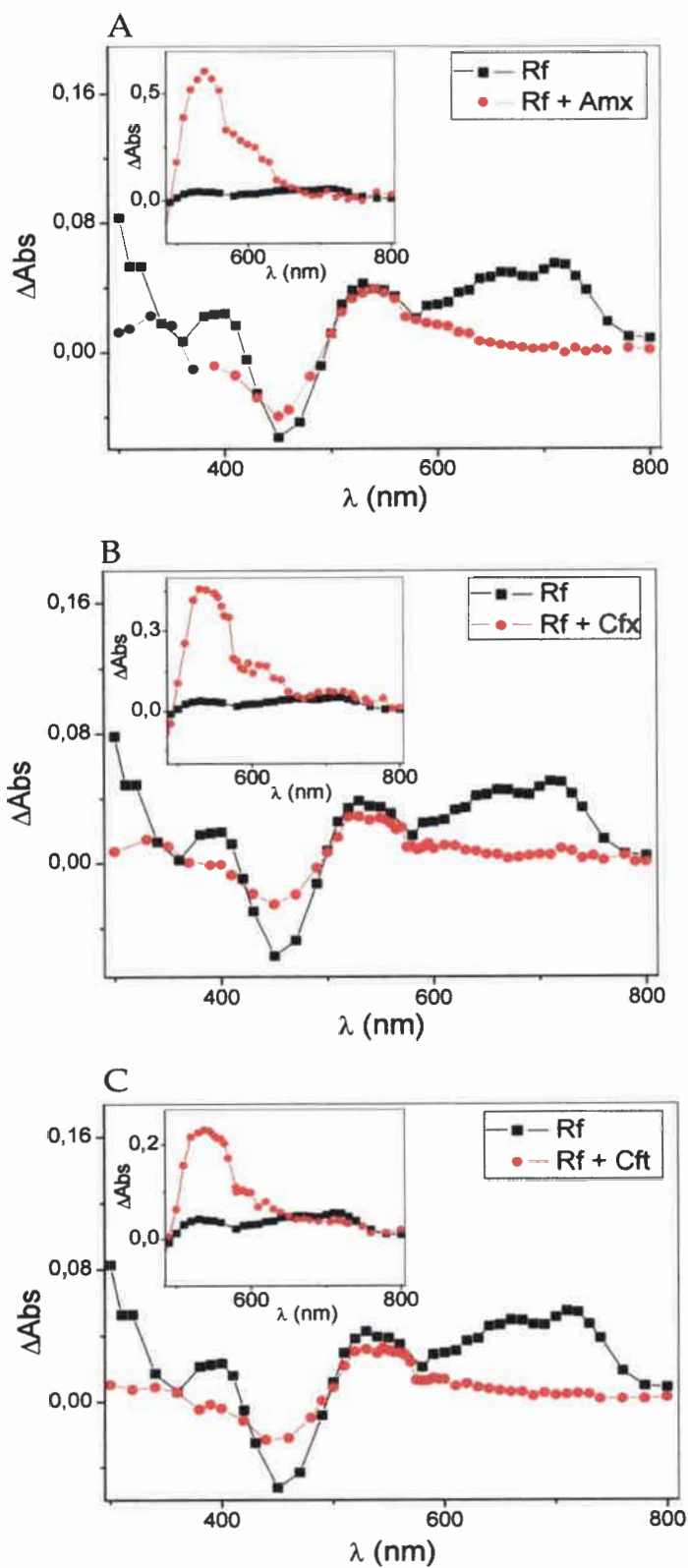


Figura V.8. Gráficos de Stern Volmer para la desactivación del estado triplete excitado de Rf por (A) Amx y Amp, (B) Cfx y Cfd, (C) Cft y Ctx en solución reguladora de pH 7,4;  $Abs_{Rf}^{445}=0,3$ .





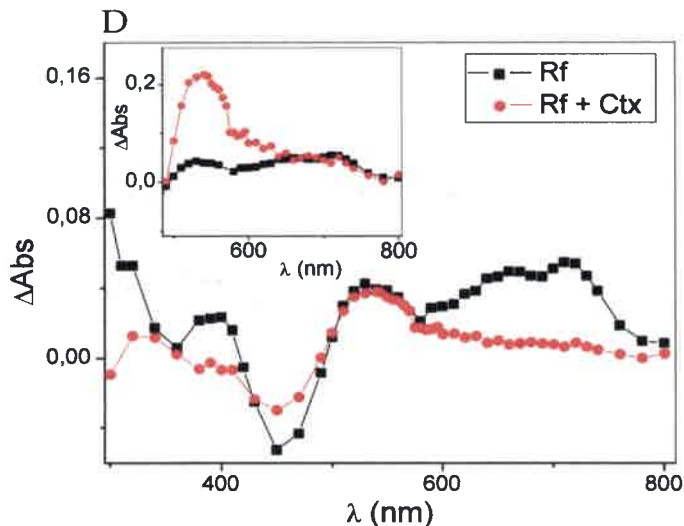


Figura V.9. Espectros de triplete de Rf en solución saturada de Argón, en ausencia y en presencia de (A) Amx (B) Cfx (C) Cft y (B) Ctx, determinados a 1 y 15  $\mu$ s después del pulso del láser para Rf y Rf + Atb respectivamente. Inserto: Espectros de triplete de Rf en solución saturada de Argón (1  $\mu$ s), en ausencia y en presencia de Atb (15  $\mu$ s) normalizados a 670 nm. [Amx]=  $3 \times 10^{-4}$  M; [Cfx]=  $6 \times 10^{-4}$  M; [Cft] = [Ctx]=  $5 \times 10^{-5}$  M.

Los valores obtenidos para  ${}^3k_q$  que se incluyen en la **Tabla V.1** son elevados y cercanos al límite difusional ( $k_{dif} = 7,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>24</sup> para Cfd, Cft y Ctx, siendo menor para Amx, Amp y Cfx. Este resultado sugiere que el  ${}^3\text{Rf}^*$  es efectivamente desactivado por los Atb en ausencia de oxígeno.

El espectro de absorción para la especie transitoria de Rf obtenido en solución reguladora de pH 7,4 en ausencia de oxígeno y sustrato, tomado a 1  $\mu$ s después del pulso del láser, coincide con espectros previamente reportados<sup>25</sup> para la especie  ${}^3\text{Rf}^*$ .

En presencia de los Atb, el espectro determinado a 15  $\mu$ s después del pulso del láser y en idénticas condiciones experimentales muestra un importante decaimiento en la zona entre 600 y 750 nm. En el inserto de las figuras, el espectro de absorción para la especie transitoria de Rf (1  $\mu$ s) es comparado con el espectro normalizado a 670 nm en presencia del Atb (15  $\mu$ s). La aparición de absorción en la región entre 500 y 600 nm es atribuida al radical neutro de Rf ( $\text{RfH}^{\bullet}$ ), como ya ha sido reportado por otros investigadores<sup>6,27,28</sup>. La especie  $\text{RfH}^{\bullet}$  es detectada como producto del proceso de transferencia de carga entre  ${}^3\text{Rf}^*$  y numerosas especies con capacidad donora de

electrones, entre las que se encuentran sustratos de importancia biológica y ambiental<sup>29,30</sup>.

Paralelamente se determinaron los rendimientos cuánticos de generación de la especie  $RfH^{\bullet}$  ( $\Phi_{RfH^{\bullet}}$ ) en solución acuosa para aquellos Atb cuyos valores de  ${}^3k_q$  resultaron ser los mayores valores observados (Cft y Ctx). Los mismos se obtuvieron experimentalmente de forma relativa al rendimiento cuántico  ${}^3Rf^*$  en el mismo solvente, tal como se explicó previamente en el capítulo II.

En la **Figura V.10** se muestra a modo representativo el decaimiento de la absorbancia de la especie transitoria de Rf en ausencia de Ctx a 670 nm y en presencia del mismo a 570 nm.

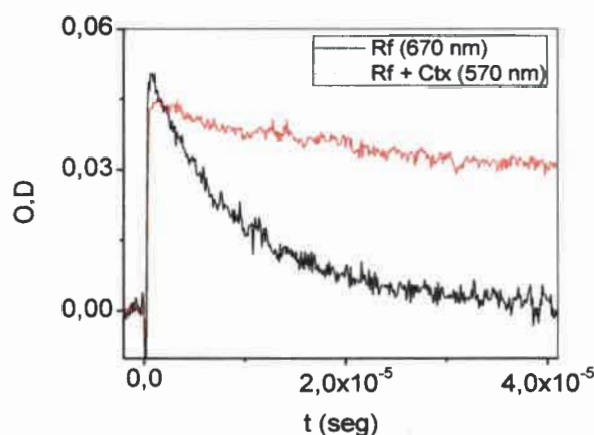


Figura V.10. Decaimiento de la absorción del transitorio de Rf en ausencia de Ctx a 670 nm y Rf en presencia de  $5 \times 10^{-5}$  M de Ctx a 570 nm en solución acuosa.  $Abs_{Rf}^{445nm} = 0,3$ .

Los valores obtenidos para los  $\Phi_{RfH^{\bullet}}$  fueron de  $0,20 \pm 0,01$  y  $0,21 \pm 0,01$  para Cft y Ctx respectivamente.

#### V-1.6. Participación de las diferentes EROs en la fotodegradación sensibilizada por Rf

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos por laser flash fotólisis y para discernir que EROs estarían involucradas en el proceso fotooxidativo, se realizaron experimentos de consumo de oxígeno en presencia de inhibidores específicos de tales especies.

Para ello se siguió el consumo de oxígeno por los Atb utilizando Rf como sensibilizador en presencia de los inhibidores específicos<sup>31- 36</sup>:  $NaN_3$  para evaluar la posible intervención de  $O_2(^1\Delta_g)$ , SOD para  $O_2^{\bullet-}$ , CAT para  $H_2O_2$  y D-manitol para la

especie HO<sup>•</sup>.

En la Figuras V.11 y V.12 se muestran los gráficos de consumo de oxígeno por los Atb obtenidos a pH 7,4 en ausencia y presencia de inhibidores y en la Tabla V.2 las correspondientes velocidades relativas calculadas como la relación entre la velocidad de consumo de oxígeno por el Atb en presencia del inhibidor y en ausencia del mismo ( $v_{inh}/v_0$ ). En la Figura V.11 además se incluye el consumo de oxígeno por parte de Rf, demostrando que a lo largo de la experiencia el consumo del sensibilizador no afecta significativamente el de los sustratos en presencia y ausencia de los inhibidores.

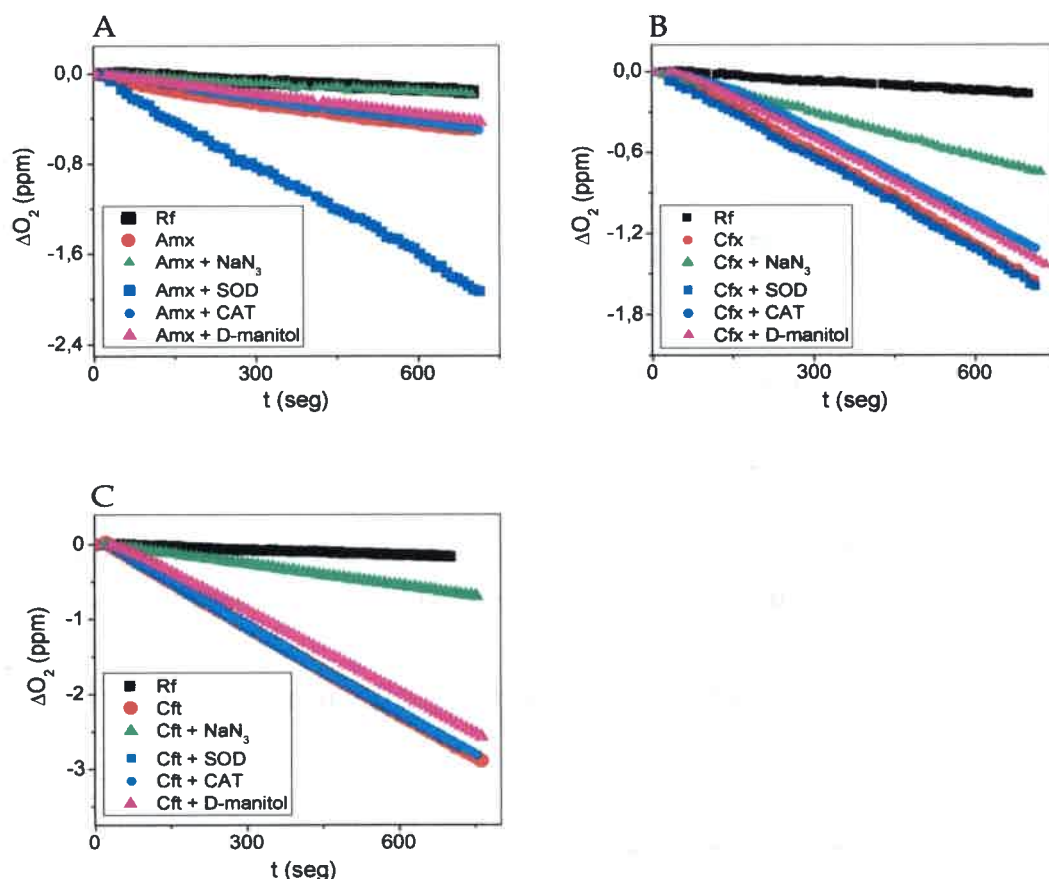


Figura V.11. Gráficos de consumo de oxígeno por los Atb en función del tiempo de fotólisis en ausencia y presencia de inhibidores específicos para (A) Amx (B) Cfx (C) Cft en Rf pH 7,4;  $Abs_{Rf}^{445} = 0,5$ ;  $[Atb] = 5 \times 10^{-4} M$ ;  $[NaN_3] = 1 mM$ ;  $[D\text{-manitol}] = 10 mM$ ;  $[SOD] = [CAT] = 1mg\%$ .

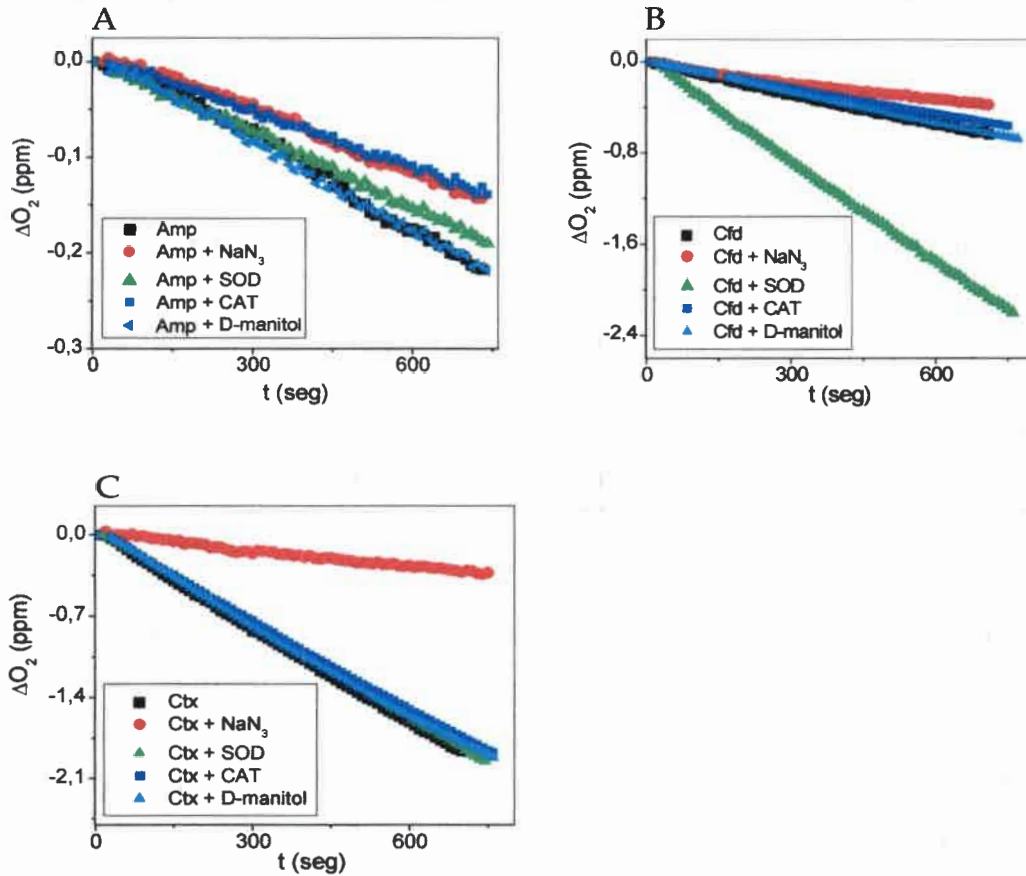


Figura V.12. Gráficos de consumo de oxígeno por los Atb en función del tiempo de fotólisis en ausencia y presencia de inhibidores específicos para (A) Amp, (B) Cfd, (C) Ctx en Rf pH 7,4;  $Abs_{Rf}^{445} = 0,5$ ;  $[Atb] = 5 \times 10^{-4} M$ ;  $[NaN_3] = 1 mM$ ;  $[D-manitol] = 10 mM$ ;  $[SOD] = [CAT] = 1 mg\%$ .

Tabla V.2. Velocidades relativas de consumo de oxígeno del sistema Atb/Rf/solución reguladora de pH 7,4 en ausencia y presencia de inhibidores específicos ( $v_{inh}/v_0$ ).  $\text{NaN}_3$  (1 mM), SOD (1 mg%), CAT (1 mg%) y D-manitol (10 M)

Atb	$v_{inh}/v_0$	Atb	$v_{inh}/v_0$	Atb	$v_{inh}/v_0$
Amx	1,0	Cfx	1,0	Cft	1,0
Amx + $\text{NaN}_3$	0,35	Cfx + $\text{NaN}_3$	0,47	Cft + $\text{NaN}_3$	0,24
Amx + SOD	3,2	Cfx + SOD	1,0	Cft + SOD	1,0
Amx + CAT	0,88	Cfx + CAT	0,94	Cft + CAT	0,91
Amx + D-manitol	0,74	Cfx + D-manitol	0,95	Cft + D-manitol	0,91
Amp	1,0	Cfd	1,0	Ctx	1,0
Amp + $\text{NaN}_3$	0,67	Cfd + $\text{NaN}_3$	0,70	Ctx + $\text{NaN}_3$	0,17
Amp + SOD	0,89	Cfd + SOD	3,3	Ctx + SOD	1,0
Amp + CAT	0,67	Cfd + CAT	0,83	Ctx + CAT	0,93
Amp + D-manitol	1,0	Cfd + D-manitol	1,0	Ctx + D-manitol	0,95

En la **Tabla V.2** y en las **Figuras V.11** y **V.12** se puede observar claramente que la presencia de  $\text{NaN}_3$  produce una disminución en la velocidad de consumo de oxígeno por todos los Atb indicando la participación de  $\text{O}_2$  ( $^1\Delta_g$ ) en la degradación fotosensibilizada por Rf. La contribución de dicha especie al proceso fotodegradativo fue cuantificada como se muestra en el capítulo IV, utilizando PN como sensibilizador. El efecto que producen los otros inhibidores en el sistema Atb/Rf, estaría confirmando que el proceso también ocurre por la vía radicalaria.

El agregado de SOD modifica la velocidad de consumo de oxígeno de Amx, Amp y Cfd confirmando la participación de la especie  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Para el caso de Amx y Cfd se observa un claro aumento en la velocidad mientras que para Amp, la presencia del inhibidor específico, SOD, genera una leve disminución en la velocidad de consumo de oxígeno.

En el caso de Cft y Ctx no se observó efecto de SOD, lo cual sugiere que la especie  $\text{O}_2^{\bullet-}$  no estaría involucrada en el proceso de fotodegradación de estos Atb. Por otro lado, la fotólisis en presencia de CAT y D-manitol disminuye, aunque levemente, la velocidad de consumo de oxígeno por Cft y Ctx, confirmando la participación de las especies  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{HO}^{\bullet}$ . Como puede observarse en la **Tabla V.2**, también resultaron sensibles a estas especies Amx, Amp, Cfx y Cfd, siendo Amx y Cfx susceptibles a ambas especies mientras que Amp y Cfd solo a  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Es importante tener en cuenta que el consumo de oxígeno para el sistema Rf/inhibidor en ausencia del Atb fue evaluado individualmente no encontrándose un efecto significativo en relación al consumo de oxígeno del sistema Rf/inhibidor/Atb, es decir las  $v_r$  en presencia del inhibidor, a los tiempos de irradiación y concentración de sensibilizador, sustrato e inhibidor utilizadas en los ensayos, se ven afectadas solo si el Atb está presente.

Paralelamente, la reacción directa entre los Atb y  $H_2O_2$  fue evaluada por la absorción de los sustratos en solución acuosa a pH 7,4 antes y después del agregado de peróxido de hidrógeno. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura V.13** para las cefalosporinas Cfx, Cfd, Cft y Ctx en ausencia y presencia de 10 mM de  $H_2O_2$ ; la disminución en la absorción luego del agregado de dicho reactivo confirma que  $H_2O_2$  es capaz de participar en la degradación de los Atb.

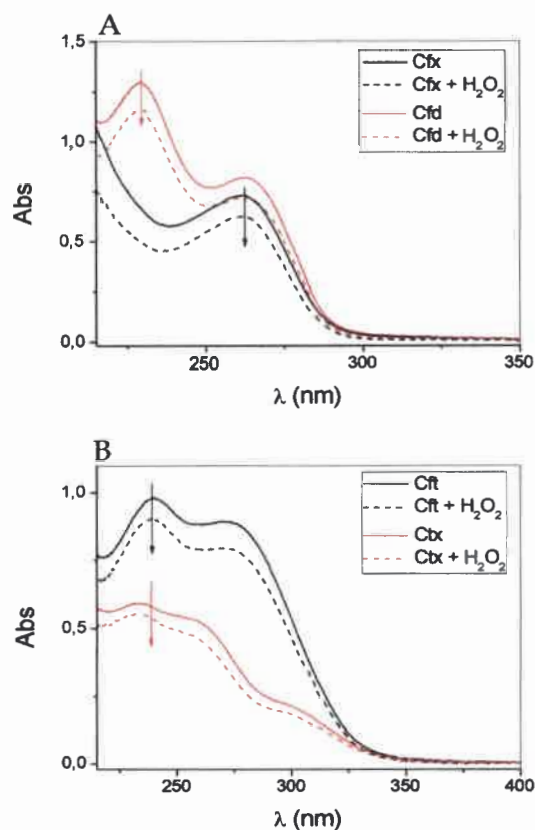
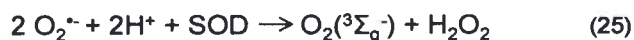
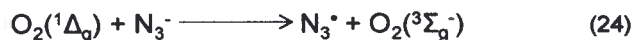
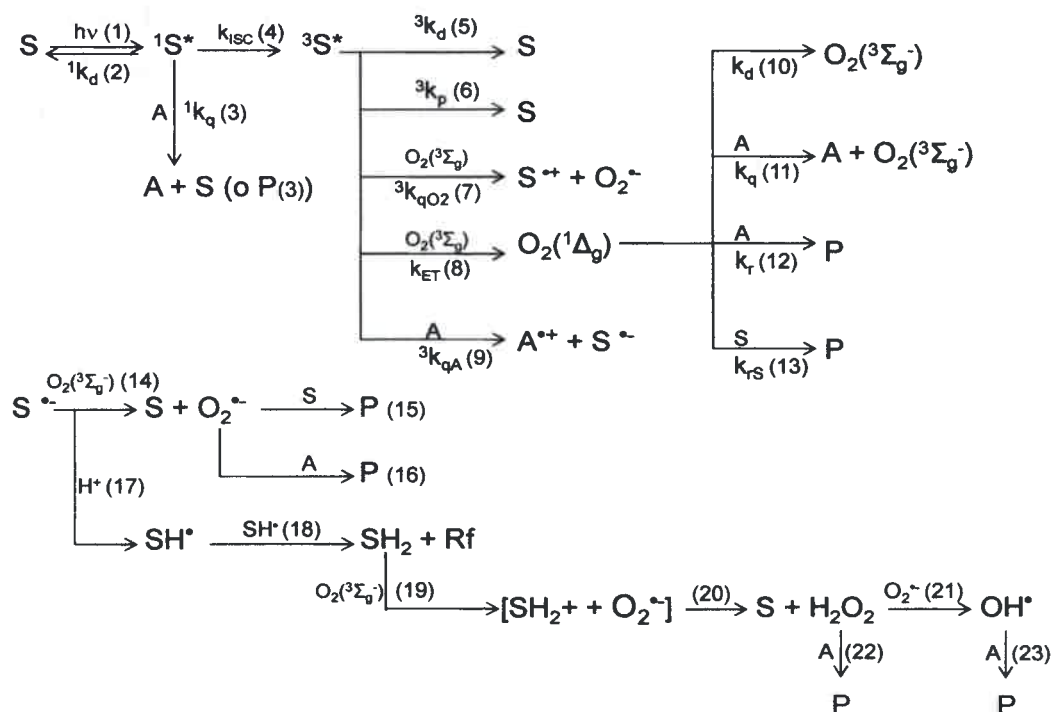


Figura V.13. Espectros de absorción de (A) Cfx y Cfd y (B) Cft y Ctx en ausencia y presencia de  $H_2O_2$  10 mM;  $[Cfx] = [Cfd] = 1 \times 10^{-4} M$ ;  $[Cft] = [Ctx] = 3 \times 10^{-5} M$ .

V-2. DISCUSIÓN

Para la interpretación y discusión de los resultados es necesario remitirnos al esquema cinético mostrado y explicado en la sección 3.4 del capítulo I. En el mismo se describen los posibles fotoprocesos que puedan estar desencadenándose cuando una solución conteniendo Rf y Atb es irradiada con luz visible en presencia de oxígeno. El esquema se presenta nuevamente a fines de facilitar la lectura y comprensión de esta sección.



Donde el sensibilizador Rf es representado en el esquema como S y los Antibióticos estudiados como A.

Como se ha demostrado en el desarrollo de este capítulo, existen claras evidencias de que la fotodegradación sensibilizada de los Atb en presencia de Rf puede ocurrir por una combinación de mecanismos Tipo I y Tipo II.

Las modificaciones en los espectros de absorción con el tiempo de irradiación tanto en la zona donde absorben los sustratos como en la zona donde absorbe Rf en presencia y ausencia de oxígeno, así como las diferencias en las  $v_r$  encontradas en presencia de este pigmento y en presencia de PN, un generador exclusivo de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ )<sup>19</sup>, sugieren fuertemente la existencia de interacciones químicas entre los Atb y los estados excitados de Rf y/o con las especies oxidativas generadas a partir de dichos estados.

Los valores de las constantes para la desactivación de  $^1Rf^*$  (reacción 3) mostrados en la Tabla V.1 resultaron similares a la constante de velocidad difusional en solución acuosa ( $k_{dif} = 7,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )<sup>24</sup>. Sin embargo, fueron necesarias elevadas concentraciones de los Atb ( $> 3 \text{ mM}$ ) para desactivar efectivamente a  $^1Rf$ , las cuales resultan considerablemente superiores a las utilizadas en los experimentos de fotólisis (0,5 mM).

En cuanto a la interacción del estado  $^3Rf^*$  con los sustratos (reacción 9), los resultados obtenidos en la determinación de  $^3k_q$  también resultaron cercanos al límite difusional, indicando que este estado excitado de Rf es efectivamente desactivado por los Atb.

Así mismo, confirmando este resultado, los espectros de absorción de especies transitorias en presencia de los Atb muestran la formación del radical neutro de Rf ( $RfH^\bullet$ ) poniendo en evidencia la transferencia de carga entre  $^3Rf^*$  y los Atb en la cual se genera el anión radical  $Rf^{\bullet-}$  y el catión radical  $Atb^{\bullet+}$ . La especie  $Rf^{\bullet-}$  luego puede ser protonada ( $pK_a = 8,3$ )<sup>37</sup> y dar lugar a la formación del radical neutro de Rf ( $RfH^\bullet$ ) (reacción 17) observado en el espectro normalizado a 670 nm. La formación de esta especie es muy eficiente<sup>38,39</sup> y la misma es capaz de generar una cascada de fotoprocesos que pueden producir EROs tales como  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  y  $HO^\bullet$  las cuales pueden reaccionar con los sustratos, tal como se muestra en el esquema.

Cabe aclarar que el catión radical  $Atb^{\bullet+}$  no pudo ser observado en los experimentos de LFF debido posiblemente a que absorbe en la misma región del espectro de transitorios donde se produce el fotoblanqueo de Rf ó en una zona fuera de los límites de detección del equipo utilizado, o bien, también es posible que este radical posea un bajo coeficiente de extinción molar lo cual dificulte su detección.



Los rendimientos cuánticos obtenidos para la generación de la especie radicalaria  $RfH^{\bullet}$  también soportan lo observado en los valores de  $^3k_q$  y en los espectros de especies transitorias, indicando que el proceso de transferencia de electrones constituye una fracción considerable en el mecanismo global de interacción.

En los experimentos de consumo de oxígeno en presencia de inhibidores se encontró que el inhibidor específico de  $O_2 (^1\Delta_g)$ ,  $NaN_3$ , cuya constante de velocidad de desactivación de dicha especie reportado<sup>32</sup> en agua es de  $3 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$  (reacción 24), produce una marcada disminución de la velocidad de consumo de oxígeno por todos los Atb indicando la participación de  $O_2 (^1\Delta_g)$  en el proceso de fotodegradación sensibilizada por Rf. Se sabe<sup>40</sup> que  $O_2 (^1\Delta_g)$  es generado por Rf por transferencia de energía entre el estado triplete excitado de Rf y el estado fundamental de oxígeno (reacción 8) con un rendimiento cuántico de 0,49; la contribución de dicha especie al proceso de fotooxidación de los Atb fue cuantificada en presencia de PN como sensibilizador, cuyos resultados fueron mostrados y discutidos en el capítulo IV.

En presencia de SOD, las velocidades de consumo de oxígeno se vieron afectadas para Amx, Cfd y Amp demostrando la participación de la especie  $O_2^{\bullet-}$  en el proceso fotodegradativo de los mismos. SOD es una enzima que cataliza la dismutación de  $O_2^{\bullet-}$  con una constante de velocidad reportada<sup>41</sup> de  $2 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$  (reacción 25) con lo cual constituye un inhibidor específico de dicha especie reactiva.

$O_2^{\bullet-}$  es generado principalmente por reacción entre oxígeno en su estado fundamental ( $O_2 (^3\Sigma_g^-)$ ) y el radical neutro de Rf (reacción 14) ya que la producción por transferencia de electrón entre Rf y  $O_2 (^3\Sigma_g^-)$  por la reacción 7 tiene un muy bajo rendimiento cuántico (0.009)<sup>21,42</sup> por lo que es considerada despreciable.

La reacción 14, cuya constante de velocidad en agua reportada<sup>28</sup> es de  $1,4 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$ , constituye, junto a la reacción 20, las vías de recuperación del estado fundamental de Rf. Este proceso es un paso elemental en los organismos vivos en donde está establecido que las EROs son intermediarios claves en la química redox del oxígeno<sup>43</sup>.

En presencia de SOD se observó aumento en la velocidad de consumo para Amx y Cfd y disminución de la misma para el caso de Amp. Para Cfx, Cft y Ctx no se observó efecto en la velocidad de consumo de oxígeno como consecuencia del agregado de la enzima.

SOD puede inhibir o estimular la oxidación mediada por  $O_2^{\bullet-}$  dependiendo del sustrato<sup>44</sup>. La disminución de la velocidad es consecuencia de la reacción de

dismutación que produce SOD sobre  $O_2^{\bullet-}$  (*reacción 25*). El aumento de la velocidad de consumo de oxígeno podría explicarse ya que como consecuencia de la dismutación de  $O_2^{\bullet-}$  por SOD aparece como producto  $H_2O_2$ , otra EROs que podría contribuir al consumo de oxígeno. Este efecto estimulante de SOD ya ha sido previamente observado en la degradación fotosensibilizada por Rf de otros compuestos como bisfenol A y  $\beta$ -estradiol<sup>45,46</sup>. Es decir, la acción de SOD frente a compuestos oxidables puede reflejarse tanto en un incremento como en una disminución en la velocidad del proceso y el resultado final dependerá de la estructura del sustrato y de su reactividad frente a la especie  $H_2O_2$ .

El efecto de la especie  $O_2^{\bullet-}$  en la fotodegradación sensibilizada por Rf se ha observado previamente para otros sustratos tales como herbicidas<sup>47</sup>, fungicidas<sup>48</sup>, fármacos<sup>39,49,50</sup>, antioxidantes comerciales<sup>51</sup>, entre otros.

Es importante aclarar que, aunque SOD se ha reportado como un desactivador de  $O_2(^1\Delta_g)$ <sup>52</sup>, el tiempo de vida de esta especie no sufre variaciones con la concentración de SOD utilizada en los experimentos, además se sabe que esta enzima no interacciona con los estados excitados del sensibilizador utilizado<sup>53</sup>.

El efecto del agregado de CAT y D-manitol, inhibidores específicos de  $H_2O_2$  y  $HO^{\bullet}$  respectivamente (*reacciones 26 y 27*), sobre la velocidad de consumo de oxígeno por parte de los Atb, también fue observada en la mayoría de los casos estudiados.

La especie  $H_2O_2$  es generada a partir de la *reacción 20* entre el sensibilizador y  $O_2^{\bullet-}$ , mientras que  $OH^{\bullet}$  se forma por la *reacción 21* entre  $H_2O_2$  y  $O_2^{\bullet-}$  (*reacción de Haber-Weiss*)<sup>54</sup>. Es decir que la formación de ambas especies reactivas requieren de la previa formación del anión radical superóxido.

En los resultados se puede observar claramente que para casos como Amx, hay efecto simultáneo de SOD, CAT y D-manitol indicando que  $O_2^{\bullet-}$  es formado y participa en la fotodegradación del Atb junto a las especies  $H_2O_2$  y  $HO^{\bullet}$  generadas a partir de  $O_2^{\bullet-}$ . Sin embargo, también se observó que para Atb como Cfx, Cft y Ctx el agregado de SOD no produce efectos en la velocidad de consumo de oxígeno, lo cual no significa que  $O_2^{\bullet-}$  no se genere, si no que esta especie no estaría participando de la fotooxidación, aunque dá lugar a la formación de las otras EROs, las cuales, como demuestran los resultados, si participarían en fotooxidación de estos Atb.

Las especies  $H_2O_2$  y/o  $HO^{\bullet}$  generados por fotosensibilización en presencia de Rf se las ha encontrado como responsables de la degradación de diversos compuestos entre los

que se pueden mencionar descongestivos oculares imidazólicos<sup>53</sup>, pesticidas fenólicos<sup>55</sup>, antioxidantes fenólicos sintéticos<sup>56</sup>, ciertos antiinflamatorios<sup>57</sup>, entre otros. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la utilización de D-manitol para verificar si el mecanismo de fotodegradación involucra la especie HO• puede ser cuestionable en el sentido de que este inhibidor es un atrapador de radicales, pudiendo también reaccionar con el radical del sustrato o con otros radicales que eventualmente puedan generarse en el medio. La determinación de  $v_r$  de consumo de oxígeno en ausencia y presencia de D-manitol como inhibidor (reacción 27) puede dar una idea si el mecanismo involucra o no a HO• aunque posiblemente no sea un método que demuestre indefectiblemente la generación y/o participación de dicha especie.

Si bien existen evidencias experimentales que demuestran la presencia de mecanismos de fotodegradación que operan simultáneamente (mecanismos Tipo I y II), el predominio de uno u otro dependerá de la competencia entre el  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  y los Atb por el estado  $^3Rf^*$ . Dicha competencia puede evaluarse en términos cinéticos analizando la velocidad del proceso de transferencia de energía entre  $^3Rf^*$  y  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  (reacción 8) en relación a la velocidad del proceso de transferencia de carga entre  $^3Rf^*$  y Atb (reacción 9). Es comúnmente aceptado que la desactivación de  $^3Rf^*$  ocurre con una constante de velocidad de transferencia de energía,  $k_{ET}$ , que es aproximadamente 1/9 del valor difusional<sup>58</sup>. Teniendo en cuenta los valores de  $k_{ET}$  informados<sup>24</sup> en H<sub>2</sub>O, podemos asumir un valor de  $k_{ET}$  igual a  $7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y considerando una concentración de oxígeno disuelto en solución saturada en aire de 0,2 mM, podemos decir que bajo nuestras condiciones experimentales ( $[Atb] = 0,5 \text{ mM}$ ):

- Para Amx y Cfd los mecanismos resultan competitivos ya que  $^3k_q [Atb] \cong k_{ET} [O_2(^3\Sigma_g^-)]$ . Claras evidencias de esto se observan no solo en los valores de  $^3k_q$  sino también en los experimentos de consumo de oxígeno con los inhibidores NaN<sub>3</sub> y SOD, el primero frena radicalmente la reacción mientras que el segundo la acelera, indicando la participación de las especies  $O_2(^1\Delta_g)$  y  $O_2^{\cdot-}$  en la fotodegradación de estos Atb, así como también la participación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y HO• evidenciado por el efecto de CAT y D-manitol en la velocidad de consumo de oxígeno.
- Para Amp y Cfx el mecanismo que prevalece es el mediado por  $O_2(^1\Delta_g)$  (mecanismo Tipo II) ya que  $^3k_q [Atb] < k_{ET} [O_2(^3\Sigma_g^-)]$ , los menores valores de  $^3k_q$  fueron

obtenidos para estos Atb, sumado al hecho de que en los experimentos con inhibidores un claro efecto de  $\text{NaN}_3$  fue observado mientras que en presencia de los otros inhibidores prácticamente no se observó una modificación significativa en las velocidades de consumo de oxígeno.

- Para Cft y Ctx  $^3k_q [\text{Atb}] > k_{ET} [\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)]$  por lo que predomina principalmente la vía radicalaria. Los experimentos con inhibidores para estos Atb muestran marcado efecto de  $\text{NaN}_3$ , no hay efecto de SOD y muy poco efecto de CAT y D-manitol, esto estaría indicando que las especies  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{HO}^{\cdot}$  son generadas vía  $^3\text{Rf}^*$  por el mecanismo Tipo I como lo indican los experimentos de LFF (los mayores valores de  $^3k_q$  fueron obtenidos para estos Atb), pero Cft y Ctx resultan poco sensibles a las mismas, mientras que son sensibles a la acción de  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  generado por el mecanismo Tipo II.

### V-3. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos y discutidos en este capítulo demuestran que Rf es capaz de sensibilizar la fotodegradación de Atb  $\beta$  lactámicos de las familias de las penicilinas y las cefalosporinas tanto por la vía radicalaria como mediados por la especie  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ .
- Los Atb interactúan con los estados electrónicos excitados de Rf y con las EROs generadas a partir de dichos estados ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{HO}^{\cdot}$ ) así como con  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  generado por transferencia de energía entre el estado triplete excitado del sensibilizador y el oxígeno en su estado fundamental.
- Para Amx y Cfd los mecanismo de fotodegradación sensibilizada resultaron competitivos, para Amp y Cfx prevalece la fotodegradación vía  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  y para Cft y Ctx el mecanismo predominante es la vía radicalaria.

La importancia de estos resultados radica principalmente en que a esta clase de antibióticos se los ha considerado en los últimos años como una nueva clase de contaminantes de reservorios de agua, capaces de alterar el ecosistema y contribuir a la proliferación de cepas altamente resistentes a los mismos<sup>59,60</sup>. Los antibióticos  $\beta$  lactámicos, ampliamente usados en medicina humana, se eliminan del organismo tal

cual como fueron administrados, sumado a su amplio uso en medicina veterinaria, en agricultura y acuicultura, y a que no son biodegradables ni susceptibles a los tratamientos de aguas<sup>61,62</sup>, es inevitable su bioacumulación y consecuentemente los efectos negativos que su presencia genera en el medio ambiente<sup>63</sup>.

Dado que Riboflavina se encuentra distribuida en cantidades trazas en ríos, lagos y océanos<sup>4,6,64</sup> y se la ha asociado a la fotodegradación sensibilizada de una gran variedad de contaminantes de agua como pesticidas<sup>55</sup>, herbicidas<sup>47</sup>, fungicidas<sup>29,48</sup>, desechos industriales<sup>45</sup>, gran variedad de fármacos<sup>23,39,49,50,53,57,65</sup>, etc., podemos decir entonces que, en función de los resultados obtenidos, la fotodegradación sensibilizada en presencia de este pigmento podría constituir un medio que contribuya a la disminución de antibióticos en ambientes acuáticos. Por otro lado, la información mecanística y cinética presentada puede ayudar a comprender los potenciales procesos fotodegradativos que puedan estar operando en dicho ambiente.

**V-4. REFERENCIAS**

1. Taylor M. B., Radda G. K. Flavins as photosensitizers. *Methods in Enzymology* (1971) 18:496.
2. Edwards A. M. General Properties of Flavins. Photochemistry and Photobiology. Silva E., Edwards A. M. (Eds). *The Royal Society of Chemistry* (2006)
3. Edwards A. M., Silva E. Effect of visible light on selected enzymes vitamins and amino acids. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* (2001) 63:126.
4. Momzikoff A., Santus R., Giraud M. A study of the photosensitizing properties of seawater. *Marine Chemistry* (1983) 12:1.
5. Straight R. C., Spikes J. D. Singlet Oxygen. Frimer A. A. (Ed), CRC Press, Boca Ratón, Florida (1985).
6. Chacon J. N., McLearnie J., Sinclair R. S. Singlet oxygen yields and radical contributions in the dye-sensitised photo-oxidation in methanol of esters of polyunsaturated fatty acids (oleic, linoleic, linolenic and arachidonic). *Photochemistry and Photobiology* (1988) 47:647.
7. Edwards A. M., Silva E. Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* (2001) 63:126.
8. Song P.S. Chemistry of flavins in their excited states. *Flavins and Flavoproteins*. H. Kamin (Ed), University Park Press, Baltimore (1971) 37:1.
9. Schuman Jorns M., Schollhammer G., Hemmerich P. Intramolecular addition of the riboflavin side chain. Anion-catalysed neutral photochemistry. *European Journal of Biochemistry* (1975) 57:35.
10. Ahmad I., Fasihullah Q., Noor A., Ansari I. A., Ali Q. N. M. Photolysis of riboflavin in aqueous solution: a kinetic study. *International Journal of Pharmaceutics* (2004) 280:199.
11. Ahmad I., Fasihullah Q., Vaid F. H. M. A study of simultaneous photolysis and photoaddition reactions of riboflavin in aqueous solution. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* (2004) 75:13.
12. Ahmad I., Fasihullah Q., Vaid F. H. M. Effect of phosphate buffer on photodegradation reactions of riboflavin in aqueous solution. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* (2005) 78:229.
13. Sato Y., Chaki H., Suzuki Y. Biphasic photolysis of riboflavin. III. Effect of ionic strength on the photolysis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin, Japan* (1984) 32:1232.
14. Treadwell G. E., Cairns W. L., Metzler D. E. Photochemical degradation of flavins. V. Chromatographic studies of the products of photolysis of riboflavin. *J. Chromatography* (1968) 35:376.
15. Sato Y., Yokoo M., Takahashi S., Takahashi T. Biphasic photolysis of riboflavin with a low-intensity light source. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin, Japan* (1982) 30:1803.

16. Ahmad I., Fasihullah Q., Vaid F. H. M. Effect of light intensity and wavelengths on photodegradation reactions of riboflavin in aqueous solution. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* (2006) 82:21.
17. Cairns W. L., Metzler D.E. Photochemical degradation of flavins. VI. A new photoproduct and its use in studying the photolytic mechanism. *J. American Chemical Society* (1971) 93:2772.
18. Budavari S. (Ed.) The Merck Index. Eleventh Edition, Merck & Co., Inc., Rahway, N. J. (1989)
19. Nonell S., González M., Trull F. R. H-phenalen-1-ona-2-sulfonic acid: an extremely efficient singlet oxygen sensitizer for aqueous media. *Afirmidad* (1993) 448: 445.
20. Weber G., Teale F. W. J. Fluorescence excitation spectrum of organic compounds in solution. *J. Transaction of the Faraday Society* (1958) 54:640.
21. Heelis P. F. The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazines). *Chemical Society Reviews* (1982) 11:15.
22. Bertolotti S. G., Previtali C. M., Rufs A. M., Encinas M. V. Riboflavin/triethanolamine as photoinitiator system of vinyl polymerization. A mechanistic study by laser flash photolysis. *Macromolecules* (1999) 32:2920.
23. Criado S. N., A. García N. A. Vitamin B2-sensitised photooxidation of the ophthalmic drugs Timolol and pindolol. Kinetics and mechanism. *Redox Report* (2004) 9:291.
24. Turro N. J., Ramamurthy V., Scaiano J. C. Principles of molecular Photochemistry-An Introduction. *University Science Books, California* (2009)
25. Orellana B., Rufs A. M., Encinas M. V., Previtali C. M., Bertolotti S. The photoinitiation mechanism of vinyl polymerization by riboflavin/triethanol amine in aqueous medium. *Macromolecules* (1999) 32:6570.
26. Islam S. D. M., Penzkofer A., Hegemann P. Quantum yield of triplet formation of riboflavin in aqueous solution and of flavin mononucleotide bound to the LOV1 domain of Phot1 from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemical Physics* (2003) 291:97.
27. El Hanine-Lmoumene C., Lindqvist L. Stepwise twophoton excitation of 1,5-dihydroflavin mononucleotide: study of flavosemiquinone properties. *Photochemistry and Photobiology* (1997) 66:591.
28. Lu C., Bucher G., Sander W. Photoinduced interactions between oxidized and reduced lipoic acid and riboflavin (vitamin B2). *Chemical Physics* (2004) 5:47.
29. Haggi E., Bertolotti S., Miskoski S., Amat-Guerri F., García N. A. Environmental photodegradation of pyrimidine fungicides. Kinetics of the visible-light-promoted interactions between riboflavin and 2-amino-4-hydroxy-6-methylpyrimidine. *Canadian Journal of Chemistry* (2002) 80:62.

30. Pajares A., Bregliani M., Montaña P., Criado S., Massad W., Gianotti J., Gutiérrez I., García N. A. Visible-light promoted photoprocesses on aqueous gallic acid in the presence of riboflavin. Kinetics and mechanism. *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (2010) 209:89.
31. Wilkinson F., Brummer J. G. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *J. Physical and Chemical Reference Data* (1981) 10:809.
32. Wilkinson F., Helman W., Ross A. B. Rate constants for the decay of the lowest electronically excited singlet state molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *J. Physical and Chemical Reference Data* (1995) 24:663.
33. Zang P. G., Misra H. P. EPR kinetic studies of superoxide radicals generated during the autoxidation of 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium, a bioactivated intermediate of parkinsonian-inducing neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Biological Chemistry* (1992) 267:23601.
34. Tratnyek P. G., Hoigné J. Oxidation of substituted phenols in the environment. A QSAR analysis of rate constants for reactions with singlet oxygen. *J. Environmental Science and Technology* (1991) 25:1596.
35. Silva E., Ugarte R., Andrade A., Edwards A. M. Riboflavin-sensitized photoprocesses of tryptophan. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* (1994) 23:43.
36. Iuliano L., Pratico D., Ghiselli A., Bonavita M. S., Violi F. Reaction of dipyridamole with hydroxyl radical. *Lipids* (1992) 27:349
37. Lu C. Y., Lin W. Z., Wang W. F., Han Z. H., Yao S. D., Lin N. Y. Riboflavin (VB2) photosensitized oxidation of 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate (dGMP) in aqueous solution: a transient intermediates study. *Chemical Physics* (2000) 2:329.
38. Massad W., Bertolotti S., García, N. A. Visible-light-induced degradation of medicaments. Kinetics and mechanism of the Vitamin B2-sensitized photooxidation of Isoproterenol. *Photochemistry and Photobiology* (2004) 79: 428.
39. Massad W., Bertolotti S., Romero M., García N. A. A kinetic study on the inhibitory action of sympathomimetic drugs towards photogenerated oxygen active species. The case of phenylephrine. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* (2005) 80:130.
40. Wilkinson F., Helman W. P., Ross A. B. Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *J. Physical Chemistry Reference Data* (1993) 22:113.
41. Petasne R. G., Zika R. G. Fate of superoxide in coastal sea water. *Nature* (1987) 316:518.
42. Krishna C. M., Uppuluri S., Riesz P., Zigler J. S., Balasubramanian D. A study of the photodynamic efficiencies of some eye lens constituents. *Photochemistry and Photobiology* (1991) 54:51.



43. Kanofsky J. R. Singlet oxygen production from the reactions of superoxide ion in aprotic solvents: Implications for hydrophobic biochemistry. *Free Radical Research Communications* (1991) 87:12.
44. Afanas'ev I. B. Superoxide ion: Chemistry and Biological implications. CRC, Boca Ratón, Florida (1989)
45. Barbieri Y., Massad W., Diaz D., Sanz J., Amat-Guerri F., García N. A. Photodegradation of bisphenol A and related compounds under natural-like conditions in the presence of Riboflavin: Kinetics, Mechanism and Photoproducts. *Chemosphere* (2008) 73:564.
46. Díaz M., Luiz M., Alegretti P., Furlong J., Amat-Guerri F., Massad W., Criado S., García N. A. Visible-light-mediated photodegradation of 17 $\beta$ -estradiol: Kinetics, Mechanism and Photoproducts. *J J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (2009) 202:221.
47. Massad W., Criado S., Bertolotti S., Pajares A., Gianotti J., Escalada J. P., Amat-Guerri F., García N. A. Photodegradation of the herbicide Norflurazon sensitised by Riboflavin. A kinetic and mechanistic study. *Chemosphere* (2004) 57:455.
48. Escalada J. P., Pajares A., Gianotti J., Massad W., Bertolotti S., Amat-Guerri F., García N. A. Dye-sensitized photodegradation of fungicide carbendazim and related benzimidazoles. *Chemosphere* (2006) 65:273.
49. Diaz M., Luiz M., Bertolotti S., Miskoski S., García N. A. Scavenging of photogenerated singlet molecular oxygen and superoxide radical anion by sulphur drugs. Kinetic and mechanism. *Canadian Journal of Chemistry* (2004) 82:1752.
50. Castillo C., Criado S., Díaz M., García N. A. Riboflavin as a sensitizer in the photodegradation of tetracyclines. Kinetics, mechanism and microbiological implications *Dyes and Pigments* (2007) 72:178.
51. Criado S., Allevi C., Ceballos C., García N. A. Visible-light promoted degradation of the commercial antioxidants butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT): a kinetic study. *Redox Report* (2007) 12:282.
52. Lee J., Matheson I. B. C., Wampler J. E., Etheridge R. D., Curry N. U. *Fed. Proc., Fed. American Societies for Experimental Biology* (1973) 32:661.
53. Criado S., García N. A. A Comparative Kinetic and Mechanistic Study Between Tetrahydrozoline and Naphazoline Toward Photogenerated Reactive Oxygen Species. *Photochemistry and Photobiology* (2010) 86:23.
54. Haber F., Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceeding of the Royal Society A* (1934) 147:332.
55. Escalada J. P., Pajares A., Gianotti J., Biasutti A., Criado S., Molina P., Massad W., Amat-Guerri F., García N. A. Photosensitized degradation in water of the phenolic pesticides bromoxynil and dichlorophen in the presence of riboflavin, as a model of their natural

- photodecomposition in the environment. *J. Hazardous Materials* (2011) 186:466.
56. Criado S., Allevi C., García N. A. Visible-light-promoted degradation of the antioxidants propyl gallate and t-butylhydroquinone: Mechanistic aspect. *Redox Report* (2012) 17:131.
57. Purpora R., Massad W., Ferrari G., Reynoso E., Criado S., Miskoski S., Pajares A., García N. A. The NAIDs indomethacin and diflunisal as scavengers of photogenerated reactive oxygen species. *Photochemistry and Photobiology* (2013) 89:1463.
58. Koizumi M., Kato S., Mataga N., Matsuura T., Isui I. *Photosensitized Reactions*. Kagakudogin, Kyoto (1978)
59. Bailón-Pérez M. I., García-Campaña A. M., Cruces-Blanco C., del Olmo Iruela M. Trace determination of  $\beta$ -lactam antibiotics in environmental aqueous samples using off-line and on-line preconcentration in capillary electrophoresis. *J. Chromatography A*. (2008) 1185:273.
60. Kümmerer K. Resistance in the environment. *J. Antimicrobial Chemotherapy* (2004) 54:311.
61. Kümmerer, K. Antibiotics in the aquatic environment – a review – part I. *Chemosphere* (2009) 75: 417.
62. Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment – a review – part II. *Chemosphere* (2009) 75: 435.
63. Andreozzi R., Canterino M., Marotta R., Paxeus N. Antibiotic removal from wastewaters: The ozonation of amoxicillin. *J. Hazardous Materials* (2005) 122:243.
64. Benassi C. A., Scoffone E., Galiazzo G., Jori G. Proflavin-sensitized photooxidation of tryptophan and related peptides. *Photochemistry and Photobiology* (1967) 28:857.
65. Posadaz A., Sánchez E., Gutiérrez M. I., Calderón M., Bertolotti S., Biasutti M. A., García N. A. Riboflavin and Rose bengal sensitized photooxidation of sulphathiazole and succinylsulphathiazole. Kinetic study and microbiological implications. *Dyes and Pigments* (2000) 45:219.

# CAPÍTULO VI. DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS

## VI-1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VI-1.1. Curvas de crecimiento de las cepas estudiadas

La D.O de una suspensión microbiana realizada con cada una de las cepas estudiadas, fue seguida en función del tiempo de incubación a 660 nm, como se explica en la sección 3.3.1 del capítulo II. Las curvas de crecimiento obtenidas se muestran en la siguiente figura.

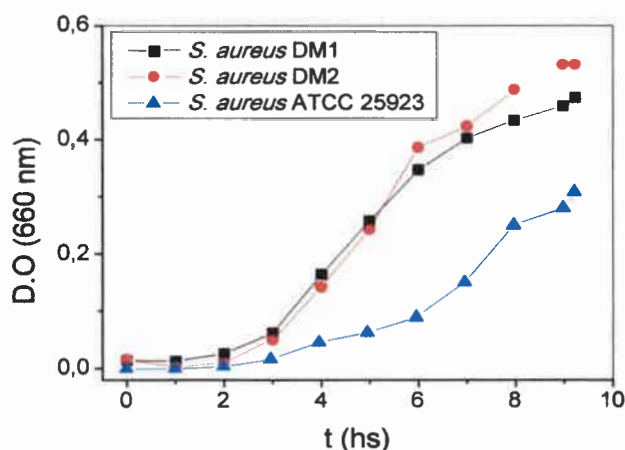


Figura VI.1. Curvas de crecimiento de las cepas de *S. aureus* DM1, DM2 y ATCC 25923.

Como se puede observar en la **Figura VI.1**, para las tres cepas se obtuvieron curvas típicas de crecimiento bacteriano<sup>1</sup> en las cuales se pueden distinguir claramente tres fases: una fase de latencia, una fase de crecimiento exponencial o “fase log” y una fase estacionaria. La fase de muerte, que normalmente comienza entre las 18-20 hs de cultivo para esta clase de microorganismo, no se muestra en la figura.

Durante la **fase de latencia** las bacterias se adaptan a las condiciones de crecimiento del medio. Corresponde al período en el que los microorganismos maduran y aún no se dividen. Durante esta fase se produce la síntesis de ARN, enzimas y otros metabolitos necesarios.

Tanto para *S. aureus* DM1 como para DM2 esta etapa dura aproximadamente unas 2 horas mientras que para la cepa ATCC 25923 se extiende hasta 3 horas.

La **fase de crecimiento exponencial** es un período caracterizado por la duplicación celular<sup>2</sup>. Se trata de un proceso de elevada actividad metabólica que conlleva a un aumento exponencial de la masa bacteriana. Si el crecimiento no se limita, la duplicación continuará a un ritmo constante.

Durante esta fase los microorganismos resultan mucho más sensibles a condiciones adversas que puedan presentarse, especialmente a la presencia de aquellos antimicrobianos que ejercen su efecto en pasos importantes del crecimiento, como los son los  $\beta$  lactámicos<sup>3</sup>.

En este caso, para las tres cepas estudiadas, la fase de crecimiento exponencial tiene una duración de 6-7 horas aproximadamente, comenzando inmediatamente luego de la fase de latencia.

Cabe aclarar que la cepa *S. aureus* ATCC 25923 muestra un crecimiento más lento respecto de las otras dos, alcanzando menor D.O a un mismo tiempo de incubación.

Durante la **fase estacionaria**, la tasa de crecimiento disminuye como consecuencia del agotamiento de nutrientes (fundamentalmente de oxígeno, en el caso de aerobios) y acumulación de productos tóxicos. Esta fase se caracteriza por un valor constante del número de bacterias, es decir la población se estabiliza dado que la tasa de crecimiento se iguala con la tasa de muerte bacteriana<sup>3</sup>. Para las cepas estudiadas esta fase comienza unas 9 horas aproximadamente, luego de iniciada la curva.

Resultados similares en cuanto a la duración de las fases obtenidas en las curvas de crecimiento de las cepas estudiadas fueron encontrados por otros autores, en condiciones experimentales diferentes y para otras cepas de *S. aureus*<sup>4,5</sup>.

Paralelamente, se realizaron curvas de crecimiento en presencia del sensibilizador RB, el cual fue posteriormente utilizado en los ensayos de fotólisis que se presentan en la sección 1.4 de este capítulo.

En la **Figura VI.2** se muestran comparativamente las curvas de crecimiento del microorganismo *S. aureus* DM1 en ausencia y en presencia del colorante RB.

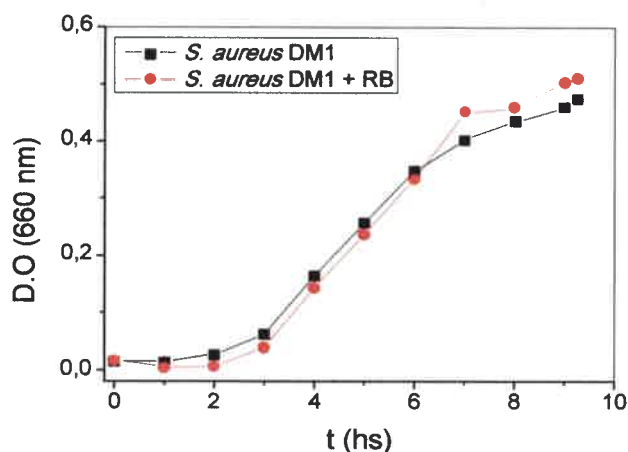


Figura VI.2. Curva de crecimiento de *S. aureus* DM1 en ausencia y presencia de RB ( $Abs_{RB}^{549} = 0,5$ ).

El resultado obtenido prueba claramente que el sensibilizador no posee ningún efecto sobre el crecimiento del microorganismo, hecho que también fue demostrado en los experimentos de sensibilidad por difusión en placa que se exponen más adelante.

Por último las curvas también fueron realizadas en presencia de los antibióticos. A continuación se muestran los resultados obtenidos para las cepas *S. aureus* DM1 y ATCC 25923 en presencia de Amx, Cfx y Cft a una concentración igual a su CIM (concentración mínima inhibitoria determinada en la sección 1.2 de este capítulo).

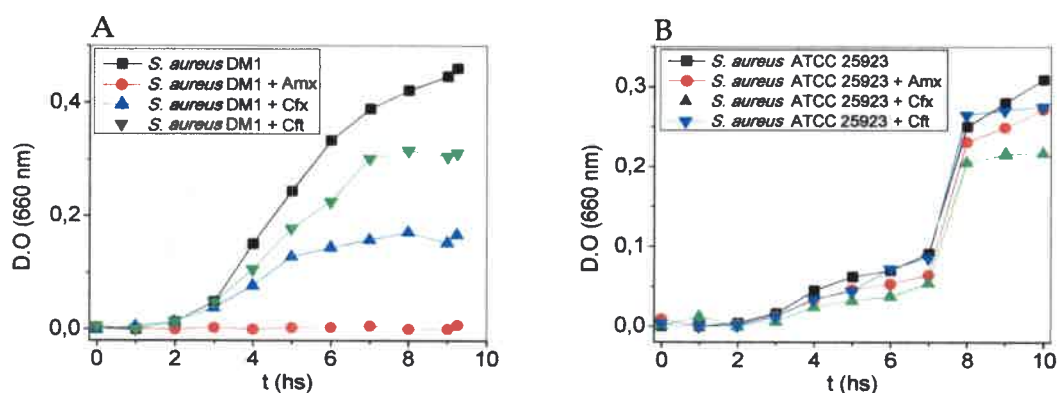


Figura VI.3. Curvas de crecimiento de *S.aureus* (A) DM1y (B) ATCC 25923, en presencia de 1 mg/L de Amx, 8 mg/L de Cfx y 8 mg/L de Cft.

Como puede observarse en la **Figura VI.3 A** la presencia de los Atb produce un retardo en el crecimiento de la cepa DM1, particularmente Amx inhibe completamente el crecimiento del microorganismo a la concentración ensaya. En la **Figura VI.3 B** se puede observar que la presencia de los Atb sobre la cepa de referencia ATCC 25923 no produce modificaciones significativas en la curva de crecimiento sugiriendo cierto grado de resistencia a antibióticos por parte de esta cepa.

Se sabe que la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 es portadora del gen *mecA* de resistencia a antibióticos<sup>6</sup>. La presencia de este gen en múltiples cepas de *S. auerus* se ha asociado a la resistencia a antibióticos de la familia de las penicilinas tales como ampicilina, oxacilina y penicilina, y a antibióticos de otras familias como vancomicina, amicacina y trimetroprima-sulfametaxol<sup>7</sup>.

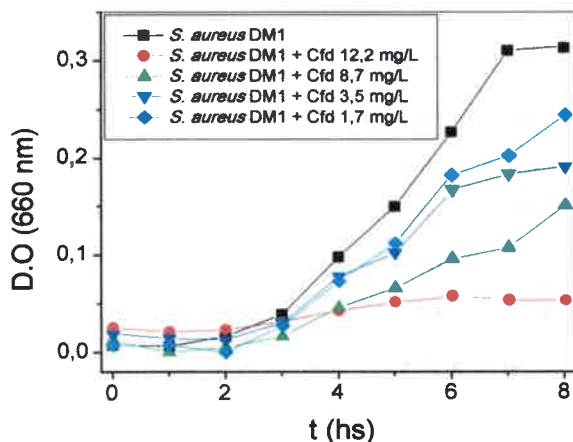


Figura VI.4. Curva de crecimiento de *S. aureus* DM1 en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de Cfd.

Por último, en la **Figura VI.4** se muestra el efecto que produce sobre la curva de crecimiento de *S. aureus* DM1 diferentes concentraciones del antibiótico Cfd. Claramente se observa como a medida que aumenta la concentración de antibiótico disminuye la velocidad de crecimiento del microorganismo.

#### VI-1.2. Determinación de la CIM

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) fue realizada por el método de macrodilución en tubo descrito en la sección 3.3.2 del capítulo II. Las concentraciones de Atb utilizadas, expresadas en mg/L fueron las siguientes:

Tabla VI.1. Rango de concentraciones utilizado de cada Atb para el ensayo de CIM.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
[Atb] mg/L								
Amx	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	0,0156
Amp	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312
Cfx	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
Cfd	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
Cft	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
Ctx	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125

Cabe aclarar que previamente a la elección de las concentraciones que se muestran en la **Tabla VI.1** se realizó un ensayo preliminar barriendo todo el rango de concentraciones sugerido para la determinación de CIM en cepas de *S. aureus*<sup>8</sup>.

Los valores encontrados para la CIM (menor concentración de Atb en la cual no hay crecimiento visible) se muestran para cada una de las cepas en la **Tabla VI.2** y en la **Figura VI.5** las fotografías de los resultados obtenidos para dicha determinación.

Tabla VI.2. Valores de CIM encontrados para los Atb por la técnica de macrodilución en tubo, expresados en mg/L

	DM1	DM2
Amx	1	1
Amp	0,25	0,5
Cfx	8	8
Cfd	2	4
Cft	8	16
Ctx	1	4

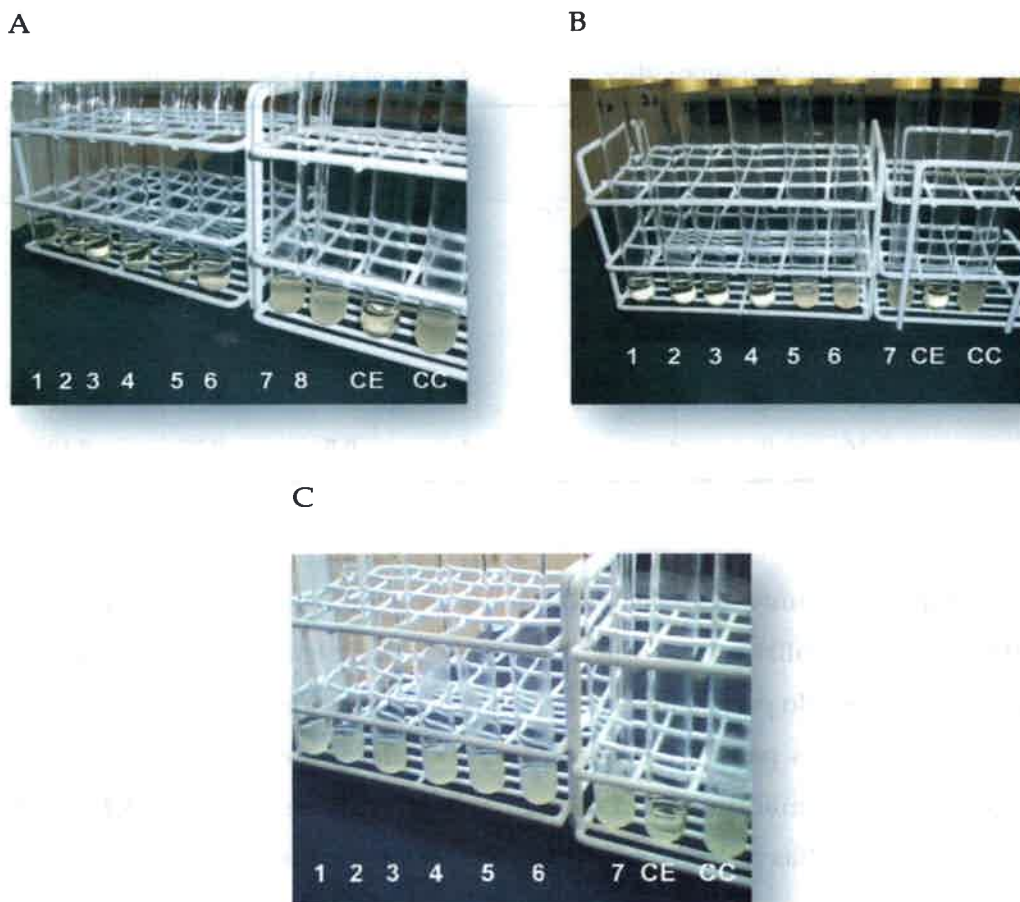


Figura VI.5. Método de macrodilución en tubo para la determinación de la CIM. (A) Amp sobre *S. aureus* DM1 (B) Cfd sobre *S. aureus* DM2 y (C) Ctx sobre *S.aureus* ATCC 25923. CE: control de esterilidad; CC: control de crecimiento.

De acuerdo a tablas de referencia que provee el CLSI<sup>9</sup> para la interpretación de la CIM, tanto *S. aureus* DM1 como DM2 resultan sensibles a los seis antibióticos estudiados.

Como podemos observar en las Figuras VI.4 y VI.5, la cepa DM2 presenta mayor resistencia a Amp, Cfd, Cft y Ctx que la cepa DM1 dado que las concentraciones de los mismos necesarias para inhibir el crecimiento del microorganismo son mayores para DM2 que para DM1. También se observa mayor resistencia de ambas cepas a Cfx y Cft cuyos valores de CIM encontrados resultaron significativamente superiores a los valores de CIM de los otros Atb.

Cabe aclarar que la cepa de referencia ATCC 25923 resultó resistente a todos los Atb y a todas las concentraciones ensayadas.



Resultados similares de CIM fueron encontrados para otras cepas de *S. aureus*<sup>10</sup>.

### VI-1.3. Prueba de sensibilidad a los antibióticos por difusión en placa

El método de *Kirby Bauer* descrito en la sección 3.3.3 del capítulo II se realizó para determinar la concentración de los Atb a la cual las cepas de *S. aureus* DM1 y DM2 presentan sensibilidad en medio sólido.

En la **Figura VI.6** se muestran fotografías representativas de los resultados obtenidos en las placas con los cuales se construyeron gráficos como los que se presentan en la **Figura VI.7**.

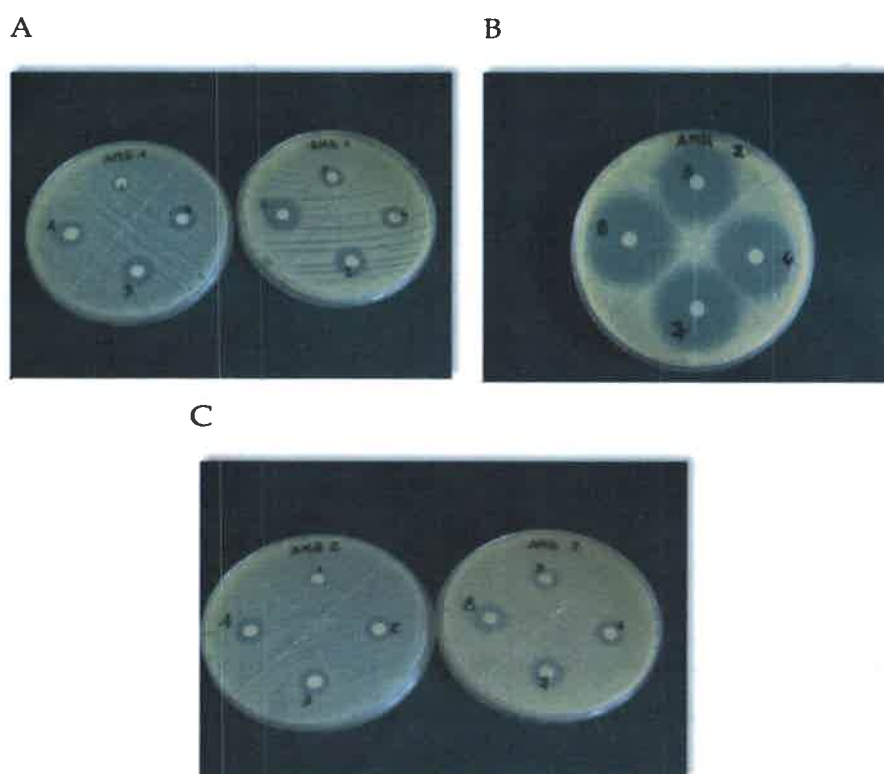


Figura VI.6. Método de difusión en agar para determinar el efecto de la actividad inhibitoria de Ctx sobre la cepa *S. aureus* (A) DM1 y (B) DM2 y (C) Amp sobre la cepa DM2. Los números corresponden a las concentraciones de Atb ensayadas. (1= 0,2 mM; 2=0,4 mM; 3=0,6 mM; 4=0,8 mM; 5=1 mM; 6=1,2 mM; 7=1,5 mM; 8=2 mM).

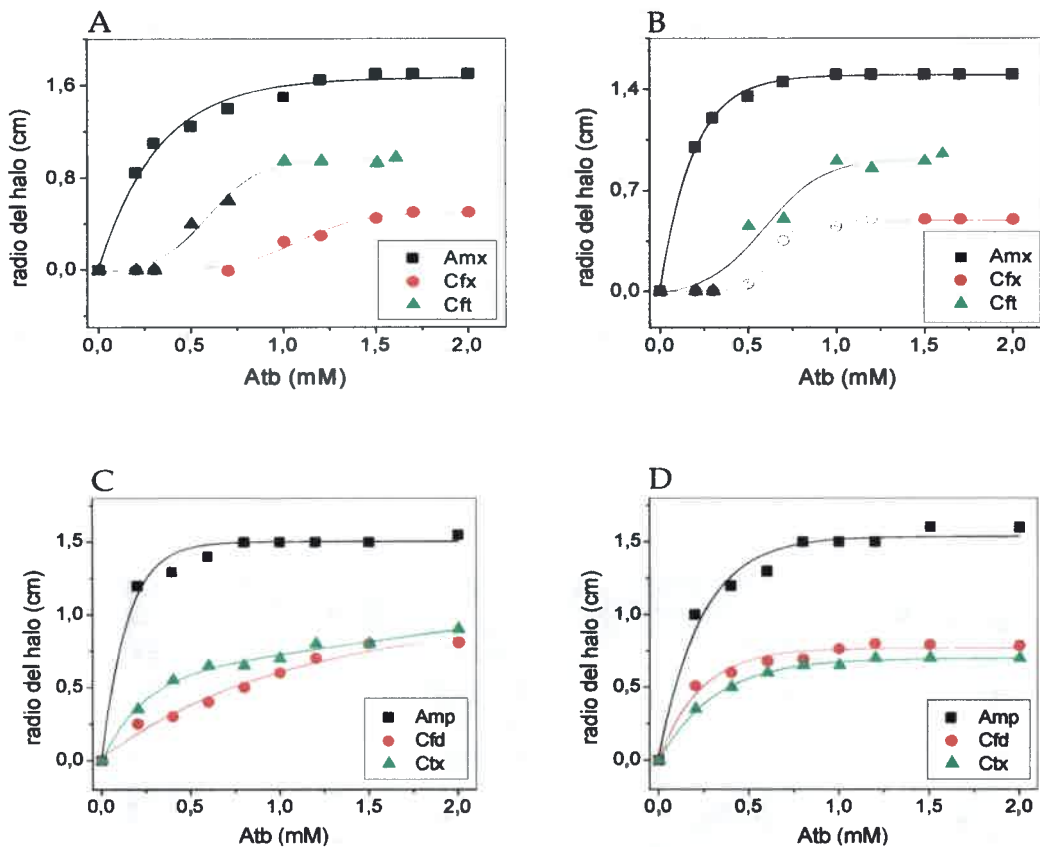


Figura VI.7. Efecto de la concentración de los Atb en solución reguladora de pH 7,4 sobre el halo de inhibición de la cepa de *S. aureus* (A y C) DM1 y (B y D) DM2.

En las Figuras VI.6 y VI.7 se puede observar que en presencia de los Atb las cepas de *S. aureus* DM1 y DM2 muestran un aumento de la sensibilidad a medida que aumenta la concentración de los mismos, aproximadamente hasta 0,6 mM para Amp y Ctx, 0,7 mM para Amx y Cfd y 1 mM para Cfx y Cft. Los radios de los halos de inhibición, a concentraciones por encima de las mencionadas anteriormente, se mantuvieron prácticamente constantes hasta las máximas concentraciones de Atb ensayadas (2 mM). También se puede observar una mayor sensibilidad de ambas cepas frente a Amx y Amp que frente a los otros cuatro Atb, dado que los tamaños de los halos de inhibición son significativamente mayores para estos Atb.

Estos resultados son coincidentes con los observados en el ensayo de determinación de la CIM previamente descrito, en el cual para ambas cepas se encontraron bajos valores de CIM frente a Amx y Amp indicando mayor sensibilidad de los

microorganismos a estos antibióticos y elevados valores de CIM frente a Cfx y Cft indicando mayor resistencia de las cepas.

La cepa de referencia *S. aureus* ATCC 25923 resultó resistente a todas las concentraciones ensayadas de los antibióticos, no encontrándose halos de inhibición (Figura VI.8). Como se mencionó anteriormente, a esta cepa se la ha asociado a la resistencia a diferentes antibióticos de la familia de las penicilinas tales como oxacilina y penicilina, y a antibióticos pertenecientes otras familias como vancomicina, y trimetoprima-sulfametaxol<sup>6,7</sup>. Esto confirma que la presencia de multiresistencia bacteriana, no solo se adquiere a antimicrobianos de la misma familia sino también a fármacos con diferentes mecanismos de acción y estructura química<sup>11</sup>.



Figura VI.8. Método de difusión en agar para determinar la actividad inhibitoria de Amp sobre la cepa *S. aureus* ATCC 25923. Los números indican las concentraciones ensayadas. (5=1 mM; 6=1,2 mM; 7=1,5 mM; 8=2 mM).

#### VI-1.4. Prueba de sensibilidad a los antibióticos Fotodegradados

##### a. Por modificación del tamaño del halo de inhibición

La actividad microbiológica de los Atb a concentración constante (0,6 mM para Amp y Ctx y 0,7 mM para Amx y Cfd y 1 mM para Cfx y Cft) en soluciones irradiadas con luz visible, en presencia del sensibilizador RB, a pH 7.4, fue evaluada midiendo el radio del halo de inhibición antes de la fotólisis ( $H_0$ ) y a distintos tiempos de fotólisis (H) (Figura VI.9 y VI.10).

RB fue utilizado como sensibilizador en los ensayos con los Atb fotodegradados dado que resulta un colorante artificial ampliamente utilizado en ensayos biológicos<sup>12</sup>.

Cabe aclarar que el colorante natural Rf no pudo ser utilizado en estos ensayos debido a que otros autores<sup>13,14</sup> han demostrado que bajo irradiación UV-A (365 nm) Rf posee propiedades antimicrobianas contra patógenos como *S. aureus*, *P. aureuginosa* y *S. epidermidis*.

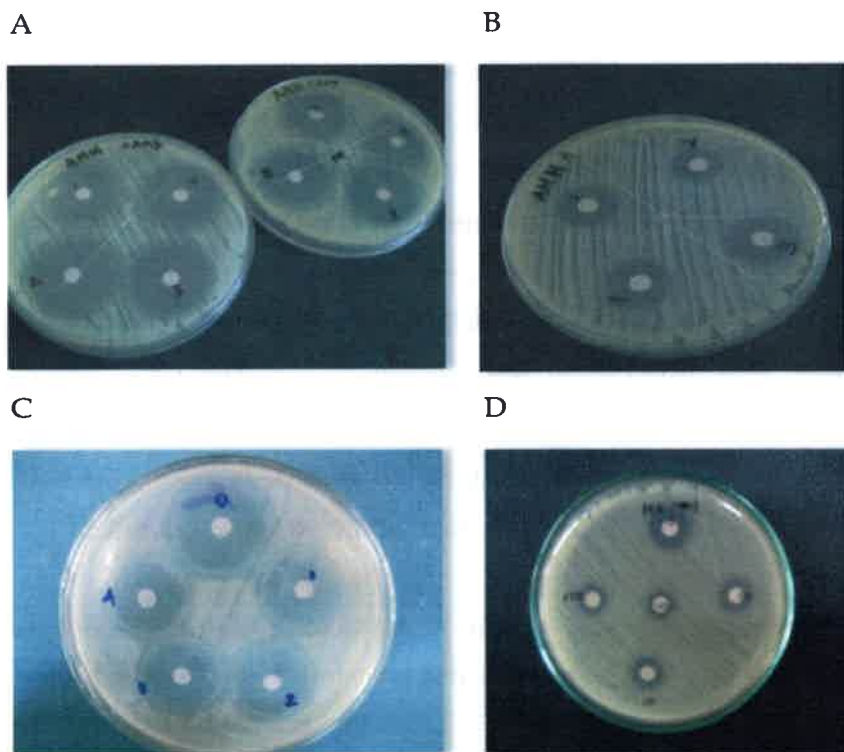


Figura VI.9. Método de difusión en agar para determinar el efecto los distintos tiempos de fotólisis sobre los halos de inhibición de los Atb (A) Amp, (B) Cfd, (C) Amx y (D) Cft sobre la cepa *S. aureus* DM1. (1= 0 min; 2=10 min; 3=20 min; 4=30 min, 5=45 min; 6=60 min; 7=90 min; 8=120 min; RB).

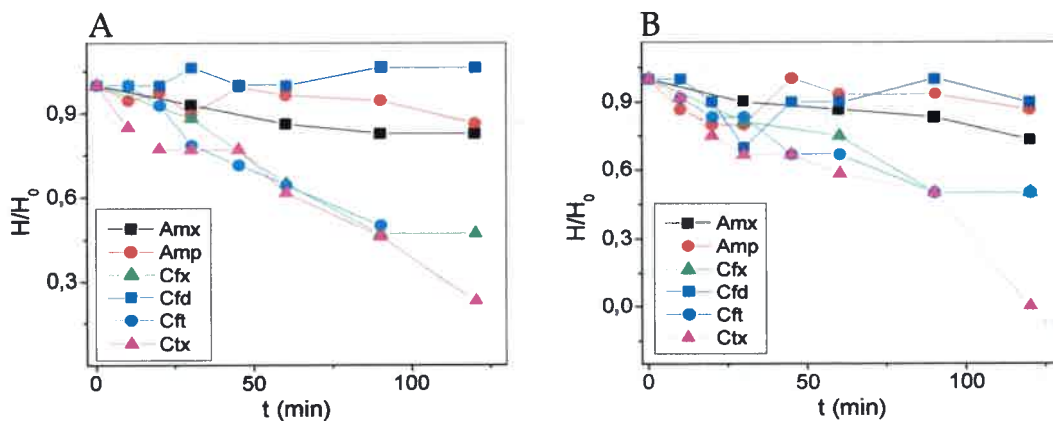


Figura VI.10. Índices relativos de decrecimiento de la actividad bactericida de los Atb a pH 7,4 después de la fotooxidación sensibilizada con RB ( $Abs_{RB^{549}} = 0,5$ ) sobre (A) *S. aureus* DM1 y (B) *S. aureus* DM2.  $H_0$  y  $H$  representan los radios de los halos inhibitorios a  $t=0$  y a distintos tiempos de fotólisis, respectivamente.

Como podemos observar en las Figuras VI.9 y VI.10 el efecto de la fotólisis sobre Amp y Cfd produce muy pocos cambios en el tamaño de los halos de inhibición respecto al Atb sin fotolizar, tanto para la cepa DM1 como para la cepa DM2. Este resultado puede sugerir que la actividad antimicrobiana de estos Atb no se ve modificada por el proceso posiblemente debido a que el Atb no es fotodegradado en los tiempos de irradiación utilizados o bien, los productos de degradación contribuyen a la acción del Atb original, por lo que no se producen cambios en los halos, hecho que ha sido observado por otros autores para la fotodegradación de Amx sobre cepas de *E.coli*<sup>15</sup>.

Como consecuencia de la fotólisis sensibilizada por RB, la acción de Amx, Cfx, Cft y Ctx sobre ambas cepas se ve claramente disminuida a medida que aumenta el tiempo de irradiación, especialmente para los tres últimos mencionados. El efecto podría deberse a la fotodegradación de los Atb y por consiguiente, la pérdida de la capacidad bactericida de los mismos<sup>16</sup>. También, con este resultado, se puede inferir que los fotoproductos de la degradación no poseen actividad inhibitoria sobre las cepas de *S. aureus* DM1 y DM2 en las condiciones experimentales ensayadas.

Resultados similares fueron obtenidos en pruebas de fotooxidación mediadas por O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) con otros antimicrobianos tales como fármacos sulfa<sup>17</sup> y tetraciclinas<sup>18</sup> frente a *S. aureus* y otros microorganismos como *B. subtilis* y *P. aureuginosa*, donde también se observó una disminución de la actividad antimicrobiana con el tiempo de fotólisis. Wammer *et. al.*<sup>19</sup> utilizó un ensayo similar para determinar la pérdida de la actividad antimicrobiana sobre *E.coli* de tres fluoroquinolonas bajo fotólisis directa y encontró que a partir de dos de ellas (norfloxacin y ofloxacin) se generaban fotoproductos inactivos frente a la bacteria estudiada, mientras que para enrofloxacin la actividad antimicrobiana se mantenía significativamente luego de la fotólisis.

Por otro lado, la capacidad antimicrobiana de los fotoproductos de Amp, obtenidos luego de la oxidación por los procesos de Fenton y Foto-Fenton, fueron evaluados por Rozas *et. al.*<sup>20</sup> frente a *S. aureus*, encontrando que los mismos no presentaban propiedades antibióticas.

Cabe aclarar que la cepa ATCC 25923 resultó resistente a todos los Atb y a todos los tiempos de fotólisis probados en el ensayo como se muestra en la Figura VI.11.



Figura VI.11. Método de difusión en agar para determinar el efecto de los distintos tiempos de fotólisis sobre los halos de inhibición de Amp sobre la cepa *S. aureus* ATCC 25923. (1= 0 min; 2=10 min; 3=20 min; 4=30 min; 5=45 min; 6=60 min; 7=90 min; 8=120 min; RB)

Paralelamente, a fin de comprobar si el sensibilizador en ausencia de Atb, sin fotolizar y fotolizado produce efectos sobre los microorganismos, se irradió una solución de RB pH 7,4 y se procedió de la misma manera que en el ensayo en presencia de los Atb.

Se encontró que RB, sin fotolizar y fotolizado a los mismos tiempos que en presencia de los Atb, no produce ningún efecto sobre las cepas de *S. aureus* estudiadas (Figura VI.12), de manera que lo observado en los tamaños de los halos de inhibición es solo consecuencia del proceso fotodegradativo que sufre el Atb. Este resultado coincide con lo previamente mostrado en las curvas de crecimiento del microorganismo en ausencia y presencia de RB en las cuales se observó que este colorante no influye en el crecimiento del los mismos.



Figura VI.12. Método de difusión en agar para determinar el efecto de los distintos tiempos de fotólisis (0, 30, 60 90 y 120 min) sobre los halos de inhibición para la cepa *S. aureus* ATCC 25923 en presencia de RB.

#### b. Por recuento de viables

El efecto de la fotodegradación de los Atb sobre la capacidad antimicrobiana frente a las cepas de *S. aureus* fue también evaluada por el método de recuento de viables detallado en la sección 3.3.4.b del capítulo II. Fue seleccionado el Atb Cft para este ensayo dado que resulta uno de los Atb estudiados cuya actividad bactericida se ve

más afectada por el proceso de fotodegradación sensibilizada de acuerdo a las evidencias anteriormente mencionadas.

Los resultados obtenidos para la cepa *S. aureus* DM2 en ausencia y en presencia de 16 mg/L y 100 mg/L de Cft antes y después 4 horas aproximadamente de fotólisis en presencia de RB se muestran en las fotografías (Figura VI.13) y en el gráfico de barras en el cual se expresan como log UFC/mL (Figura VI.14).

Las concentraciones seleccionadas corresponden a la CIM de Cft sobre *S. aureus* DM2 (16 mg/L) encontrada en el ensayo previamente descrito y, a una concentración de Atb mayor (100 mg/L) a fin de poder comparar los resultados.

A



B



Figura VI.13. Método de recuento de viables para determinar el efecto de la fotólisis de Cft sobre la cepa *S. aureus* DM2. (A) control de crecimiento de la cepa en ausencia de Cft (B) *S. aureus* DM2 en presencia de 100 mg/L de Cft antes (S/F) y después (F) de la fotólisis.

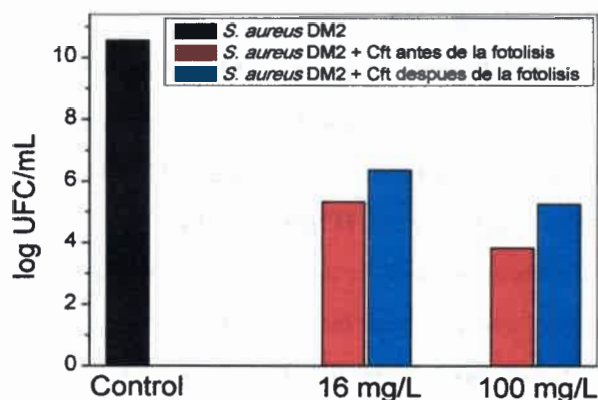


Figura VI.14. Efecto de Cft (16 m/L y 100 mg/L) antes y después de 4 hs de fotólisis en presencia de RB, sobre el crecimiento de *S. aureus* DM2.

Como podemos observar en las Figuras VI.13 y VI.14 las dos concentraciones utilizadas producen una disminución significativa en el recuento de microorganismos, el mismo disminuye aproximadamente 5 logaritmos en presencia de 16 mg/L y 7 logaritmos en presencia de 100 mg/L, mostrando que a medida que aumenta la concentración de Atb, disminuye el número de células viables presentes expresadas como UFC/mL.

Cuando el microorganismo se enfrentó al Atb luego del proceso de fotólisis, el recuento disminuye aproximadamente 4 logaritmos en presencia de 16 mg/L y 5 logaritmos en presencia de 100 mg/L respecto al control, evidenciando que, como consecuencia de la fotodegradación sensibilizada, el Atb pierde su efecto bactericida y por lo tanto el recuento en presencia del Atb fotolizado es superior que en presencia del Atb sin fotolizar. Estas observaciones coinciden con las encontradas en los experimentos por difusión en placa explicados previamente.

Otra observación encontrada fue el cambio en la coloración y el tamaño de las colonias en presencia del Atb respecto al control sin Atb. Las mismas disminuyen significativamente de tamaño y pierden pigmentación de amarillo pálido a gris tenue, probablemente como consecuencia del mecanismo de acción de este tipo de Atb, el cual produce alteraciones en la pared celular bacteriana<sup>21</sup>.



## VI-2. CONCLUSIONES

- Las evidencias encontradas tanto en los ensayos en placa como en los de recuento de viables muestran claramente que la capacidad bactericida de los antibióticos Amx, Cfx, Cft y Ctx se ve disminuida como consecuencia de la fotodegradación sensibilizada sobre las cepas de *S. aureus* DM1 y DM2, mientras que para Cfd y Amp este proceso no produce modificaciones significativas en la actividad antimicrobiana de los Atb sobre las mismas cepas. Por otro lado, los resultados sugieren que para aquellos Atb cuya actividad bactericida se ve afectada por el proceso de fotodegradación sensibilizada, los productos que eventualmente podrían formarse como consecuencia del mismo, parecen no tener capacidad antimicrobiana sobre las cepas evaluadas.
- Los resultados demuestran que los procesos de fotodegradación sensibilizada de Atb no solo posee la ventaja de que puede contribuir a la disminución de estos compuestos en el medio ambiente, si no que debido a que estos pierden su capacidad antimicrobiana como consecuencia de la fotólisis y los productos fotogenerados aparentemente no son activos frente a los microorganismos podría verse favorecida la disminución de la resistencia bacteriana a múltiples antimicrobianos, un problema emergente que genera grandes problemas en el tratamiento de enfermedades infecciosas<sup>22</sup>.

### VI-3. REFERENCIAS

---

1. Cabello R. R. Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Tercera Edición, Editorial Médica Panamericana, México (2007)
2. Llop Hernández A., Valdés-Dapena Vivanco M. M., Zuazo Silva J. L. Microbiología y Parasitología médica. Tomo I. Editorial Ciencias Médicas, Ciudad de la Habana (2001)
3. Tortora J., Funke B., Case C. Introducción a la microbiología. Novena Edición, Editorial médica Panamericana, Bs. As., Argentina (2007)
4. Feng H., Xiang H., Zhang J., Liu G., Guo N., Wang X., Wu X., Deng X., Yu L. Genome-Wide Transcriptional Profiling of the Response of *Staphylococcus aureus* to Cryptotanshinone. *J. Biomedicine and Biotechnology* (2009)
5. Medveová A., Valík L. *Staphylococcus aureus*: Characterisation and Quantitative Growth Description in Milk and Artisanal Raw Milk Cheese Production. *Structure and Function of Food Engineering* (2012)
6. Zschöck M., El-Sayed A., Eissa N., Lämmler C., Castañeda-Vazquez H. Penicillin G and oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis. *Veterinaria México* (2011) 42:207.
7. Lee J. W. Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Major Food Animals and Their Potential Transmission to Humans. *Applied and Environmental Microbiology*. (2003) 69: 6489.
8. Andrews J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrobial Chemotherapy* (2001) 48:5.
9. CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first informational supplement. M100-S21. (2011).
10. Andrews J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrobial Chemotherapy* (2001) 48:5.
11. Florentin Aponte C. C. Perfil de resistencia in vitro a antimicrobianos de cepas causantes de mastitis aisladas de leche cruda bovina en establecimientos de pequeña y mediana producción. SENACSA (Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal) Asunción-Paraguay. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud* (2007)
12. Theodossiou T., Hothersall J. S., Woods E. A., Okkenhaug K., Jacoson J., Mac Robert A. Firefly Luciferin-activated Rose Bengal In Vitro Photodynamic Therapy by Intracellular Chemiluminescence in Transgenic NIH 3T3 Cells. *J. Cancer Research* (2003) 63:1818.
13. Martins S. A. R., Castro Combs J., Noguera G., Camacho W., Wittmann P., Walther R., Cano M., Dick J., Behrens A. Antimicrobial Efficacy of Riboflavin/UVA Combination (365 nm) In Vitro for Bacterial and Fungal Isolates: A Potential New Treatment for Infectious Keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* (2008) 49:3402.

- 
14. Makdoumi K., Mortensen J., Sorkhabi O., Malmvall B., Crafoord S. UVA-riboflavin photochemical therapy of bacterial keratitis: a pilot study. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* (2012) 250:95.
  15. Yeon J. J., Wan G. K., Yeojoon Y., Joon-Wun K., Young Min H., Hyun Wook K. Removal of amoxicillin by UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes. *Science of the Total Environment* (2012) 420:160.
  16. Reynoso E., Nesci A., Allegretti P., Criado S., Biasutti M.A. Kinetic and mechanistic aspects of sensitized photodegradation of  $\beta$ -lactam antibiotics: Microbiological implications. *Redox Report* (2012) 17:275.
  17. Díaz M., Luiz M., Bertolotti S., Miskoski S., García N. A. Scavenging of photogenerated singlet molecular oxygen and superoxide radical anion by sulphha drugs-kinetics and mechanism. *Canadian Journal of Chemistry* (2004) 82:1752.
  18. Castillo C., Criado S., Díaz M., García N.A. Riboflavin as sensitizer in the photodegradation of tetracyclines. Kinetics, mechanism and microbiological implications. *Dyes and Pigments* (2007) 72:178.
  19. Wammer K. H., Korte A. R., Lundeen R. A., Sundberg J. E., McNeill K., Arnold W. A. Direct photochemistry of three fluoroquinolone antibacterials: Norfloxacin, ofloxacin, and enrofloxacin. *Water Research* (2013) 47:439.
  20. Rozas O., Contreras D., Mondaca M. A., Pérez-Moya M., Mansilla H. D. Experimental design of Fenton and photo-Fenton reactions for the treatment of ampicillin solutions. *J. Hazardous Materials* (2010) 177:1025.
  21. Basualdo J. A., Coto C. E., Torres R. A. *Microbiología Médica: Bacteriología-Micología-Virología-Parasitología-Inmunología*. Segunda Edición, Editorial Atlante, Bs. As., Argentina (2006)
  22. Millar M. Can antibiotic use be both just and sustainable... or only more or less so?. *J. Medical Ethics* (2011) 37:153.

# CAPÍTULO VII.

## CONCLUSIONES FINALES

### CONCLUSIONES FINALES

Si bien en cada capítulo de resultados y discusión se presentaron las conclusiones parciales obtenidas, a continuación se numeran puntualmente las mismas a modo de resumen:

- Tanto Rosa de bengala (RB) como Perinaftenona (PN) son colorantes sintéticos capaces de fotosensibilizar la degradación oxidativa de los antibióticos  $\beta$  lactámicos estudiados.
- En presencia de RB la fotodegradación puede darse por la participación de las especies  $O_2(^1\Delta_g)$  y  $O_2^{\bullet-}$ . Mientras que, solo  $O_2(^1\Delta_g)$  está involucrado en la fotodegradación de los antibióticos en presencia de PN como sensibilizador.
- El proceso fotooxidativo en presencia de PN y mediado por  $O_2(^1\Delta_g)$  es favorecido a pH alcalino para los antibióticos Amoxicilina y Cefadroxil debido a la ionización del grupo fenólico presente solo en las estructuras químicas de estos antibióticos, mientras que no se observó efecto del pH en la reactividad frente a  $O_2(^1\Delta_g)$  para los demás antibióticos estudiados.
- La reacción de fotooxidación entre  $O_2(^1\Delta_g)$  y los antibióticos puede ser explicada a través de un mecanismo que involucra un complejo de encuentro con carácter parcial de transferencia de carga.
- Los fotoproductos obtenidos luego de la degradación fotosensibilizada de los antibióticos Amoxicilina y Cefalexina provienen de la oxidación de los grupos  $-CH_3$  del anillo  $\beta$  lactámico a  $-COOH$  y posterior adición de átomos de oxígeno en el anillo aromático que poseen los mismos en su cadena lateral.
- El pigmento natural Riboflavina (Rf) es capaz de sensibilizar la fotodegradación de los antibióticos estudiados.
- Los antibióticos interactúan con los estados electrónicos excitados de Rf y con las especies reactivas de oxígeno generadas a partir de dichos estados ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  y  $OH$ ), lo que se conoce como mecanismo de fotosensibilización Tipo I, así como con la especie  $O_2(^1\Delta_g)$  generada a través de un mecanismo de fotosensibilización Tipo II, dado

por la transferencia de energía entre el estado triplete excitado Rf y el oxígeno en su estado fundamental.

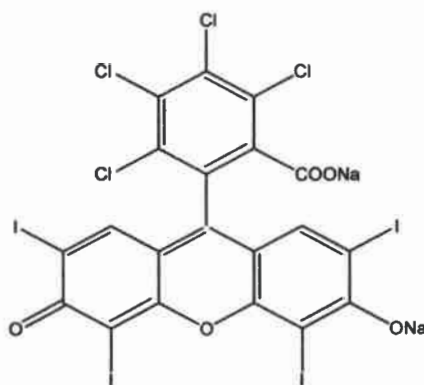
- Para los antibióticos Amoxicilina y Cefadroxil los mecanismos de fotosensibilización en presencia de Rf resultaron competitivos, para Ampicilina y Cefalexina prevalece el mecanismo mediado por  $O_2(^1\Delta_g)$ , mientras que para Ceftriaxona y Cefotaxima predomina la vía radicalaria.

- Las evidencias encontradas en los ensayos microbiológicos muestran claramente que la capacidad bactericida de los antibióticos Amoxicilina, Cefalexina, Ceftriaxona y Cefotaxima se ve disminuida como consecuencia de la fotodegradación sensibilizada sobre las cepas de *S. aureus* estudiadas, mientras que para Cefadroxil y Ampicilina este proceso no produce modificaciones significativas en la actividad antimicrobiana. Paralelamente, los fotoproductos que eventualmente podrían generarse como consecuencia de la fotooxidación sensibilizada de los Atb cuya capacidad bactericida disminuye, al parecer no poseen actividad antimicrobiana sobre las cepas evaluadas.

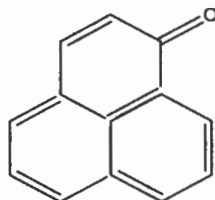
- Los resultados demuestran que los procesos de fotodegradación sensibilizada de antibióticos de la familia de las penicilinas y cefalosporinas podrían contribuir a la disminución de estos compuestos en el medio ambiente y, debido a que estos pierden su capacidad antimicrobiana como consecuencia de la fotólisis, se favorece la disminución del desarrollo de resistencia bacteriana a múltiples antimicrobianos, un problema emergente que genera grandes problemas en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

## VIII-1. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LOS SENSIBILIZADORES EMPLEADOS

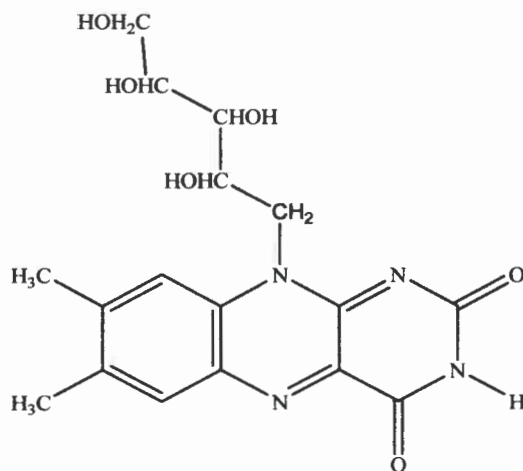
Rosa de bengala (fluoresceína 3, 4, 5, 6-tetracloro-2', 4', 5', 7'-tetraiodo-dianión)



Perinafteno (1-H-fenalen-1 -ona)

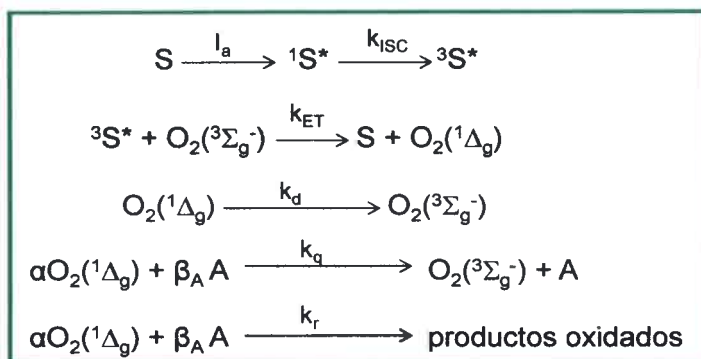


Riboflavina (Vitamina B2)



**VIII-2. DEDUCCIÓN DE LA ECUACIÓN DEL MÉTODO DE DOBLES INVERSAS**

A continuación se muestra un esquema simplificado de fotooxidación sensibilizada a partir del cual se realizará la deducción del *método de dobles inversas*. Dicho método supone como única reacción la de un sustrato (A) con oxígeno singlete ( $O_2(^1\Delta_g)$ ).



Donde  $\alpha$  y  $\beta_A$  representan los coeficientes estequiométricos respecto a  $O_2(^1\Delta_g)$  y A, respectivamente.

Teniendo en cuenta el esquema anterior, el rendimiento cuántico de desaparición de A se puede expresar como:

$$\Phi_{-A} = (\beta_A)^{-1} (-\delta[A]/\delta t) / I_a = k_r [A] [O_2(^1\Delta_g)] / I_a$$

A partir del rendimiento cuántico de generación de  $O_2(^1\Delta_g)$  por el sensibilizador

$$\Phi_{\Delta} = k_{ET} = [O_2({}^3\Sigma_g^-)] [{}^3S^*] / I_a$$

y bajo la suposición de estado estacionario para  $O_2(^1\Delta_g)$

$$(\alpha)^{-1} \delta[O_2(^1\Delta_g)] / \delta t = I_a \Phi_{\Delta} - k_d [O_2(^1\Delta_g)] + (k_r + k_q) [O_2(^1\Delta_g)] [A] = 0$$

se puede expresar la concentración de  $O_2(^1\Delta_g)$  por la siguiente ecuación:

$$[O_2(^1\Delta_g)] = I_a \Phi_{\Delta} / \{k_d + (k_r + k_q) [A]\}$$

la cual, teniendo en cuenta que  $(k_q + k_r) = k_t$  se puede escribir:

$$[O_2(^1\Delta_g)] = I_a \Phi_{\Delta} / (k_d + k_t [A])$$

Luego, por reemplazo en la primera ecuación se obtiene que:

$$\Phi_{-A} = \Phi_{\Delta} k_r [A] / (k_d + k_t [A])$$

la cual se puede reescribir como:

$$(\Phi_{-A})^{-1} = (\Phi_{\Delta})^{-1} \{k_d + (k_t [A]) / k_r [A]\} = (\Phi_{\Delta})^{-1} \{(k_d / k_r [A]) + (k_t / k_r)\}$$

Si expresamos  $(\Phi_{-A})^{-1} = (v_{-A})^{-1} / (I_a)^{-1}$  donde  $v_{-A}$  representa la velocidad de desaparición de A y reordenando, se obtiene

$$(v_{-A})^{-1} = (\Phi_{\Delta} I_a)^{-1} \{(k_d / k_r [A]) + (k_t / k_r)\}$$

Bajo condiciones experimentales constantes (iluminación, geometría, sensibilizador), es operativamente conveniente la determinación de  $v_{-A}$  en lugar de  $\Phi_{-A}$ .

Haciendo un grafico de dobles inversas, es decir, graficando la inversa de la velocidad de desaparición del sustrato en función de la inversa de su concentración, se obtiene una línea recta de pendiente  $k_d / k_r$  y ordenada  $k_t / k_r$ . Mediante el cociente ordenada / pendiente y conociendo el valor de  $k_d$  para el solvente utilizado es posible evaluar  $k_t$ .



**VIII-3. GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS UTILIZADOS**

A: sustrato fotooxidable

Amp: ampicilina

Amx: amoxicilina

Atb: antibióticos

AMH: agar Mueller Hinton

AN: agar nutritivo

CAT: catalasa

CN: caldo nutritivo

Cfd: cefadroxil

Cft: ceftriaxona

Cfx: cefalexina

Ctx: cefotaxima

CIM: concentración mínima inhibitoria

D<sub>2</sub>O: óxido de deuterio o agua deuterada

DM1: *S. aureus*, colección bacteriana del departamento de microbiología 1.

DM2: *S. aureus*, colección bacteriana del departamento de microbiología 2.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno

ε: coeficiente de extinción molar

I<sub>a</sub>: intensidad de luz absorbida

<sup>1</sup>k<sub>d</sub>: constante de velocidad para la desactivación natural del estado singlete excitado del sensibilizador

<sup>1</sup>k<sub>q</sub>: constante de velocidad para la desactivación del estado singlete excitado del sensibilizador por un sustrato A

$k_{ISC}$ : constante de velocidad de entrecruzamiento de sistemas

${}^3k_d$ : constante de velocidad para la desactivación natural del estado triplete excitado del sensibilizador

${}^3k_q$ : constante de velocidad para la desactivación del estado triplete excitado del sensibilizador por un sustrato A

$k_p$ : constante de velocidad de formación de productos.

${}^3k_{qO_2}$ : constante de velocidad de desactivación del estado triplete del sensibilizador por  $O_2 ({}^3\Sigma_g^-)$

$k_{rS}$ : constante de velocidad para la desactivación química de  $O_2({}^1\Delta_g)$  por el sensibilizador

$k_{ET}$ : constante de velocidad de transferencia de energía

$k_d$ : constante de velocidad para la desactivación natural de  $O_2({}^1\Delta_g)$

$k_q$ : constante de velocidad para la desactivación física de  $O_2({}^1\Delta_g)$  por un sustrato A

$k_r$ : constante de velocidad para la desactivación química de  $O_2({}^1\Delta_g)$  por un sustrato A

$k_i$ : constante de velocidad para la desactivación total de  $O_2({}^1\Delta_g)$  por un sustrato A ( $k_r + k_q$ )

$k_{SV}$ : constante de Stern-Volmer.

LFF: láser flash fotólisis

$NaN_3$ : azida de sodio

$O_2 ({}^3\Sigma_g^-)$ : estado fundamental de la molécula de oxígeno

$O_2({}^1\Delta_g)$ : estado singlete excitado de la molécula de oxígeno

$O_2^{\cdot-}$ : anión radical superóxido

$HO^{\cdot}$ : radical hidroxilo

PN: perinaftenona

ppm: partes por millón

RB: rosa de bengala

Rf: riboflavina

S: sensibilizador

$^1S^*$ : estado singlete excitado del sensibilizador

$^3S^*$ : estado triplete excitado del sensibilizador

SOD: superóxido dismutasa

SPC: conteo de fotón único

*S. aureus*: *Staphylococcus aureus*

TRPD: técnica de detección de fosforescencia de  $O_2(^1\Delta_g)$  resuelta en el tiempo

$^1\tau$ : tiempo de vida del estado singlete excitado de un sensibilizador en presencia de un sustrato A

$^1\tau_0$ : tiempo de vida del estado singlete excitado de un sensibilizador en ausencia de un sustrato A

$^3\tau$ : tiempo de vida del estado triplete excitado de un sensibilizador en presencia de un sustrato A

$^3\tau_0$ : tiempo de vida del estado triplete excitado de un sensibilizador en ausencia de un sustrato A

$\tau$ : tiempo de vida de  $O_2(^1\Delta_g)$  en presencia de un sustrato A

$\tau_0$ : tiempo de vida de  $O_2(^1\Delta_g)$  en ausencia de un sustrato A

UFC: unidades formadoras de colonias

$v_r$ : velocidad relativa de consumo de oxígeno

$\Phi_{RH\cdot}$ : rendimiento cuántico de generación del radical neutro de riboflavina

$\Phi_\Delta$ : rendimiento cuántico de generación de  $O_2(^1\Delta_g)$  por el sensibilizador



72684

U.N.R.C.  
Biblioteca Central



72684