



TRABAJO FINAL  
LICENCIATURA EN QUÍMICA

“Degradación de antifúngicos oftálmicos mediada por especies reactivas de oxígeno fotogeneradas”

Charis David Parramón Jurado

Directora: Dra. Susana N. Criado

Departamento de Química  
Facultad de Ciencias Exactas, Físicoquímicas y Naturales  
Universidad Nacional de Río Cuarto

Marzo 2019

## Resumen

El órgano ocular, al igual que la piel, se encuentra constantemente expuesto a la radiación lumínica ambiental. En este entorno, la presencia de sustancias naturales capaces de actuar como sensibilizadores y generar indirectamente especies reactivas de oxígeno (ROS) resulta de fundamental importancia en los procesos de degradación oxidativa de fármacos utilizados en el tratamiento de patologías oculares. Estos procesos implican que un fármaco oftalmológico transparente a la luz visible, pueda sufrir reacciones químicas que comprometan su eficacia clínica disminuyendo su concentración local o generando productos de reacción potencialmente tóxicos. Es allí donde yace la importancia de contar con estudios relacionados con la degradación oxidativa de este tipo de fármacos. En este trabajo, se investigó la degradación oxidativa de tres antifúngicos imidazólicos de uso oftalmológico: tioconazol, clotrimazol y sulconazol, mediante procesos sensibilizados por riboflavina (Rf), un pigmento natural capaz de generar diversas ROS y por rosa de Bengala (RB), un pigmento artificial generador exclusivo de oxígeno singlete. Los resultados obtenidos permitieron inferir que existe interacción entre los antifúngicos y los estados electrónicamente excitados de Rf, así como también con la ROS oxígeno singlete. La fotodegradación de tioconazol fue la única que mostró la participación de ROS diferentes a oxígeno singlete como anión radical superóxido y peróxido de hidrógeno. La cuantificación de la participación de oxígeno singlete en la degradación fotosensibilizada mostró que sulconazol y clotrimazol desactivan a esta ROS principalmente mediante la vía física, mientras que tioconazol lo hace también por la vía reactiva. Tioconazol y clotrimazol mostraron además capacidad sensibilizadora, pudiendo generar oxígeno singlete por irradiación directa de los mismos. Por otro lado, se evaluó la posible toxicidad de tioconazol y/o los fotoproductos de su degradación mediada por oxígeno singlete, a través de la evaluación del cumplimiento normal del ciclo de vida del microorganismo *Dictyostelium discoideum* (*D. discoideum*). Se estudió el efecto de muestras de RB/tioconazol sin irradiar y luego de distintos tiempos de fotólisis que alcanzaron un máximo de 4 hs en cultivos de *D. discoideum*. Los resultados indican que tioconazol por sí mismo inhibe el crecimiento de la ameba *D. discoideum* (posiblemente debido a la naturaleza de su mecanismo de acción terapéutico) y que esta inhibición no resulta disminuida a medida que aumenta el tiempo de fotólisis, ya que el tratamiento con muestras de 30, 60, 120, 180 y 240 minutos de fotólisis tampoco permitió el desarrollo de la ameba.

## Índice:

1.	Introducción.....	5
2.	Marco Teórico.....	7
2.1.	Estados excitados.....	7
2.2.	Procesos fotofísicos.....	7
2.3.	Procesos fotoquímicos.....	9
2.4.	Tiempo de vida media de estados excitados.....	10
2.5.	Rendimiento cuántico de fotoprocesos.....	10
2.6.	Fotosensibilización.....	11
2.7.	Sensibilizadores.....	12
2.8.	Oxígeno singlete.....	12
2.8.1.	Generación de oxígeno singlete.....	13
2.8.2.	Desactivación de oxígeno singlete.....	14
2.9.	Oxidaciones Fotosensibilizadas.....	15
2.9.1.	Sensibilizadores para procesos tipo I y II.....	18
2.10.	Especies Reactivas de Oxígeno.....	19
2.10.1.	Anión Superóxido.....	20
2.10.2.	Peróxido de Hidrógeno.....	20
2.10.3.	Radical Oxhidrilo.....	21
2.11.	Estrés Oxidativo y Sistemas Antioxidantes.....	21
2.12.	Antifúngicos azólicos de uso oftalmológico tópico.....	23
2.13.	<i>Dictyostelium discoideum</i> como organismo modelo en ensayos de toxicidad.....	25
3.	Objetivos.....	27
3.1.	Objetivo General.....	27
3.2.	Objetivos específicos.....	27
4.	Materiales y Métodos.....	28
4.1.	Reactivos y Solventes.....	28
4.2.	Equipos.....	30
4.2.1.	Fotólisis estacionaria.....	30
4.2.2.	Espectroscopía de absorción UV-Visible.....	31
4.2.3.	Fluorescencia estacionaria.....	31
4.2.4.	Detección de fosforescencia de oxígeno singlete resuelta en el tiempo.....	32
4.2.5.	Ensayos de toxicidad.....	32
4.3.	Metodología.....	33
4.3.1.	Preparación de soluciones para los ensayos de fotooxidación.....	33

4.3.2.	Determinación de los coeficientes de absorptividad molar de los antifúngicos estudiados.....	33
4.3.3.	Fotólisis estacionaria.....	33
4.3.4.	Determinación de la constante de velocidad de desactivación reactiva de oxígeno singlete por los antifúngicos ( $k_r$ ).....	34
4.3.5.	Determinación de la constante de velocidad de desactivación total de oxígeno singlete por los antifúngicos ( $k_t$ ).....	35
4.3.6.	Determinación de la naturaleza de las especies reactivas de oxígeno que participan en la fotodegradación de los antifúngicos sensibilizada por riboflavina.....	36
4.3.7.	Determinación de la interacción entre el estado electrónico singlete excitado de riboflavina y los antifúngicos.....	36
4.3.8.	Determinación de la interacción entre el estado electrónico triplete excitado de riboflavina y los antifúngicos.....	37
4.3.9.	Rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete por los antifúngicos.....	37
4.3.10.	Ensayos de toxicidad.....	38
5.	Resultados y Discusión.....	41
5.1.	Caracterización de los antifúngicos estudiados.....	41
5.2.	Determinación de los coeficientes de absorptividad molar de los antifúngicos estudiados.....	43
5.3.	Asociación oscura entre rosa de bengala y los antifúngicos.....	44
5.4.	Fotólisis estacionaria de los antifúngicos, sensibilizada por rosa de bengala.....	46
5.5.	Determinación de las constantes de velocidad de desactivación reactiva de oxígeno singlete por los antifúngicos ( $k_r$ ).....	48
5.6.	Determinación de las constantes de velocidad de desactivación total de oxígeno singlete por los antifúngicos ( $k_t$ ).....	49
5.7.	Fotólisis estacionaria de los antifúngicos sensibilizada por riboflavina.....	51
5.7.1.	Determinación de la naturaleza de las especies reactivas de oxígeno en la degradación de los antifúngicos sensibilizada por riboflavina.....	55
5.8.	Desactivación del estado electrónico singlete excitado de riboflavina por los antifúngicos.....	56
5.9.	Desactivación del estado electrónico triplete excitado de riboflavina por los antifúngicos.....	58
5.10.	Rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete por los antifúngicos.....	61
5.11.	Ensayos de toxicidad utilizando el microorganismo modelo <i>D. discoideum</i> .....	63
6.	Conclusiones.....	66
7.	Bibliografía.....	67

## 1. Introducción.

El órgano ocular, al igual que la piel, se encuentra constantemente expuesto a la radiación ambiental y cada día absorbe millones de fotones. Si bien la luz incidente absorbida por los fotorreceptores del ojo genera cambios genéticamente programados que posibilitan la visión, la luz también es absorbida por otras estructuras oculares y/o sustancias presentes en el medio celular capaces de desencadenar eventos químicos que pueden dañar dichas estructuras y/o generar productos potencialmente tóxicos para el organismo.<sup>1</sup>

Por lo tanto, la luz es simultáneamente necesaria para la visión y potencialmente dañina, en particular para las estructuras oculares diseñadas para concentrar los rayos de luz y formar así imágenes en la retina. Es debido a estas estructuras que la exposición a la luz visible puede ser insuficiente para causar daños fotoinducidos en la piel pero no en el ojo<sup>2</sup>. Ésta es una de las razones que hacen al ojo el órgano ideal para estudiar efectos fototóxicos.

La luz puede causar daños mediante mecanismos que implican efectos térmicos, mecánicos o fotoquímicos. El mecanismo que prevalecerá dependerá de la longitud de onda de la luz incidente y del tiempo de exposición. El daño fotoquímico tiene lugar cuando la tasa de deposición de energía es baja e incapaz de producir daño tisular por aumento de la temperatura y por lo tanto, cualquier daño en los tejidos se debe a reacciones químicas inducidas por la absorción de fotones.<sup>3,4</sup>

Las reacciones fototóxicas pueden producirse por interacción directa entre un componente celular, un fármaco u otro agente exógeno y la luz, o indirectamente cuando el sustrato activado por la luz transfiere su energía a otra molécula generando especies reactivas que causarán el daño. Un ejemplo de lo segundo es la formación de diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS) cuando la energía es transferida a oxígeno molecular.

5

Las estructuras del órgano ocular filtran parte de la radiación incidente. La cornea filtra las radiaciones debajo de 295 nm y en adultos, el cristalino absorbe el intervalo comprendido entre 295 y 400 nm, aún así, la radiación por encima de este valor es transmitida a la retina<sup>6</sup>. Bajo este escenario resulta interesante estudiar los efectos fototóxicos que involucren compuestos endógenos o exógenos capaces de interactuar con luz visible de  $\lambda$  mayor a 400 nm, como así también la interacción, directa o indirecta de dichos compuestos con fármacos de uso tópico.

La importancia del estudio de las posibles interacciones entre ROS y los fármacos oftálmicos de uso tópico radica en que las ROS pueden generarse como resultado de procesos fotoquímicos en órganos expuestos directamente a la luz ambiental (ojos y piel) y también se encuentran normalmente en el medio celular como resultado del metabolismo natural del oxígeno molecular. Por lo tanto, un fármaco administrado en el tratamiento de alguna patología ocular, a pesar de ser transparente a la luz visible, puede sufrir procesos físicos y/o químicos que comprometan su eficacia clínica ya sea disminuyendo su concentración local (dosis administrada) o generando productos de reacción potencialmente tóxicos.<sup>4, 7,26</sup>

En el presente trabajo se estudian las posibles interacciones entre antifúngicos azólicos de uso oftalmológico tópico (tioconazol, clotrimazol y sulconazol) con ROS fotogeneradas bajo diferentes condiciones experimentales, como así también la potencial toxicidad de dichos fármacos frente al microorganismo modelo *Dyctiostelium discoideum*.

En la sección siguiente se proveen los conceptos teóricos en los cuales se funda el presente trabajo.

## 2. Marco Teórico.

### 2.1. Estados excitados.

Una molécula que se encuentra en su estado energético fundamental o basal presenta su configuración electrónica de menor energía. Al absorber energía, generalmente en forma de luz, puede alcanzar estados energéticos excitados. Dichos estados poseen una distribución electrónica diferente al estado basal. Son estados de mayor energía, menos estables y más reactivos, con una duración limitada en el tiempo<sup>21</sup>.

La configuración electrónica de una molécula puede ser de carácter singlete o triplete. El estado singlete corresponde a una distribución en la cual el par electrónico más externo presenta espines apareados, es decir opuestos. El estado triplete, por otro lado, es el que presenta el par electrónico externo con espines desapareados o iguales. Los estados singletes son de mayor energía que los correspondientes estados tripletes. Ésta denominación se aplica tanto a estados basales como excitados y depende exclusivamente de cómo se ubican los electrones del último nivel de energía. Generalmente las moléculas presentan un estado fundamental de carácter singlete<sup>8</sup>.

Cuando una molécula en estado fundamental singlete (S) absorbe luz, la transición ocurre con conservación del espín, por lo tanto el estado electrónico excitado será de carácter singlete ( $^1S^*$ ). Este estado puede desactivarse mediante procesos fotofísicos o fotoquímicos que serán descritos a continuación. A su vez, mediante un proceso llamado cruzamiento entre sistemas (ISC por sus siglas en inglés) puede generar el estado electrónico triplete excitado ( $^1T^*$ ) de menor energía que el correspondiente estado excitado singlete. El estado  $^1T^*$  así formado también puede desactivarse mediante diversos procesos fotofísicos y fotoquímicos.<sup>9</sup>

### 2.2. Procesos fotofísicos.

Las vías de desactivación física de los estados electrónicos excitados ( $^1S^*$  o  $^1T^*$ ) se clasifican en transiciones radiativas, no radiativas y desactivación bimolecular física o *quenching* físico. Son procesos competitivos entre sí y dependiendo de la naturaleza química de las especies involucradas y del medio de reacción se verá favorecida una u otra vía.<sup>10,11</sup>

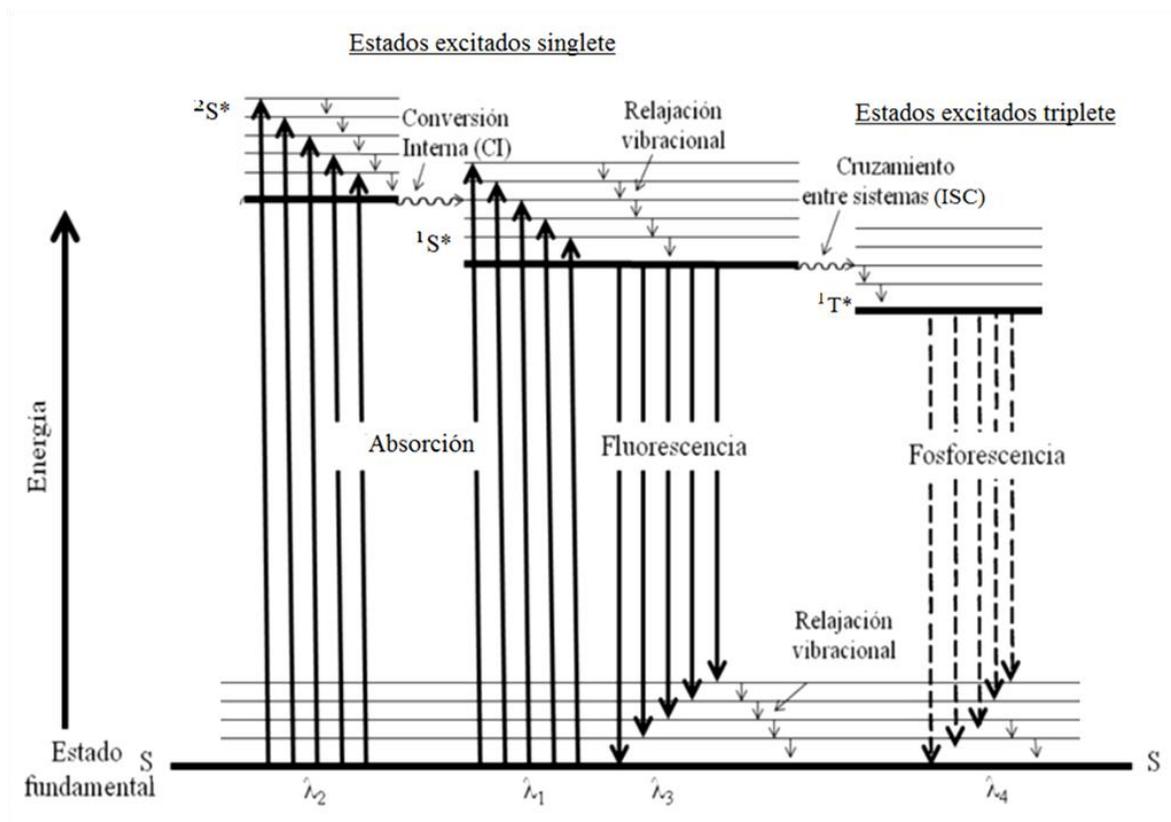
- Transiciones radiativas: consisten en la desactivación de las moléculas excitadas mediante la emisión de luz. De esta forma se libera el exceso de energía y las moléculas regresan a su estado fundamental. Cuando la molécula que emite corresponde a un estado electrónico singlete excitado el proceso se conoce como

fluorescencia. Si la emisión se produce desde un estado electrónico triplete excitado se denomina fosforescencia.

- Transiciones no radiativas: consisten en la desactivación mediante procesos vibracionales que ocasionan la transferencia de energía térmica al solvente, sin emisión de luz. Suele llamarse relajación vibracional si se pierde energía vibracional dentro de un mismo estado electrónico o conversión interna (CI) cuando la transición ocurre entre dos estados electrónicos excitados (diferentes) de igual multiplicidad (desde el nivel vibracional inferior de uno hacia el nivel vibracional superior de otro). El cruzamiento entre sistemas también corresponde a este grupo y tiene lugar cuando la transición no radiativa se produce entre dos estados electrónicos excitados de diferente multiplicidad.
- *Quenching* físico o desactivación bimolecular física: implica la desactivación del estado excitado por interacción con otra molécula. A esta segunda molécula se la denomina *quencher* o desactivante (Q). La desactivación física puede ocurrir mediante *quenching* colisional o mediante transferencia de energía:
  - El *quenching* colisional implica la difusión de ambas especies en solución y la colisión entre sí, perdiéndose la energía de forma no radiativa. Se obtienen ambas moléculas en estado fundamental.
  - La transferencia de energía, como su nombre lo indica, implica la transferencia de energía entre ambas especies dando como resultado a Q en estado excitado (Q\*) y la molécula originalmente excitada en estado fundamental<sup>11</sup>.

Existen otras formas de desactivación bimolecular que corresponden a *quenching* químico. Estos procesos se tratarán en la sección 2.3.

El diagrama de Jablonski (Figura 1) representa gráficamente los procesos fotofísicos recién descritos, exceptuando la desactivación bimolecular. El eje horizontal representa la geometría molecular, por lo que el desplazamiento horizontal implica cambios en las distancias internucleares. El eje vertical representa energía y al desplazarse hacia arriba se encuentran especies más energéticas.



**Figura 1:** Diagrama de Jablonski.

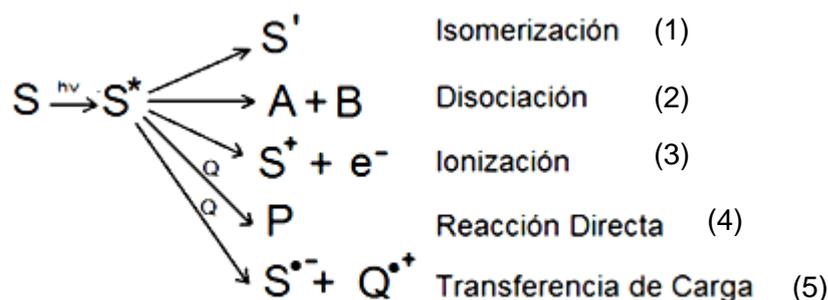
En la gráfica se observan transiciones radiativas representadas con líneas continuas y no radiativas mediante líneas onduladas. Se observan los procesos de absorción, relajación vibracional y conversión interna, fluorescencia, cruzamiento entre sistemas y fosforescencia.  $\lambda_2$  y  $\lambda_1$  representan las longitudes de onda de absorción asociadas a la transición hacia el primer y segundo estado electrónico singlete excitado respectivamente.  $\lambda_3$  corresponde a la longitud de onda de emisión de fluorescencia y  $\lambda_4$  a la de fosforescencia.

### **2.3. Procesos fotoquímicos.**

Una molécula en estado excitado ( $S^*$ ) presenta un exceso energético que aumenta sus posibilidades de reacción respecto de la misma molécula en estado basal ( $S$ ) y puede usarse para impulsar alguna de las siguientes reacciones o procesos fotoquímicos<sup>8,9,10</sup> (Figura 2).

- Procesos intramoleculares - isomerización (proceso 1): interacciones dentro de la misma molécula que producen cambios estructurales o conformacionales.
- Disociación (proceso 2): el exceso de energía favorece la ruptura del enlace y la molécula se fragmenta.

- Ionización (proceso 3): la molécula excitada pierde un electrón dando como resultado una especie cargada que reacciona posteriormente.
- Desactivación reactiva ó *quenching* químico: involucran la interacción con una segunda molécula (Q). Puede proceder mediante reacción directa resultando en productos neutros (proceso 4) o mediante transferencia electrónica para producir iones radicales (proceso 5).



**Figura 2:** Procesos fotoquímicos.

#### **2.4. Tiempo de vida media de estados excitados.**

Los estados excitados por sus características intrínsecas son inestables y se desactivan en cortos periodos de tiempo. Es decir, que pierden el exceso de energía absorbido para alcanzar la configuración electrónica que los caracteriza y así retornar a su forma más estable: el estado fundamental. El tiempo de vida media ( $\tau$ ) es el tiempo promedio que vive una especie excitada, es decir el tiempo promedio que tarda en desactivarse y regresar al estado fundamental. Permite tener una medida de la velocidad con la que se desactiva un estado excitado.

#### **2.5. Rendimiento cuántico de fotoprocesos.**

Debido a la competitividad que existe entre todos los procesos fotofísicos y fotoquímicos que ocurren desde un estado excitado, sea este singlete o triplete; se define el rendimiento cuántico ( $\Phi$ ) como una medida de la eficiencia con la que la luz absorbida produce uno u otro proceso. Matemáticamente se calcula como la fracción de moléculas excitadas que reaccionan por una determinada vía en relación al total de moléculas excitadas (Eq.1) y permite determinar cuáles de todos los fotoprocesos posibles está más favorecido.

$$\Phi = \text{velocidad del proceso} / \text{velocidad de absorción de luz} \quad \text{Eq.1}$$

El valor numérico de este parámetro varía generalmente entre 0 y 1. Un valor de 0,1 implica que 10 de cada 100 moléculas excitadas reaccionan por la vía bajo estudio, mientras que un valor de 1 significa que todas las moléculas que alcanzan el estado excitado reaccionan por la vía estudiada. El valor puede ser mayor a 1 para reacciones en cadena.<sup>9</sup>

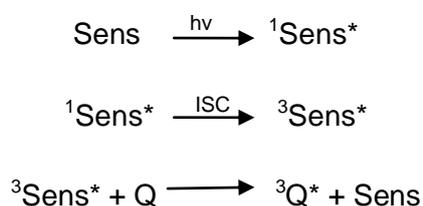
El rendimiento cuántico de un proceso puede variar en función de las condiciones de reacción y las estructuras químicas de los sustratos.

## **2.6. Fotosensibilización.**

Muchas moléculas orgánicas no pueden acceder fácilmente a su estado electrónico triplete excitado debido a su bajo rendimiento cuántico de cruzamiento entre sistemas. La fotosensibilización brinda una alternativa a este problema ya que permite generar cambios en una molécula Q a partir de la absorción inicial de luz por otra molécula diferente a Q. Esta segunda molécula se denomina sensibilizador (Sens).<sup>9,12</sup>

El mecanismo de fotosensibilización implica la transferencia de energía intermolecular entre Sens y Q. En otras palabras, es un proceso de desactivación bimolecular física o *quenching* físico. Ésta interacción permite obtener la molécula Q en su estado excitado, generalmente en estado triplete. El proceso ocurre como se describe a continuación: por absorción directa se obtiene el estado electrónico singlete excitado del sensibilizador (<sup>1</sup>Sens\*) que por cruzamiento entre sistemas evoluciona al estado electrónico triplete excitado <sup>3</sup>Sens\*. Si la molécula (Q) posee un estado fundamental del tipo singlete, al interactuar con <sup>3</sup>Sens\* se obtiene el estado electrónico excitado triplete de Q (<sup>3</sup>Q\*) y Sens se desactiva a su estado basal.<sup>9</sup>

Si la transferencia de energía ocurre a través de una vía radiativa, implica un proceso de emisión por parte de <sup>3</sup>Sens\* y absorción de la radiación por Q. Para que esta interacción sea posible a la longitud de onda de trabajo solo debe absorber Sens y la molécula Q debe absorber en la región en donde <sup>3</sup>Sens\* emite intensamente, es decir, que debe existir solapamiento entre los espectros de emisión de Sens y absorción de Q.<sup>12</sup> La fotosensibilización también puede ocurrir mediante una vía no radiativa, a través de un proceso que implica la transferencia de energía entre <sup>3</sup>Sens\* y Q.



## **2.7. Sensibilizadores.**

Un sensibilizador ideal debe reunir las siguientes características<sup>9,13</sup>

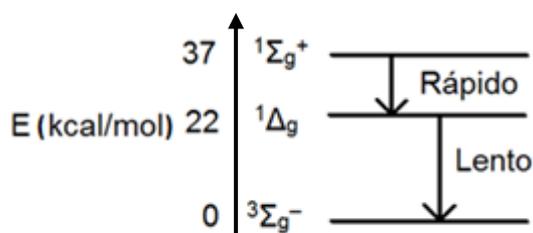
- 1) debe ser excitado por la radiación utilizada.
- 2) debe estar presente en concentración adecuada y absorber más intensamente que los demás sustratos bajo las condiciones de trabajo.
- 3) su velocidad de cruzamiento entre sistemas debe ser mayor que la de transferencia de energía desde el estado electrónico singlete excitado al solvente o a los sustratos.
- 4) la energía del estado electrónico triplete excitado debe ser mayor a la del sustrato aceptor.
- 5) su estado electrónico excitado triplete debe poseer largos tiempos de vida, estabilidad térmica y fotoquímica.

Si bien el sensibilizador ideal no existe, puede encontrarse uno adecuado de acuerdo al sistema a estudiar. La característica más importante a tener en cuenta es la diferencia energética entre  $^3\text{Sens}^*$  y el estado fundamental del aceptor para que la transferencia ocurra exotérmicamente.

## **2.8. Oxígeno singlete.**

El oxígeno es uno de los elementos más abundantes sobre la corteza terrestre y por lo tanto resulta casi inevitable que esté presente en cualquier sistema. En su configuración electrónica de menor energía, a diferencia de la mayoría de las moléculas, posee dos electrones desapareados (regla de Hund) con igual sentido de giro o espín. Es decir, el estado fundamental del oxígeno molecular es un triplete y se simboliza como  $^3\text{O}_2$  ó  $^3\Sigma_g^-$ .<sup>13,14</sup>

Sus dos estados energéticamente excitados más cercanos corresponden a estados singletes, con todos sus electrones apareados. De estos dos, el de menor energía se conoce con el nombre de oxígeno singlete, se simboliza como  $^1\text{O}_2$  ó  $^1\Delta_g$  y se encuentra a 22 Kcal/mol por encima del estado fundamental. El otro estado excitado, simbolizado como  $^1\Sigma_g^+$ , se desactiva rápidamente y no es de interés fotoquímico. El estado  $^1\Sigma_g^+$  se encuentra a 37 Kcal/mol sobre el estado fundamental<sup>15</sup>. En la Figura 3 se muestra un diagrama de energía para dichas especies.

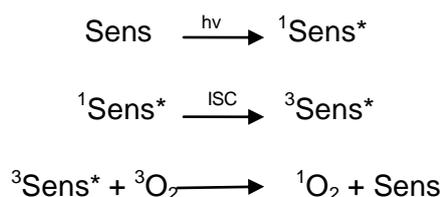


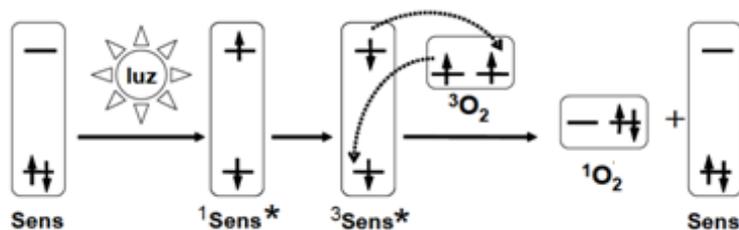
**Figura 3:** Diagrama de energía para oxígeno molecular y sus dos primeros estados excitados.

El  $^1\text{O}_2$  es una especie electrofílica mucho más reactiva (alrededor de 1000 veces más) que el oxígeno en su estado fundamental. Esta diferencia puede explicarse considerando que la mayoría de las moléculas circundantes poseen estados fundamentales del tipo singlete y las reacciones que involucran especies de igual multiplicidad (singlete-singlete o triplete-triplete) son más probables de ocurrir que las de multiplicidad diferente (singlete-triplete). Éste último caso corresponde a reacciones entre oxígeno triplete y la mayoría de las moléculas en su estado fundamental. El oxígeno singlete es más oxidante que el oxígeno molecular y reacciona rápidamente con enlaces carbono-carbono no saturados y también con nucleófilos neutros llegando a oxidar a aminas, sulfuros y fenoles.<sup>16,17,18,19</sup>

### 2.8.1. Generación de oxígeno singlete.

Existen tres formas de generar oxígeno singlete: químicamente, fotoquímicamente y biológicamente<sup>17</sup>. Para los fines del presente trabajo sólo la generación fotoquímica resulta de interés y consiste en un proceso fotosensibilizado en el que el estado electrónico excitado triplete de un sensibilizador transfiere su energía al oxígeno molecular. A diferencia de lo expuesto anteriormente, en este caso, la transferencia de energía procede mediante una vía no radiativa que involucra la colisión entre ambas especies y ocurre con intercambio electrónico. El resultado de este proceso es la generación del estado electrónico excitado  $^1\text{O}_2$  y la desactivación del sensibilizador a su estado fundamental (Figura 4)<sup>13,20</sup>.



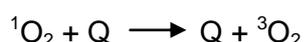
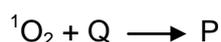


**Figura 4:** Mecanismo de fotosensibilización para la generación de oxígeno singlete.

Para la generación fotoquímica de  $^1\text{O}_2$  se utilizan diferentes colorantes orgánicos, los cuales deben cumplir con los requisitos previamente establecidos. Además, debe sumarse la condición de poseer un alto rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete ( $\Phi_\Delta$ ). Algunos de los más frecuentemente utilizados son fenalenona ( $\Phi_\Delta = 1$ ), rosa de bengala ( $\Phi_\Delta = 0,75$ ) y azul de metileno ( $\Phi_\Delta = 0,5$ ).<sup>20,21,22</sup> Rosa de bengala fue el sensibilizador elegido en este trabajo para el estudio, caracterización y cuantificación de las interacciones entre  $^1\text{O}_2$  y los compuestos antifúngicos. Sus propiedades y características se exponen en la sección 4.1.

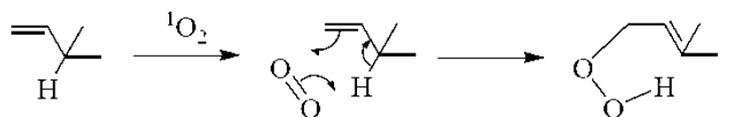
### **2.8.2. Desactivación de oxígeno singlete.**

El tiempo de vida del  $^1\text{O}_2$  depende en gran medida del solvente en el que se encuentre, reduciéndose en aquellos con altas frecuencias vibracionales.<sup>23</sup> Los solventes de este tipo, como el agua, favorecen la relajación no radiativa que es de por sí, más veloz que la desactivación radiativa. El  $^1\text{O}_2$  se desactiva mediante: emisión de luz (fosforescencia), decaimiento no radiativo y en presencia de una sustancia Q capaz de actuar como desactivante, deben considerarse la desactivación por *quenching* físico (regenerando oxígeno molecular en su estado fundamental triplete) y/o por *quenching* químico (reacción con formación de productos) como se muestra en el siguiente esquema.<sup>24,60</sup>



Por lo general, la desactivación reactiva o *quenching* químico de  $^1\text{O}_2$  por moléculas orgánicas involucra cicloadiciones a alquenos o dienos conjugados. Las reacciones típicas de  $^1\text{O}_2$  pueden clasificarse en los siguientes tipos:<sup>60,9</sup>

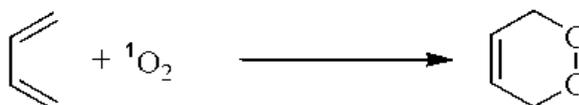
- Reacción “ene” (formación de hidroperóxidos): las reacciones tipo ene ocurren entre alquenos con un hidrógeno alílico y un enlace múltiple (enófilo). Son reacciones de transferencia de grupo que dan como producto el alqueno sustituido con el doble enlace corrido a la posición alílica. Cuando el enófilo es  $^1\text{O}_2$ , el producto es un hidroperóxido.



- Cicloadición 2+2 (formación de dioxetanos):  $^1\text{O}_2$  se adiciona a dobles enlaces dando como productos 1,2 dioxetanos. Es una reacción estereoespecífica.

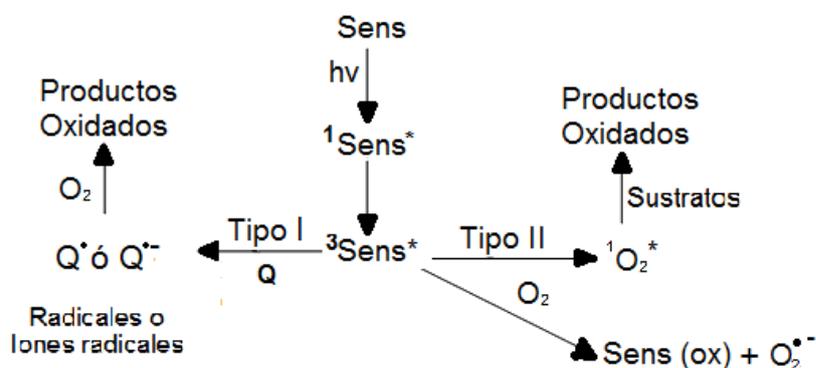


- Cicloadición 4+2 (formación de endoperóxidos): es una reacción del tipo Diels-Alder en donde  $^1\text{O}_2$  se comporta como dienófilo adicionándose a 1,3-dienos para formar endoperóxidos.



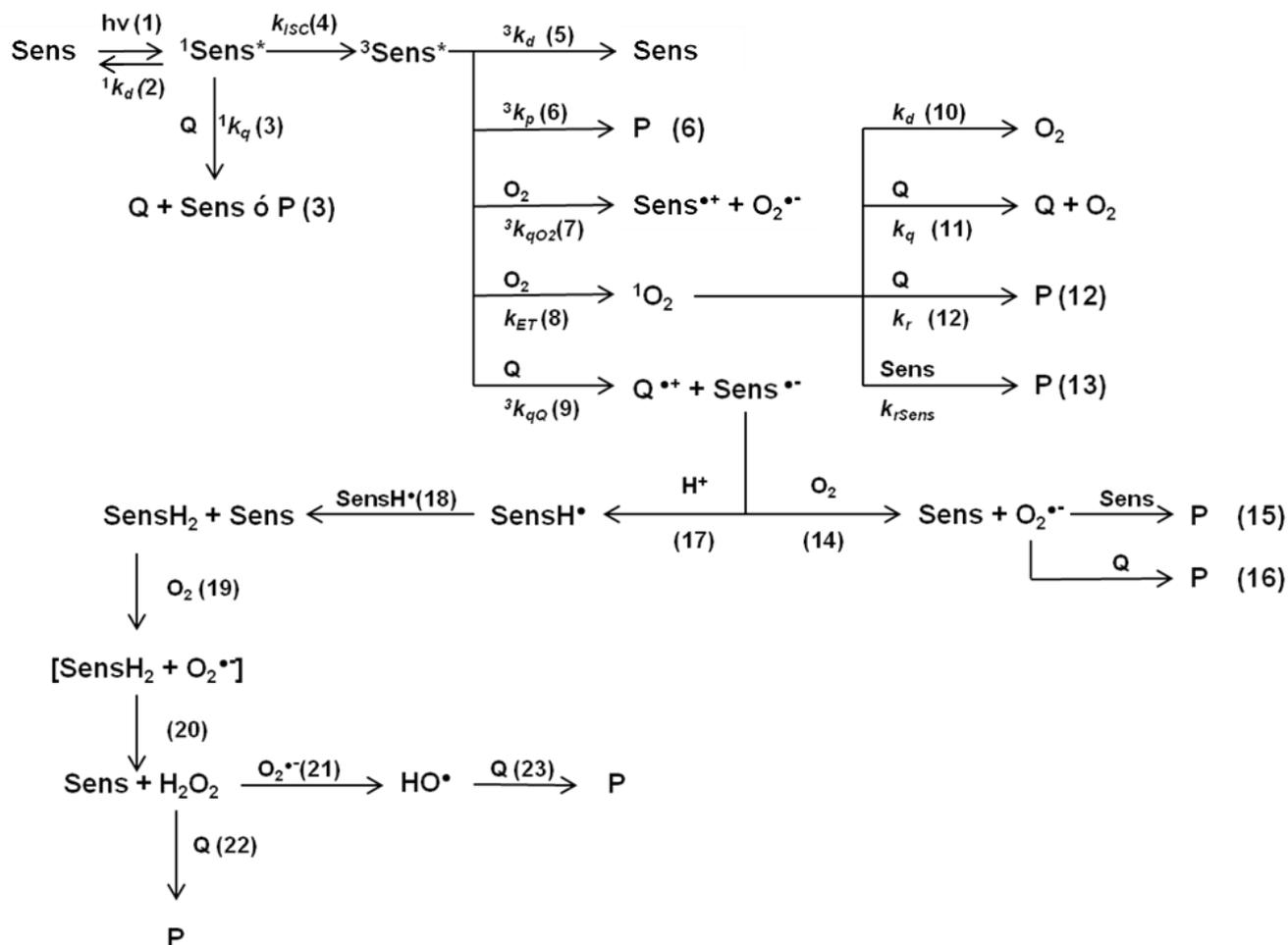
## 2.9. Oxidaciones Fotosensibilizadas.

Las oxidaciones fotosensibilizadas (Figura 5) representan los procesos mediante los cuales pueden obtenerse productos de oxidación como resultado de la absorción inicial de luz por una molécula diferente a la que sufre la oxidación.



**Figura 5:** Esquema de fotooxidaciones sensibilizadas de tipo I y II.

Los mecanismos que dan origen a las oxidaciones fotosensibilizadas pueden involucrar tanto transferencia de energía como transferencia electrónica y pueden ocurrir mediante mecanismos de tipo I y/o tipo II (Figura 6).<sup>17,16,27,25</sup>



**Figura 6:** Mecanismo propuesto para fotooxidaciones sensibilizadas. ( $k$ : constantes de velocidad de:  ${}^1k_d$ : desactivación natural de  ${}^1\text{Sens}^*$ ;  ${}^1k_q$ : desactivación de  ${}^1\text{Sens}^*$  por Q;  $k_{ISC}$ : entrecruzamiento de sistemas;  ${}^3k_d$ : desactivación natural de  ${}^3\text{Sens}^*$ ;  ${}^3k_p$ : formación de productos,  ${}^3k_{qO_2}$ : desactivación de  ${}^3\text{Sens}^*$  por  $O_2$ ;  $k_{ET}$ : transferencia de energía;  ${}^3k_{qQ}$ : desactivación de  ${}^3\text{Sens}^*$  por Q;  $k_d$ : desactivación natural de  ${}^1O_2$ ;  $k_q$ : desactivación física de  ${}^1O_2$  por Q;  $k_r$ : desactivación química de  ${}^1O_2$  por Q;  $k_{rSens}$ : desactivación química de  ${}^1O_2$  por Sens.

El mecanismo tipo I involucra una reacción de transferencia electrónica entre el  $^3\text{Sens}^*$  y el sustrato (o solvente), lo cual, como es propio de este tipo de reacciones, resulta en la formación de iones radicales. Generalmente, el radical cargado positivamente corresponde al sustrato mientras que el sensibilizador forma el radical aniónico ( $^3\text{Sens}^*$  se comporta como oxidante), aunque puede ocurrir a la inversa. En este punto el anión radical del sensibilizador puede seguir múltiples vías que dan origen a diferentes ROS que tras reaccionar con el sustrato darán los correspondientes productos oxidados, tal como se muestra en la Figura 6.

Las oxidaciones fotosensibilizadas de tipo II corresponden a la desactivación de  $^3\text{Sens}^*$  por reacción directa con oxígeno en estado fundamental. Una de las vías corresponde a la formación de  $^1\text{O}_2$  (mediante el mecanismo descrito en la sección 2.8.1) que reacciona posteriormente con el sustrato. La segunda vía, aunque menos común implica la reacción entre  $^3\text{Sens}^*$  y oxígeno molecular mediante una transferencia de carga para dar anión superóxido.

Los mecanismos de tipo I se diferencian de los de tipo II porque no involucran reacción directa entre  $^3\text{Sens}^*$  y oxígeno molecular. Ambas vías ocurren simultáneamente y son competitivas entre sí. Dependiendo de las condiciones experimentales se puede favorecer una u otra.

La Figura 6 muestra el mecanismo propuesto para los principales procesos fotoquímicos que pueden ocurrir al irradiar con luz UV-Visible una solución que contiene un sensibilizador (Sens), un sustrato fotooxidable (Q) y oxígeno disuelto. Por irradiación directa se genera el estado electrónico singlete excitado del Sens:  $^1\text{Sens}^*$  (proceso 1). Ésta especie puede decaer al estado fundamental Sens (proceso 2), ser desactivado por Q (proceso 3) o evolucionar al estado electrónico triplete excitado  $^3\text{Sens}^*$  (proceso 4).  $^3\text{Sens}^*$  así formado puede decaer al estado fundamental Sens (proceso 5), dar lugar a la formación de productos (proceso 6), o puede reaccionar con oxígeno molecular mediante un proceso de transferencia electrónica (proceso 7) generando la especie anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) o mediante transferencia de energía (proceso 8) formando  $^1\text{O}_2$ .  $^3\text{Sens}^*$  puede aceptar un electrón de Q formando la especie semireducida:  $\text{Sens}^{\bullet-}$  al tiempo que genera el catión radical del sustrato  $\text{Q}^{\bullet+}$  (proceso 9).

Por su parte el  $^1\text{O}_2$  puede ser desactivado físicamente por interacción con el solvente (proceso 10) o con el sustrato (proceso 11); o bien puede ser desactivado químicamente tanto por Q (proceso 12) como por el Sens (proceso 13) dando los respectivos productos de reacción. El proceso 12 representa la vía de desaparición más común de Q para procesos mediados por  $^1\text{O}_2$ .

La especie  $O_2^{\bullet-}$  puede generarse paralelamente por transferencia electrónica desde  $Sens^{\bullet-}$  a  $O_2$  (proceso 14). Luego,  $O_2^{\bullet-}$  puede reaccionar químicamente tanto con  $Sens$  (proceso 15) como con  $Q$  (proceso 16) para dar productos oxidados.

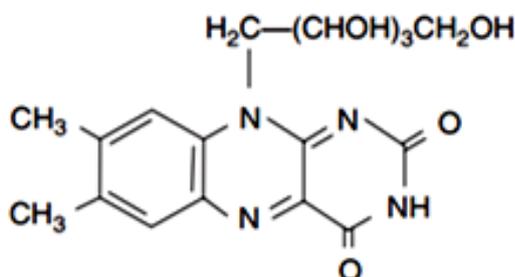
En presencia de un sustrato dador de hidrógeno, puede formarse  $SensH^{\bullet}$ , el radical neutro del sensibilizador (proceso 17), quien puede reaccionar consigo mismo para formar la especie totalmente reducida  $SensH_2$  (proceso 18) mediante la transferencia de un protón. En presencia de  $O_2$ ,  $SensH_2$  puede formar un complejo (proceso 19) que conduce a la reoxidación de  $SensH_2$  dando  $Sens$  y peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$  (proceso 20).  $H_2O_2$  puede reaccionar con  $O_2^{\bullet-}$  generando el radical oxhidrilo  $HO^{\bullet}$  (proceso 21). A su vez,  $H_2O_2$  y  $HO^{\bullet}$  pueden interactuar con  $Q$  para dar productos de oxidación (procesos 22 y 23).<sup>26</sup>

### 2.9.1. Sensibilizadores para procesos tipo I y II.

Para poder estudiar las reacciones que involucran ROS se requiere producirlas *in situ* mediante alguna sustancia sensibilizadora que sea capaz de reaccionar mediante los mecanismos de tipo I y tipo II simultáneamente con rendimientos cuánticos apreciables. Riboflavina es una molécula capaz de cumplir con dicha condición.

#### 2.9.1.1. Riboflavina.

La riboflavina (Rf), también conocida como vitamina  $B_2$ , es un compuesto de color amarillento presente en la mayoría de los sistemas vivos. Posee en su estructura anillos heterocíclicos conteniendo nitrógeno y varios enlaces dobles. Presenta máximos de absorción a 225, 275, 370 y 450 nm a pH neutro.<sup>27</sup> Su estructura química se presenta en la Figura 7.



**Figura 7:** Estructura química de riboflavina (Rf).

A pH ácido existe en su forma catiónica ( $RfH_2^+$ ) mientras que a pH alcalino lo hace en forma de anión ( $Rf^-$ ). La forma catiónica no fluoresce, mientras que las formas neutra y aniónica lo hacen levemente. El valor del rendimiento cuántico de fluorescencia de Rf depende entonces del pH y también, en gran medida, del solvente utilizado. En solventes próticos como metanol, el rendimiento cuántico de fluorescencia es más alto y también lo es el tiempo de vida, en tanto que en solventes apróticos o próticos inorgánicos es menor.<sup>27</sup>

Por su función como vitamina, resulta esencial para el crecimiento y desarrollo de los organismos, la producción y regulación de ciertas hormonas y de los glóbulos rojos.<sup>27</sup>

También ocupa un rol importante en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Tiene una función crucial en la producción de energía en la cadena transportadora de electrones. Es importante para mantener una buena visión, piel, cabello, uñas y está involucrada en el uso de neurotransmisores por lo que se asocia con el bienestar emocional.<sup>27</sup>

Es levemente afectada por el calor, se puede decir que es una molécula termoestable, pero es considerablemente afectada por la luz. La velocidad de fotodegradación es dependiente de la intensidad de la luz, la longitud de onda utilizada y el tiempo de exposición.<sup>27</sup>

Al ser irradiada con luz UV en presencia de oxígeno, la riboflavina es capaz de producir ROS actuando como sensibilizador de reacciones fotoquímicas tanto de tipo I como de tipo II.<sup>27,28,26</sup> La concentración de ROS producidas, dependerá de la cantidad de oxígeno, de riboflavina y de otras sustancias oxidables presentes en el medio.

## **2.10. Especies Reactivas de Oxígeno.**

Se conoce con el nombre de especies reactivas de oxígeno (ROS) a moléculas reactivas que derivan del oxígeno molecular. Las ROS más comunes son: anión superóxido, radical oxhidrilo, hidropéroxilo, peróxido de hidrógeno y el ya descrito oxígeno singlete.

Las ROS se producen naturalmente en las células del cuerpo humano como subproductos del metabolismo. De manera general, la formación de las diferentes ROS involucra la reducción univalente escalonada de oxígeno molecular formando en cada paso especies parcialmente reducidas de oxígeno.<sup>29,19</sup>

Las ROS también pueden generarse a través de reacciones fotosensibilizadas de tipo I o II (Figura 6). Las condiciones para la generación fotoquímica en medios biológicos sólo

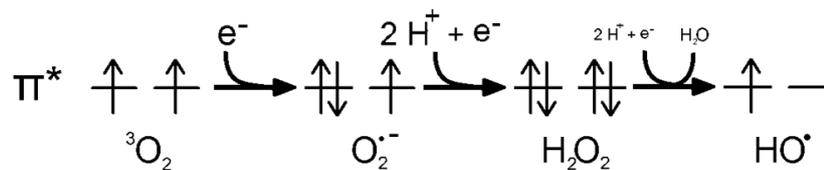


### 2.10.3. Radical Oxhidrilo.

El radical oxhidrilo, de fórmula HO•, es una especie radicalaria, oxidante y muy reactiva. Reacciona mediante transferencia electrónica o abstracción de protón.<sup>16,32</sup>

Se genera a partir de la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por ejemplo al reaccionar con O<sub>2</sub><sup>•-</sup> o con metales<sup>29,19</sup>.

El diagrama de orbitales moleculares del oxígeno en esta especie se muestra a continuación, junto con el proceso de reducción escalonado a partir de oxígeno molecular.



La generación fotoquímica implica la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y su reacción con O<sub>2</sub><sup>•-</sup> u otro agente oxidante (proceso 21, Figura 6).<sup>26</sup>

### 2.11. Estrés Oxidativo y Sistemas Antioxidantes.

Anteriormente se dijo que las ROS se producen espontáneamente en organismos aerobios como resultado del metabolismo natural de cada célula. Cuando hay una sobreproducción de ROS en el organismo y/o cuando existe una falla en el funcionamiento de los sistemas de defensa antioxidantes, se dice que la célula se encuentra en estado de estrés oxidativo.<sup>19</sup> Las ROS por su alta reactividad pueden ser muy dañinas produciendo alteraciones en ADN, proteínas, lípidos y en otras estructuras celulares. La colisión entre una ROS y una biomolécula, provoca que ésta se oxide y se altere su función celular. Si la biomolécula blanco es un lípido, la consecuencia será la alteración de las estructuras celulares ricas en ellos, como membranas y lipoproteínas. Como resultado se verán afectadas la permeabilidad celular y se producirá oxidación de las lipoproteínas de baja densidad. La oxidación lipídica por radicales libres involucra una reacción en cadena en la que los ácidos grasos se convierten en radicales de ácido graso, oxidando moléculas vecinas.<sup>30, 33,35</sup>

Cuando la oxidación por ROS se produce sobre proteínas, las consecuencias incluyen entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de proteínas y formación de grupos carbonilos que terminan por impedir su normal funcionamiento. Dado que las proteínas cumplen muchas y variadas funciones en la célula, esto puede producir alteración en mecanismos de transporte, receptores, hormonas, enzimas, etc.<sup>30,33</sup>

Las ROS también pueden dañar ácidos nucleicos y producir bases nitrogenadas modificadas, lo que tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis, o la pérdida de expresión de algún gen específico.

Los monosacáridos y disacáridos resisten a la acción de radicales libres de oxígeno, incluso algunos de ellos pueden funcionar como desactivadores o *quenchers* de ROS. La glucosa es capaz de retener al  $O_2^{\bullet-}$  y manosa o manitol son capaces de desactivar a  $HO^{\bullet}$ .

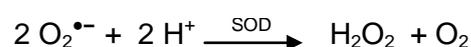
34

Las ROS han sido asociadas a la génesis o al incremento de numerosas patologías del sistema neurológico (enfermedad de Parkinson, Alzheimer, infarto cerebral, etc.), del aparato cardiovascular (aterosclerosis, infarto del miocardio), del aparato ocular (cataratas, daño degenerativo de la retina, fibroplasia retrolental), del aparato respiratorio (distrés respiratorio, tabaquismo, cáncer de pulmón), y también al envejecimiento.<sup>34,30</sup>

Por esta razón existe un sistema de defensa que contrarresta los efectos oxidantes de estas especies en los tejidos vivos y asegura que se formen en proporciones controlables en condiciones fisiológicas. Este sistema tiende a impedir la formación de radicales libres y/o neutralizarlos una vez formados. Se distinguen cinco niveles de defensa que se describen a continuación. Estos sistemas se componen de complejos enzimáticos o sustancias antioxidantes y apuntan, exceptuando el último, a lograr la reducción completa de las especies radicalarias en orden creciente de reactividad.<sup>33</sup>

El primer nivel consiste en sistemas enzimáticos capaces de producir la reducción tetravalente consecutiva de oxígeno, sin liberación de los intermediarios parcialmente reducidos. El sistema citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial logra este objetivo con gran eficiencia siendo responsable del 90% de la reducción de oxígeno en el organismo humano.

Al segundo nivel lo forman enzimas capaces de captar el  $O_2^{\bullet-}$ . La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que se encuentra en el citoplasma, la mitocondria y en el fluido extracelular y cataliza la reducción del  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$  (especie no radicalaria). Esta reacción ocurre normalmente a velocidad lenta, pero en presencia de la enzima se acelera  $10^9$  veces.<sup>29,32,35</sup>



El tercer nivel lo conforman enzimas capaces de neutralizar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Una de ellas es catalasa (CAT), presente en peroxisomas y mitocondrias, capaz de catalizar la siguiente reacción<sup>32</sup>:



Otra enzima capaz de catalizar la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a agua es la glutatión-peroxidasa<sup>35</sup>.

El cuarto nivel consiste en la neutralización del HO<sup>•</sup>, por ejemplo por la acción de la vitamina E o alfa-tocoferol, un antioxidante que se encuentra en membranas biológicas debido a su hidrofobicidad. La vitamina C o ácido ascórbico también reacciona rápidamente con ésta ROS. Éstos antioxidantes presentan a su vez afinidad por otros radicales libres.<sup>30,33,35</sup>

Finalmente el quinto nivel consiste en complejos enzimáticos destinados a la reparación de los daños ya producidos.

Algunas de las razones por las que aumenta la producción de radicales libres en las células humanas y causan escenarios de estrés oxidativo son: la administración de paracetamol, furosemida, agentes como el humo de cigarrillos, las radiaciones ionizantes o la luz solar. También son causantes de sobreproducción de radicales libres: una dieta hipercalórica, dieta insuficiente en antioxidantes, ejercicio extenuante, procesos inflamatorios y traumatismos, fenómenos de isquemia y reperfusión.<sup>33,30</sup>

## **2.12. Antifúngicos azólicos de uso oftalmológico tópico.**

Todas las interacciones que involucran radiación visible son factibles de ocurrir en el órgano ocular, como así también las que implican que un fármaco oftálmico administrado en el tratamiento de alguna patología, a pesar de ser transparente a la luz visible, pueda sufrir reacciones químicas que comprometan su eficacia clínica.<sup>7</sup> En el presente trabajo se estudian las posibles interacciones entre tres antifúngicos de uso oftalmológico tópico con ROS generadas por métodos fotoquímicos (fotosensibilización). Por tal motivo, a continuación se hará una descripción de dichos fármacos.

Con el nombre de antimicóticos o antifúngicos (AF) se conoce a las sustancias capaces de alterar las estructuras de una célula fúngica al punto de inhibir su desarrollo y comprometer su supervivencia. Los antifúngicos elegidos fueron: tioconazol, clotrimazol y

sulconazol; todos pertenecen al grupo de antifúngicos azólicos. Con ese nombre se clasifican a los compuestos con función antimicótica que poseen en su estructura varios anillos fenólicos y anillos heterocíclicos que contienen átomos de nitrógeno. Si poseen dos átomos de nitrógeno se los denomina imidazoles y triazoles si poseen tres.<sup>36,37</sup>

La similitud entre la célula animal y la fúngica representa un problema a la hora de diseñar antifúngicos ya que estos deben ser selectivos frente a la célula patógena. Ambas células contienen esteroides en sus membranas plasmáticas, pero en diferente proporción. Las células humanas contienen mayor porcentaje de colesterol mientras que las fúngicas contienen mayor cantidad de ergosterol. Esta diferencia es el blanco de acción de los antifúngicos azólicos.<sup>36</sup>

Los azoles actúan inhibiendo al citocromo P-450-3-A (complejo enzimático) de células fúngicas a través de la inactivación de la enzima C-14- $\alpha$ -dimetilasa que interrumpe la síntesis de ergosterol en la membrana celular. El crecimiento del microorganismo se afecta al alterarse la permeabilidad y la fluidez de la membrana por acumulación de esteroides tóxicos (intermediarios en la síntesis de ergosterol).<sup>36,38</sup>

Además de la inhibición de la síntesis de ergosterol algunos antifúngicos azólicos tienen capacidad de inhibir la actividad de la ATPasa de la membrana celular fúngica lo que provoca el rápido colapso del gradiente de electrolitos y la concentración intracelular de ATP.<sup>37</sup>

Los antifúngicos azólicos se caracterizan por su actividad fungistática y en general se utilizan en formulaciones de uso tópico para el tratamiento de diferentes tipos de micosis, candidiasis cutáneas y de mucosas, pitiriasis versicolor dermatofitosis o dermatitis seborreica, entre otras. Comercialmente pueden encontrarse en forma de cremas, polvos, *sprays* o soluciones.<sup>37</sup>

Los tres antifúngicos elegidos pertenecen al grupo de los imidazoles, sus fórmulas moleculares y características fisicoquímicas se presentan en la sección 4.1. Clotrimazol fue el primer imidazol de uso clínico, es una droga de amplio espectro actuando incluso frente a algunas bacterias. De uso principalmente tópico, utilizada en formulaciones oculares. Es efectivo contra microorganismos como *Aspergillus*, *Candida*, *Trichomonas*, *Paecilomyces* y *Dreschlera*.<sup>39,40,41,42</sup> Tioconazol y Sulconazol son derivados imidazólicos de uso tópico de desarrollo más reciente con igual mecanismo de acción que los otros compuestos de este grupo, pero su selectividad y superioridad aún están siendo establecidas para infecciones oculares.<sup>39,43,44</sup>

### 2.13. ***Dictyostelium discoideum* como organismo modelo en ensayos de toxicidad.**

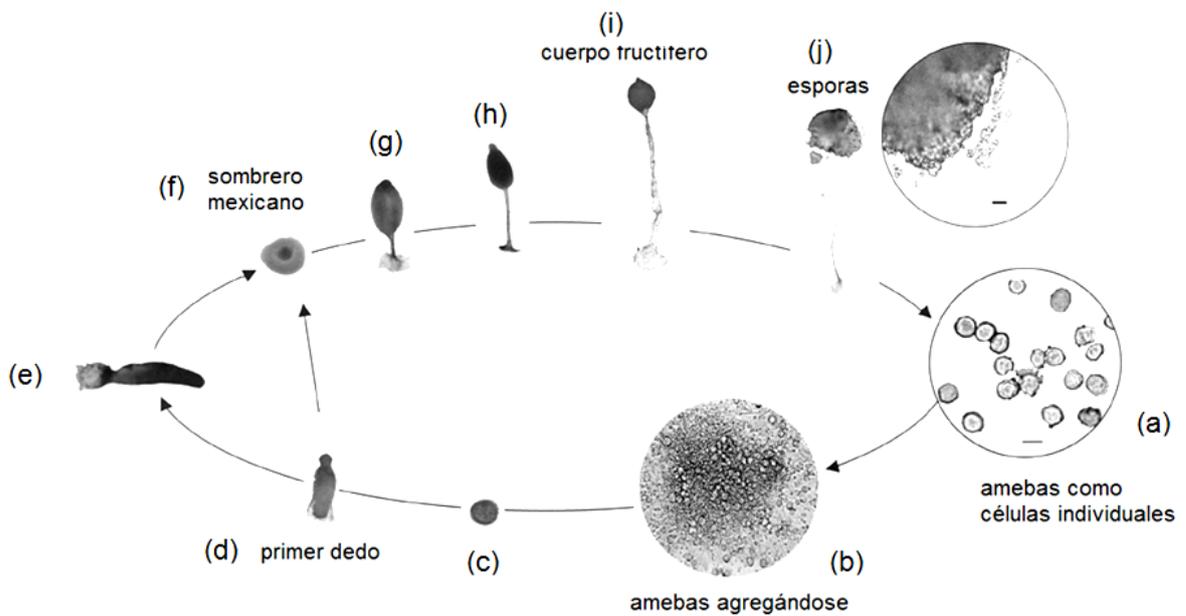
Una de las consecuencias de la interacción entre drogas y ROS es la formación de productos oxidados potencialmente tóxicos. Para poder evaluar la toxicidad de una droga en humanos puede hacerse uso del microorganismo modelo *Dictyostelium discoideum*.<sup>45, 46</sup>

Son varias las características que hacen de este microorganismo uno de los sistemas modelos para realizar ensayos de toxicidad, una de ellas es su ciclo biológico (Figura 8): Las amebas pertenecientes a la especie *D. discoideum* son pequeñas células, del orden de los 20 µm de diámetro, que se alimentan de bacterias y se reproducen por fisión binaria. Habitan en los suelos de bosques y por tanto, periódicamente se producen fluctuaciones en las condiciones ambientales que ocasionan descensos en las poblaciones de bacterias que sirven de alimento para estas amebas. Ante esta situación de escasas de alimento, las amebas *D. discoideum* son capaces de responder juntándose y comenzando un proceso de desarrollo en el que se comportan como un sólo organismo. En principio se forma una masa amorfa de células, que en el transcurso de 24 horas desarrolla diferentes estructuras hasta convertirse en un cuerpo fructífero formado por un disco basal y un tallo coronado por una pequeña esfera. Alrededor del 80% de las amebas iniciales se encuentran dentro de esta esfera llamada soro, el 20% restante se sacrifica para constituir el disco basal formado por células muertas. Las amebas dentro del soro forman esporas y pueden permanecer en este estado de latencia durante varias semanas, germinando únicamente cuando las condiciones ambientales son favorables.<sup>47</sup> Es un organismo paradigmático ya que exhibe la morfología simple de una célula eucariota al tiempo que presenta un complejo programa de desarrollo multicelular que recuerda a un modelo de desarrollo animal.<sup>48</sup>

Otra de las razones que hacen al uso de éste microorganismo como sistema modelo es su similitud con las propias células humanas. El genoma de *D. discoideum* fue secuenciado en el año 2005, y muchas de las proteínas que éste codifica son similares a proteínas humanas. Además existen 746 dominios funcionales conservados entre humanos y *D. discoideum* implicados en procesos como proliferación, adhesión, motilidad, diferenciación celular, rutas de transducción de señales, replicación de ADN, transcripción y traducción. Establecer la secuencia del genoma de esta especie permitió concluir que se trata de un grupo independiente de plantas, hongos y animales y se encuentra desde un punto evolutivo, igualmente distanciado de todos ellos.<sup>49</sup> Las otras razones que hacen de esta ameba un microorganismo modelo son su fácil cultivo en laboratorio y su fácil manipulación, por ejemplo en experimentos del tipo genético en los que el carácter haploide de sus células representa otra gran ventaja.

Por sus características, *D. discoideum* ha sido utilizado en estudios asociados con la motilidad celular y quimiotaxis, la diferenciación y el desarrollo celular, en estudios de respuesta y resistencia a fármacos, de enfermedades hereditarias y de toxicidad entre otros.<sup>46,47</sup>

La Figura 8 muestra el ciclo de vida de *D. discoideum*, el mismo comienza en (a) la fase de crecimiento y multiplicación de células individuales. Cuando el alimento empieza a escasear (b) se activan procesos de quimiotaxis que provocan la agregación de las amebas originando el primer estadio multicelular (c). Éste se convierte luego en el “primer dedo” (d) y continua atravesando numerosos estadios (e, f, g, h) debido a la migración de las amebas dentro del mismo. El proceso culmina con la formación del cuerpo fructífero (i), dentro del cual se forman las esporas (j).



**Figura 8:** Ciclo vital de la ameba *Dictyostelium discoideum*.

### 3. Objetivos.

#### 3.1. Objetivo General.

- Aportar conocimiento para el desarrollo de nuevos fármacos oftálmicos que posean mayor eficiencia clínica, menores efectos colaterales y mínima toxicidad.

#### 3.2. Objetivos específicos.

- Estudiar la cinética y el mecanismo de los procesos degradativos de antifúngicos oftálmicos de uso tópico mediados por especies reactivas de oxígeno fotogeneradas, a través de la determinación de las constantes de velocidad de los diferentes procesos involucrados.
- Examinar la eventual capacidad de los fármacos oftálmicos para generar especies reactivas de oxígeno, bajo condiciones de irradiación directa.
- Evaluar la potencial toxicidad *in vitro* de los eventuales productos a los que daría lugar la oxidación de los fármacos oftálmicos mediada por especies reactivas de oxígeno.

#### 4. Materiales y Métodos.

##### 4.1. Reactivos y Solventes.

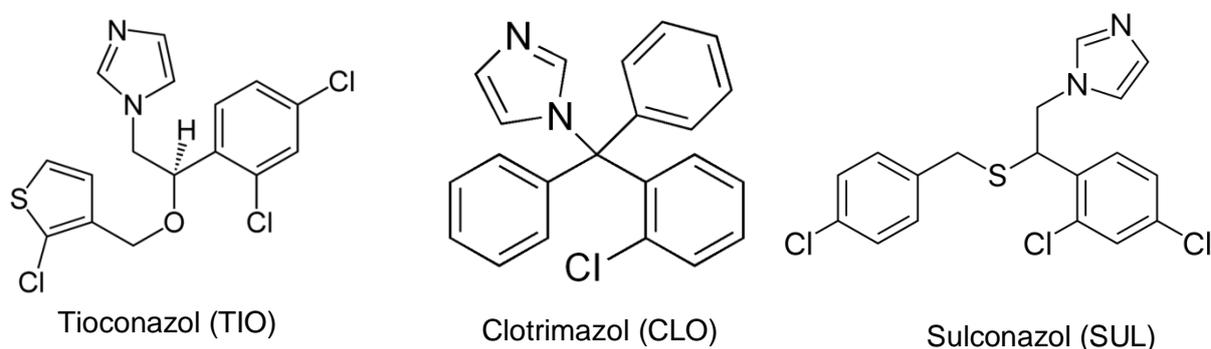
Los antifúngicos clotrimazol, tioconazol y sulconazol fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

1-[2-Clorofenil]-difeníl-metil-imidazol, también conocido como clotrimazol (CLO) es un antifúngico imidazólico de fórmula molecular es  $C_{22}H_{17}N_2Cl$ , su peso molecular es 344,8 g/mol. Es un sólido a temperatura ambiente y posee un punto de fusión de 141-145°C. CLO es soluble en agua (49mg/ml) y en solventes orgánicos como cloroformo, alcohol etílico, acetato de etilo y acetona.<sup>50</sup>

Tioconazol (TIO) es el nombre comercial de (RS)-1-[2-[(2-clorotiofen-3-il)metoxi]-2-(2,4-diclorofenil)etil]imidazol, un antifúngico del grupo de los imidazoles de fórmula  $C_{16}H_{13}Cl_3N_2OS$  y peso molecular 387,7 g/mol. Se presenta en forma sólida a temperatura ambiente con un punto de fusión de 168°C

La fórmula molecular de sulconazol (SUL) es  $C_{18}H_{15}Cl_3N_2S$  y su nombre IUPAC es 1-[(2R)-2-[(4-clorofenil)metilsulfanil]-2-(2,4-diclorofenil)etil]imidazol. Este antifúngico imidazólico también puede presentarse en forma de sal como nitrato de sulconazol. En su forma salina tiene un peso molecular de 460,7g/mol. Se presenta como cristales blancos que funden a 130°C. Es completamente soluble en piridina y parcialmente soluble en solventes como alcohol etílico, acetona o cloroformo. Es muy poco soluble en agua.<sup>51</sup>

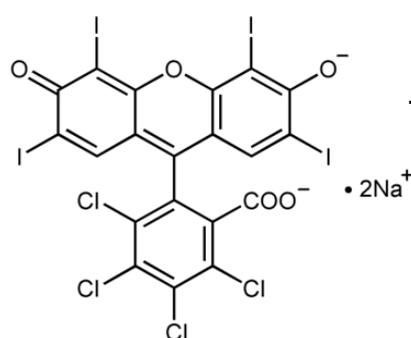
En la Figura 9 se presentan las estructuras químicas de estos tres antifúngicos.



**Figura 9:** Estructuras químicas de tioconazol (TIO), clotrimazol (CLO) y sulconazol (SUL).

Los sensibilizadores: rosa de bengala (RB) y riboflavina (Rf), los compuestos de referencia: alcohol furfurílico y perinaftenona; los inhibidores de ROS: D-manitol, superóxido dismutasa, catalasa y azida de sodio; y el hidróxido de sodio también fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

Rosa de bengala (4,5,6,7-tetracloro-3',6'-dihidroxi-2',4',5',7'-tetrayodo-3*H*-spiro [isobenzofuran-1, 9'-xanten] -3-uno) es un colorante orgánico<sup>52</sup> de fórmula  $C_{20}H_4Cl_4I_4O_5$  que puede presentarse también en forma de sal como  $C_{20}H_4Cl_4I_4O_5Na_2$ , en la forma salina el peso molecular del compuesto es 973,67 g/mol. La Figura 10 muestra la estructura química de este colorante.



**Figura 10:** Estructura química del sensibilizador rosa de bengala (RB).

La estructura química y propiedades del sensibilizador riboflavina (7,8-dimetil-10-[(2*S*,3*S*,4*R*)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil]benzo[*g*]pteridina-2,4-diona) fueron presentadas en la sección 2.9.1.1.

Se utilizó metanol de calidad HPLC y ácido clorhídrico provenientes de Sintorgan. Se utilizó también agua tridestilada proveniente del departamento de química de la UNRC.

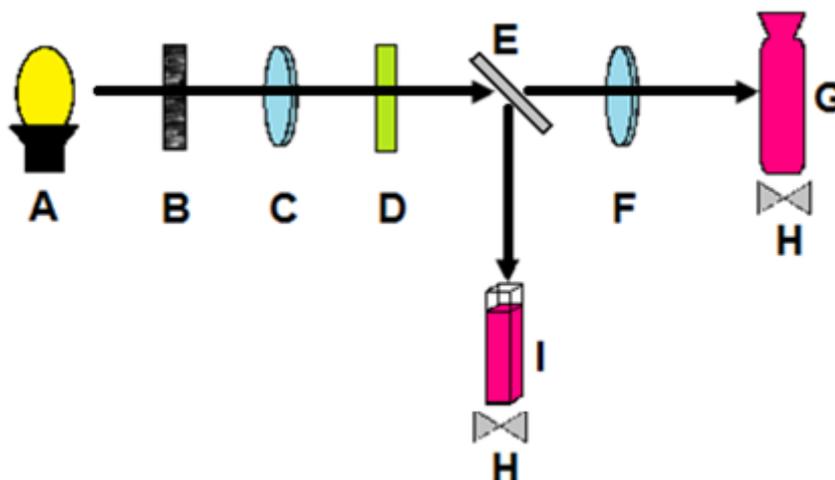
Se usó metanol deuterado y agua deuterada provenientes de Sigma-Aldrich.

Para los ensayos de toxicidad se utilizaron además los siguientes reactivos:  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ , glucosa y  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  obtenidos de Cicarelli. Peptona de carne obtenida de Britania y Cicarelli. Extracto de levadura de Oxoid.  $KH_2PO_4$  y NaCl suministrados por Anedra. Tripteína y agar-agar suministrado por Sigma-Aldrich. Se utilizó el microorganismo *Dyctiostelium discoideum* y la cepa *Pseudomonas putida*.

## 4.2. Equipos.

### 4.2.1. Fotólisis estacionaria.

Los estudios de fotólisis estacionaria se realizaron utilizando un equipo fotolizador como el que muestra la Figura 11:



**Figura 11:** diagrama del equipo de fotólisis estacionaria. **A:** Lámpara de cuarzo-halógeno. **B:** Filtro térmico. **C y F:** Lentes. **D:** Filtro de corte. **E:** Espejo. **G:** Celda de reacción (50 ml). **I:** Celda de cuarzo. **H:** Agitador magnético.

Este fotolizador fue construido en nuestro laboratorio y cuenta con una lámpara de cuarzo-halógeno de 150 W de potencia como fuente de irradiación de luz UV-Visible. La lámpara se focaliza, mediante el uso de lentes, hacia una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico o hacia una celda de reacción de 50 ml, dependiendo de la experiencia que se lleve a cabo (consumo de sustrato o consumo de oxígeno respectivamente).

Dentro del equipo de fotólisis se adiciona también un filtro térmico y un filtro de corte adecuado de manera tal que la luz sólo sea absorbida por el sensibilizador.

La celda de reacción se utiliza en conjunto con un electrodo Orion 97-08 acoplado a un pHmetro Orion 720. Este electrodo es específico para la detección de oxígeno disuelto y está conformado por dos electrodos de plata polarizados, un electrolito y una membrana permeable a gases. El oxígeno disuelto en la muestra difunde hacia la membrana y se reduce allí a iones oxhidrilo. Esta reducción genera una diferencia de potencial que mediante el pHmetro es traducida a partes por millón (ppm) de oxígeno disuelto.

El material de la membrana del electrodo exige que éste sólo pueda utilizarse en soluciones con altos porcentajes de agua, dentro de un intervalo de pH entre 3 y 12, y con concentraciones de oxígeno disuelto menores a 14 ppm. El electrodo Orion 97-08 debe calibrarse en agua saturada de aire a presión atmosférica antes de realizar cualquier determinación.<sup>53,54</sup>

La celda de cuarzo se utiliza cuando se monitorea el transcurso de la reacción a través de medidas de consumo de sustrato, ya sea por espectroscopía de absorción UV-Visible o por fluorescencia.

#### **4.2.2. Espectroscopía de absorción UV-Visible.**

Para las experiencias que hacen uso de la técnica de espectroscopia de absorción UV-Visible se utilizó un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV 2401 PC.

Dos lámparas diferentes que trabajan en conjunto conforman la fuente de irradiación de este equipo. Una de ellas es una lámpara de halógeno de 50 W de potencia y la otra es de deuterio. La combinación de las longitudes de onda emitidas por ambas lámparas permite que el equipo trabaje dentro del intervalo 190 - 900 nm. La luz de la fuente se separa en sus longitudes de onda a través de una red de difracción holográfica que funciona como monocromador. Tras atravesar la muestra, la luz es detectada por un fotomultiplicador. Celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico fueron utilizadas en todas las determinaciones.

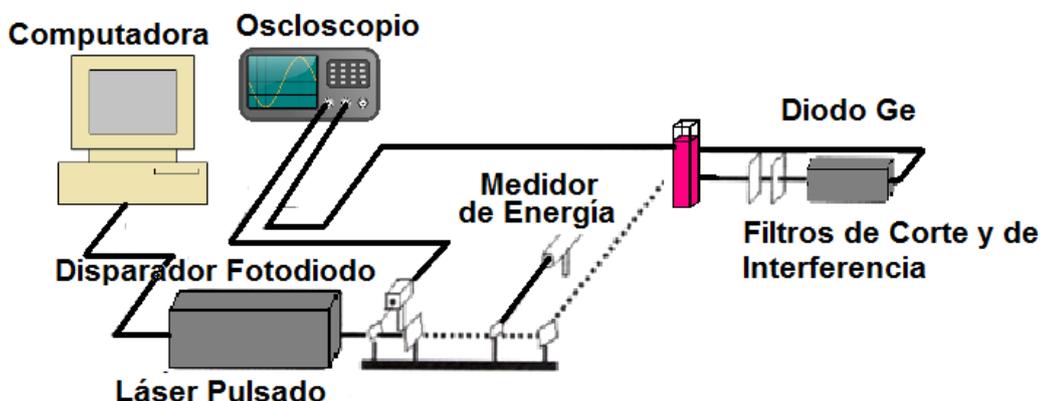
#### **4.2.3. Fluorescencia estacionaria.**

Para las determinaciones que utilizan la técnica de emisión de fluorescencia estacionaria se utilizó un espectrofluorómetro Fluoromax SPEX 320.

Este equipo posee como fuente de excitación una lámpara de xenón libre de ozono de 150 W y como detector un fotomultiplicador sensible hasta 850 nm. La señal emitida es detectada en un ángulo de 90° respecto del haz de excitación. El equipo cuenta con un software de análisis DM 3000 3.2. Las determinaciones se realizaron usando celdas de cuarzo para fluorescencia de 1 cm de paso óptico. La temperatura se mantuvo en  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.4. Detección de fosforescencia de oxígeno singlete resuelta en el tiempo.

El equipo utilizado para la detección de la señal de fosforescencia de oxígeno singlete resuelta en el tiempo TRPD (Time Resolved Phosphorescence Detection) se presenta en la Figura 12.



**Figura 12:** Diagrama del equipo para la detección de fosforescencia de  $^1\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ .

Se conforma por un láser de Nd:Yag (Spectron SL 400) como fuente de excitación capaz de emitir a 1064 nm, 532 nm, 355 nm y 266 nm, correspondientes a la primera, segunda, tercera y cuarta armónica, respectivamente. El mismo posee un ancho de pulso de 18 ns y 350 mJ en la primera armónica.

La radiación fosforescente emitida por oxígeno singlete a 1270 nm genera una señal eléctrica en un detector de germanio (Judson J16/8sp) equipado de una serie de filtros de corte y de interferencia, ubicados en ángulo recto respecto del haz de excitación. La señal es digitalizada mediante un osciloscopio (Hewlett Packard 54504A) y luego es transferida a una computadora personal a través de una interface IEEE para realizar el procesamiento de los datos.<sup>55,56</sup> La señal fue tomada luego de aproximadamente 8-10 disparos a fin de lograr una buena relación señal/ruido.

#### 4.2.5. Ensayos de toxicidad.

En los ensayos de toxicidad se utilizó un microscopio óptico vertical Carl Zeiss Axiolab. Se trata de un microscopio de campo claro compuesto de dos series de lentes (lentes del objetivo y lentes del ocular) que funcionan en conjunto para producir la imagen. En este tipo de microscopio, las muestras se visualizan gracias a las diferencias de contraste entre ellas y el medio que las rodea<sup>57</sup>.

Se utilizó también una lupa binocular MEOPTA 23.2.

### **4.3. Metodología.**

#### **4.3.1. Preparación de soluciones para los ensayos de fotooxidación.**

Las soluciones de los antifúngicos se prepararon utilizando como solvente una mezcla constituida por 60%  $\text{v/v}$  de metanol y 40 %  $\text{v/v}$  de agua tridestilada. Ésta fue la proporción de solventes con mayor porcentaje de agua que permitió la disolución completa de los sustratos a una concentración del orden de  $10^{-3}$  M. En esta mezcla de solventes, se agregó el sensibilizador en concentración adecuada al tipo de experimento a realizar. Luego, en dicha solución se disolvieron los sustratos a las concentraciones requeridas para cada tipo de determinación.

Los valores específicos de concentración y absorbancia utilizados en cada experiencia se detallan en los apartados correspondientes a cada una de ellas.

#### **4.3.2. Determinación de los coeficientes de absortividad molar de los antifúngicos estudiados.**

La determinación del coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon$ ) de los antifúngicos se realizó haciendo uso de la ley de Lambert-Beer (Eq.2):

$$A^\lambda = \epsilon^\lambda b [Q] \quad \text{Eq.2}$$

Esta ecuación, relaciona la absorbancia de la solución a longitud de onda fija ( $A^\lambda$ ) con la concentración molar del sustrato ( $[Q]$ ) y el ancho, o paso óptico, de la celda utilizada ( $b$ ). La ecuación implica una relación lineal entre  $A^\lambda$  y  $[Q]$  cuando  $b$  es constante. Esta relación está dada por el coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon^\lambda$ ) a una dada longitud de onda<sup>58</sup>.

Para cada AF, se prepararon soluciones de diferentes concentraciones utilizando como solvente la mezcla descrita en la sección anterior. Para cada solución se registró el valor de absorbancia a una dada longitud, utilizando para ello celdas de cuarzo de 1cm de paso óptico. Finalmente haciendo uso de la ley de Lambert-Beer (Eq.2), se ajustaron los datos a gráficas lineales con ordenada al origen igual a cero. De las pendientes se obtuvo el valor de  $\epsilon$  a una dada longitud de onda ( $\epsilon^\lambda$ ).

#### **4.3.3. Fotolisis estacionaria.**

La fotolisis estacionaria consiste en la irradiación continua de una muestra con luz de intensidad constante. El tiempo de irradiación puede ser variable extendiéndose desde segundos hasta horas dependiendo de la velocidad de la reacción.

Para los experimentos de consumo de sustrato, la mezcla de reacción (agua, metanol, sensibilizador y sustrato) se colocó en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico y se irradió utilizando un filtro de corte a 361 nm. El filtro absorbe las longitudes de onda inferiores a 361 nm y dado que ninguno de los sustratos absorbe por encima de esa longitud de onda, su uso garantiza que sólo el sensibilizador sea quien interacciona con la luz. La experiencia consistió en irradiar la muestra y tomar espectros UV-Visible tras periodos de tiempo de irradiación controlados.

Para las experiencias de consumo de oxígeno, se utilizó una celda de reacción de 50 ml, provista de un electrodo específico para oxígeno disuelto (Orion 97-08) como ya se describió en la sección 4.2.1 Se trabajó con conversiones menores al 10% para evitar posibles interferencias de los productos generados.

Las soluciones se prepararon utilizando la mezcla de solventes descrita en la sección 4.3.1. Los sensibilizadores se disolvieron hasta lograr una absorbancia dentro del intervalo 0,5 - 0,6 a la  $\lambda$  de máxima absorción en la zona visible del espectro.

Para las experiencias de consumo de sustrato, los AF se disolvieron en concentraciones que permitieron obtener absorbancias dentro del intervalo 0,8 – 1 a la  $\lambda$  que fue seleccionada para monitorear la absorbancia en función del tiempo de fotólisis.

En el caso de los experimentos de consumo de oxígeno, la concentración de AF fue de  $1 \times 10^{-3}$  M.

#### **4.3.4. Determinación de la constante de velocidad de desactivación reactiva de oxígeno singlete por los antifúngicos ( $k_r$ ).**

La constante de velocidad de desactivación reactiva de oxígeno singlete ( $k_r$ ) por los AF fue determinada empleando el sensibilizador RB, el cual es un generador exclusivo de  $^1\text{O}_2$ .<sup>21,29</sup> Se utilizó una variante del método propuesto por Foote y Ching, ya que en lugar de seguir el consumo de sustrato se monitoreó el consumo de oxígeno.<sup>59</sup> En tal sentido, se supone que la reacción entre oxígeno singlete y el sustrato ocurre con una estequiometría 1:1 (moles de oxígeno singlete: moles de sustrato) y que es la única fuente de consumo de oxígeno. La relación de pendientes de gráficos de primer orden para el consumo de oxígeno vs. tiempo de irradiación por AF (pendiente (AF)) y por un compuesto de referencia (pendiente (R)), ambos en idéntica concentración, es igual a la relación ( $k_r / k_{r(R)}$ ) mostrada en la ecuación 3 (Eq.3).

Para emplear este método<sup>7,53,54</sup> es necesario que ambos consumos de oxígeno sean determinados en igualdad de condiciones (solvente, concentración de sensibilizador,

concentración de sustrato, intensidad de iluminación, geometría del fotolizador, temperatura, etc.) y también conocer la constante de velocidad de desactivación reactiva de oxígeno singlete por el compuesto de referencia ( $k_{r(R)}$ ). Luego  $k_r$  puede obtenerse empleando la siguiente ecuación (Eq.3):

$$\text{pendiente (AF) / pendiente (R)} = k_r / k_{r(R)} \quad \text{Eq.3}$$

#### **4.3.5. Determinación de la constante de velocidad de desactivación total de oxígeno singlete por los antifúngicos ( $k_t$ ).**

La constante de velocidad de desactivación total,  $k_t$  (desactivación reactiva más desactivación física, procesos 11 y 12, Figura 6) de oxígeno singlete por los AF se determinó mediante la técnica de detección de fosforescencia de oxígeno singlete a 1270 nm. Se trabajó con solución de RB a  $A=0,2-0,3$  a la  $\lambda$  de excitación del láser (532 nm). Como solvente se utilizó  $D_2O$  en lugar de  $H_2O$  con el fin de incrementar el tiempo de vida de  $^1O_2$ , ya que dicho valor en  $H_2O$  es del orden del tiempo de respuesta del detector utilizado (4-5  $\mu s$ ).

La señal de decaimiento de fosforescencia de  $^1O_2$  está dada por la ecuación 4 (Eq.4):

$$I = I_0 e^{-t/\tau} \quad \text{Eq.4}$$

Donde  $I_0$  es la intensidad de la señal a tiempo cero y  $\tau$  el tiempo de vida de  $^1O_2$  y  $t$  es el tiempo. El ajuste de las trazas del decaimiento a través de la ecuación 4 permite obtener el tiempo de vida de  $^1O_2$ , en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de un sustrato.

Para obtener el valor de  $k_t$  se realiza un análisis gráfico de tipo Stern-Volmer<sup>54,55</sup> sobre los datos (Eq.5):

$$\tau_0/\tau = 1 + k_t \tau_0 [AF] \quad \text{Eq.5}$$

Donde  $\tau_0$  es el tiempo de vida de  $^1O_2$  en ausencia del sustrato desactivante (AF) y  $\tau$  en presencia del mismo. A partir de la pendiente de una gráfica de  $\tau_0/\tau$  en función de  $[AF]$  se puede conocer el valor de  $k_t$ , conociendo el valor de  $\tau_0$ .

Dividiendo la ecuación 5 (Eq.5) por  $\tau_0$  se puede determinar el valor de  $k_t$  directamente de la pendiente de una gráfica de  $1/\tau$  en función de la concentración de AF y de esta forma es posible independizarse del valor de  $\tau_0$ .

#### **4.3.6. Determinación de la naturaleza de las especies reactivas de oxígeno que participan en la fotodegradación de los antifúngicos sensibilizada por riboflavina.**

Para investigar la participación de las diferentes ROS en la fotodegradación sensibilizada por Rf de los AF, se evaluaron las velocidades relativas de consumo de oxígeno en presencia y ausencia de inhibidores específicos de ROS.

Se registró el consumo de oxígeno en las muestras de los AF en función del tiempo de irradiación. Dado que Rf es capaz de generar diferentes ROS simultáneamente, no es posible conocer *a priori* con cuáles de ellas está reaccionando el AF.

En presencia de Rf, se utiliza la velocidad de consumo de oxígeno como medida de la reactividad del AF con las ROS que se estén generando simultáneamente en el medio de reacción. Al comparar el valor de la velocidad de consumo de oxígeno en presencia y en ausencia de cada uno de los inhibidores específicos de ROS se puede identificar cuál especie participa en el proceso de fotodegradación.

Se utilizaron soluciones de los AF de concentración  $1 \times 10^{-3}$  M, y Rf con absorbancia dentro del intervalo 0,5 - 0,6 a 445 nm. Los inhibidores de ROS fueron agregados de manera separada a esta mezcla de reacción. Los inhibidores utilizados fueron: azida de sodio<sup>60,61</sup> ( $\text{NaN}_3$ ) como inhibidor de  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ , la enzima superóxido dismutasa<sup>62,63,64</sup> (SOD) como inhibidor de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , catalasa<sup>32</sup> para  $\text{H}_2\text{O}_2$  y D-manitol<sup>65</sup> como inhibidor específico de  $\text{OH}^{\cdot}$ .

#### **4.3.7. Determinación de la interacción entre el estado electrónico singlete excitado de riboflavina y los antifúngicos.**

La constante de velocidad de desactivación del estado electrónico excitado singlete de Rf por los AF ( $^1k_q$ , proceso 3, Figura 6), fue determinada por medidas de fluorescencia estacionaria. Se trabajó con solución de Rf de  $A_{355 \text{ nm}} \approx 0,2-0,3$ . La temperatura se mantuvo en  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Se tomaron los espectros de emisión de Rf en ausencia y presencia de cantidades crecientes de los AF excitando a 445 nm. Se determinaron los valores de intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de máxima emisión de  $^1\text{Rf}^*$  ( $\lambda=520 \text{ nm}$ ). Con estos datos se realizó un tratamiento gráfico de tipo Stern-Volmer<sup>10</sup> de acuerdo a la siguiente ecuación (Eq.6):

$$I_0/I = 1 + K_{SV} [\text{AF}] = 1 + ^1k_q \tau_0 [\text{AF}] \quad \text{Eq.6}$$

En donde  $I_0$  es la intensidad de fluorescencia de Rf en ausencia de desactivante (AF),  $I$  es la intensidad de fluorescencia de Rf en presencia de AF.  $K_{SV}$  es la constante de Stern-Volmer ( $K_{SV} = 1/k_q \tau_0$ ),  $1/k_q$  es la constante de velocidad de desactivación del estado electrónico singlete excitado de Rf por los AF y  $\tau_0$  es el tiempo de vida de dicho estado en ausencia de AF.

#### **4.3.8. Determinación de la interacción entre el estado electrónico triplete excitado de rifloflavina y los antifúngicos.**

La interacción entre AF y el estado electrónico excitado triplete de Rf ( $^3Rf^*$ ) inicia los procesos de foto oxidación sensibilizada de tipo I. Esta interacción puede ser detectada cualitativamente mediante espectrofotometría UV-Visible utilizando soluciones libres de oxígeno<sup>66</sup>. Se evalúa la disminución en la absorbancia de Rf a 445 nm en función del tiempo de irradiación, en ausencia y en presencia de una dada concentración del sustrato desactivante (AF) en soluciones saturadas con argón.

#### **4.3.9. Rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete por los antifúngicos.**

Para estas determinaciones se utilizó el equipo descrito en la sección 4.2.4, usando como longitud de onda de excitación 266 nm (la cuarta armónica del láser Nd:Yag). La determinación del rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete ( $\Phi_{\Delta}$ ), se realizó haciendo uso de un método actinométrico que utiliza como referencia (actinómetro) un compuesto con valor de  $\Phi_{\Delta}$  conocido en las condiciones de trabajo.

Experimentalmente se detecta la intensidad de la emisión de fosforescencia de  $^1O_2$  como una señal eléctrica. Ésta señal es proporcional a la concentración de  $^1O_2$  en la solución.

La relación de los valores de intensidad de fosforescencia a tiempo cero ( $I_0$ ) del sustrato y de la referencia permite obtener valores relativos de  $\Phi_{\Delta}$  siempre que sean determinados en igualdad de condiciones (mismo solvente, geometría del láser, longitud de onda, misma energía del láser e igual absorbancia del sustrato y la referencia a la longitud de excitación). Experimentalmente es conveniente medir la  $I_0$  en función de la energía del láser y determinar el  $\Phi_{\Delta}$  para un dado sustrato haciendo uso de la ecuación 7 (Eq.7):

$$\Phi_{\Delta AF} = \Phi_{\Delta R} \frac{I_{0E-AF}}{I_{0E-R}} \quad \text{Eq.7}$$

Donde  $\Phi_{\Delta R}$  es el rendimiento cuántico de generación de  $^1O_2$  por la referencia,  $I_{0E-AF}$  es la pendiente de un gráfico de  $I_0$  en función de la energía del láser para los sustrato (en

este caso los antifúngicos) e  $I_{0E-R}$  es la pendiente de un gráfico de  $I_0$  en función de la energía del láser para la referencia.

El rendimiento cuántico de producción de  $^1O_2$  por los AF se determinó en mezcla de metanol deuterado y agua deuterada (MeOD:D<sub>2</sub>O 60:40 %v) utilizando perinaftenona (PN) como referencia.

Se determinaron las intensidades iniciales de emisión de fosforescencia de  $^1O_2$  variando la energía del haz incidente. Este procedimiento se realizó tanto para los AF como para PN excitando las muestras a 266 nm y registrando la emisión de  $^1O_2$  a 1270 nm. Las soluciones se prepararon con igual absorbancia a la longitud de onda de excitación del láser y la energía del mismo se varió a través del uso de soluciones de dicromato de potasio de transmitancia variable que cumplieron la función de filtrar el haz de excitación.

Los valores de  $I_0$  se obtuvieron por extrapolación del decaimiento de la señal eléctrica a tiempo cero, haciendo uso del programa Microcal Origin. El valor utilizado de  $\Phi_\Delta$  para PN en agua deuterada<sup>21</sup> fue de 0,99.

#### **4.3.10. Ensayos de toxicidad.**

Estos ensayos fueron realizados en el laboratorio de la Dra. Paola Beassoni, en el Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencia Exactas Físicoquímicas y Naturales de la UNRC.

#### **Preparación de los medios de cultivo para ensayos de toxicidad:**

Se prepararon los siguientes medios de cultivo según las cantidades que se detallan a continuación:

- Medio de cultivo HL5 (1l) pH 6,4-6,7: 10 g de peptona de carne, 10 g de glucosa, 5 g de extracto de levadura, 0,35 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0,35 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Se ajustó la solución a pH 6,4-6,7 mediante agregado de HCl.
- Medio de cultivo Luria Bertani (LB) líquido (100 ml): 1 g de Tripteína, 0,5 g de extracto de levadura y 0,5 g NaCl.
- Medio de cultivo SM/5 (250 ml): 0,5 g de glucosa, 0,5 g de peptona de carne, 50 mg de extracto de levadura, 50 mg de MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0,47 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0,25 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.
- Medio de cultivo SM/5 2X (100 ml): 0,4 g de glucosa, 0,4 g de peptona de carne, 40 mg de extracto de levadura, 40 mg MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0,38 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 3 g de agar. Se ajustó el pH a 6,5 con HCl.

### **Preparación del cultivo de *D. discoideum*.**

Sobre placa de Petri conteniendo medio de cultivo sólido SM/5 se sembró un cultivo bacteriano de *Pseudomonas putida*, crecido durante 12 horas en medio LB . Este microorganismo se utiliza como suplemento alimenticio para *D. discoideum*. Posteriormente se colocaron 5-10 µl de solución de esporas de *D. discoideum* en el centro de la placa y se incubó durante 3-4 días a 22-24°C, hasta observar crecimiento vegetativo de la ameba mediante microscopía óptica.

Luego, mediante uso de palillo o ansa, se tomó una porción de esta zona en crecimiento y se resuspendió en un volumen de medio HL5. Es importante denotar que en este procedimiento se arrastra una pequeña cantidad de *P. putida*, que posteriormente será fundamental en el desarrollo de *D. discoideum* en los diferentes ensayos donde será utilizada.

La cantidad de amebas presentes en este cultivo se determinó a partir de la ecuación 8 (Eq.8):

$$N_T \text{ (amebas/ml)} = \langle N \rangle 50.000 \quad \text{Eq.8}$$

Donde  $N_T$  es el número de amebas presentes por ml de cultivo y  $\langle N \rangle$  es el promedio de amebas contadas en cámara de Neubauer en cuatro repeticiones, empleando microscopio óptico vertical Carl Zeiss Axiolab (ocular 10X; objetivo 10X).

### **Ensayos de toxicidad utilizando el microorganismo modelo *D. discoideum*.**

Para estas determinaciones se utilizó una policubeta de 24 pocillos. Los ensayos realizados incluyeron un blanco con agua, un blanco con el solvente de AF (mezcla de metanol:agua 60:40  $\%_v$  RB  $A_{555 \text{ nm}} = 0,5$ ) y muestras de AF  $5 \times 10^{-3}$  M sin fotolizar y fotolizadas durante 30, 60, 120, 180 y 240 min.

En cada pocillo se colocaron 496 µl de agua, 4 µl de muestra (blanco de solvente o muestras a ensayar de AF) y 500 µl de medio sólido SM/5 2X. En este punto, es importante destacar que en ensayos previos se demostró que metanol presenta toxicidad para *D. discoideum* a partir de concentraciones mayores a 0,25 %. En este caso, empleando 4 µl de muestra se asegura una condición experimental no tóxica de metanol para la ameba.

En el caso del blanco con agua, se colocaron 500 µl de agua y 500 µl de medio SM/5 2X.

Posteriormente, se sembraron 1500 amebas por pocillo. Para ello, se utilizó un volumen adecuado de cultivo que contuviera dicha cantidad de microorganismo.

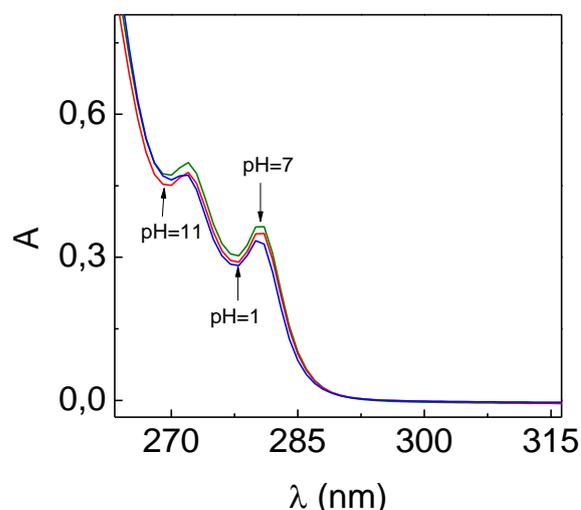
La policubeta fue conservada a 22-24°C durante 7-10 días para observación. El progreso de los estadios de crecimiento de *D. discoideum* fue determinado mediante observación macroscópica (mediante uso de una lupa binocular MEOPTA 23.2, ocular 16X; objetivo 1X) y microscópica (se empleó un microscopio óptico vertical Carl Zeiss Axiolab, ocular 10X; objetivo 10X). Todas las observaciones fueron documentadas en fotografías.

## 5. Resultados y Discusión.

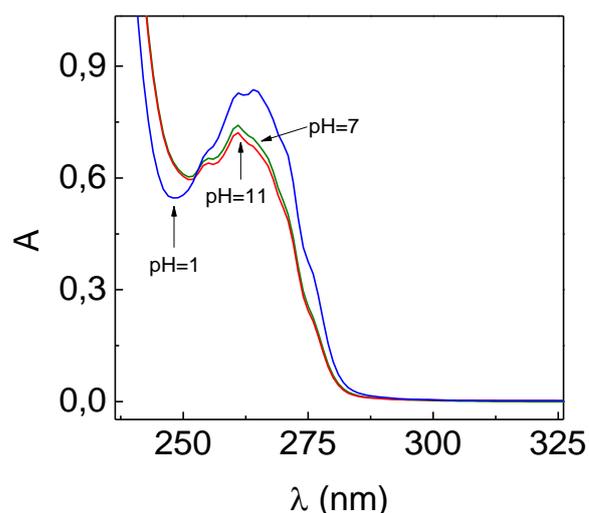
### 5.1. Caracterización de los antifúngicos estudiados.

Previamente a la realización de los estudios fotoquímicos y fotofísicos, se llevaron a cabo ensayos que consistieron en la caracterización de los espectros de absorción UV-Visible de los AF (TIO, CLO y SUL), el efecto de pH sobre los mismos y en pruebas de solubilidad.

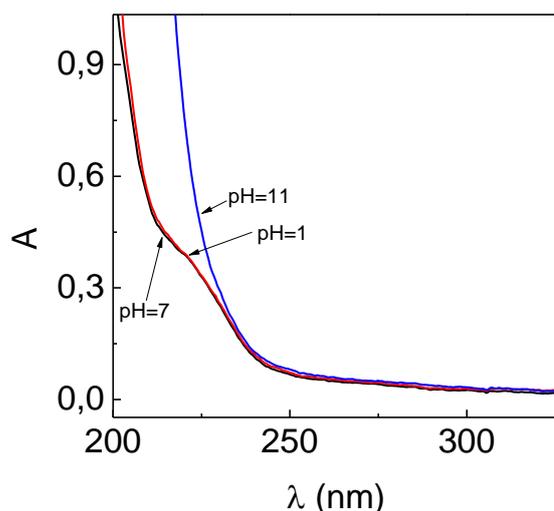
En las Figuras 13, 14 y 15 se presentan los espectros de absorción de los AF estudiados a pH neutro, ácido y alcalino.



**Figura 13:** Espectro de absorción UV-Visible de TIO en solución acuosa a diferentes pH.



**Figura 14:** Espectro de absorción UV-Visible de CLO en solución acuosa a diferentes pH.



**Figura 15:** Espectro de absorción UV-Visible de SUL en solución acuosa a diferentes pH.

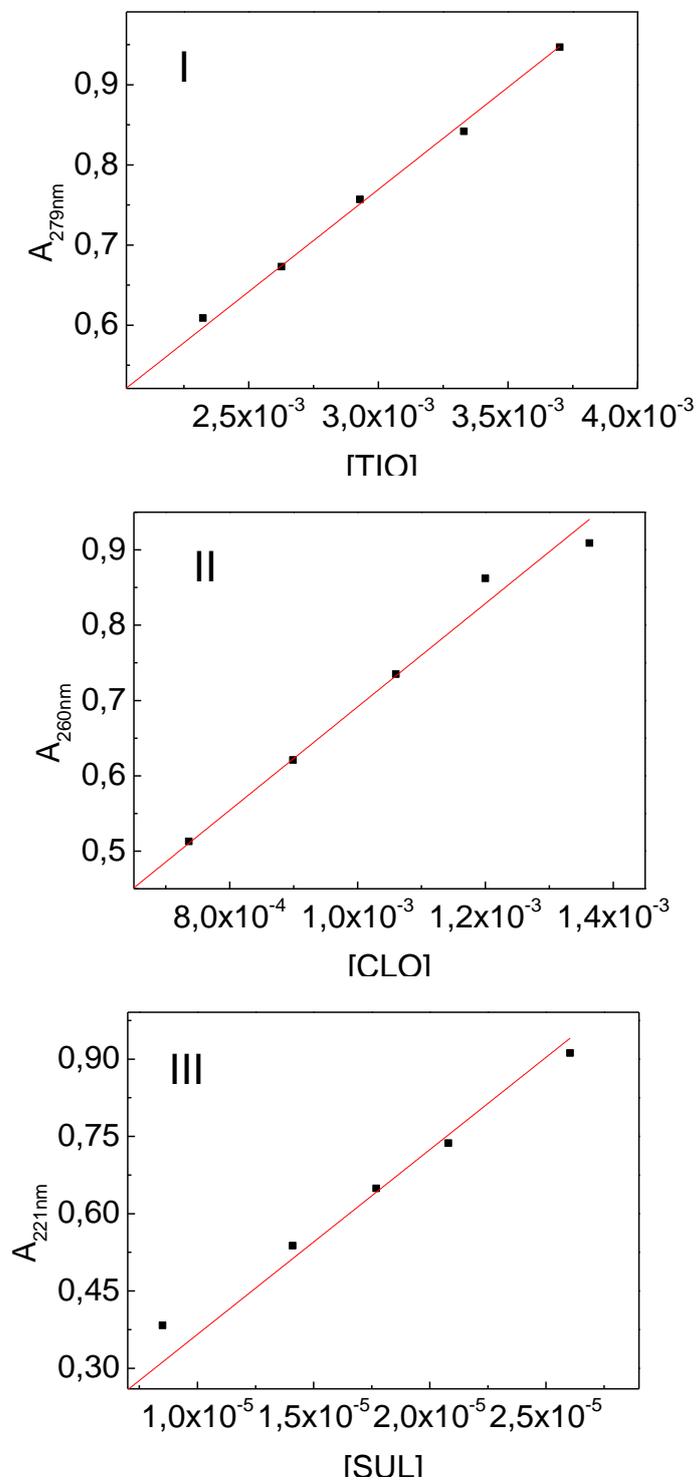
Tioconazol presenta máximos de absorción a 279 nm y a 271 nm y no absorbe por encima de 290 nm. Sulconazol presenta una banda de absorción a 221 nm y no absorbe por encima de 300 nm. Por último, clotrimazol presenta un máximo de absorción a 260 nm y no absorbe por encima de 285 nm.

Se observó que los espectros de absorción UV-Visible de los sustratos estudiados no sufren modificaciones importantes en el intervalo de pH 1-11. Por tal motivo, no se realizaron estudios de efecto de pH sobre la cinética de degradación sensibilizada de los AF.

Los ensayos de solubilidad indican que SUL y CLO son capaces de disolverse hasta una concentración de  $3 \times 10^{-3}$  M en mezclas metanol: agua 60:40  $\%_v$ . Para TIO se logró una concentración de  $5 \times 10^{-3}$  M en la misma mezcla de solventes.

## 5.2. Determinación de los coeficientes de absorptividad molar de los antifúngicos estudiados.

En la Figura 16 se muestran los gráficos correspondientes a la ley de Lambert-Beer para los tres AF estudiados.



**Figura 16:** Ley de Lambert-Beer para I: TIO; II: CLO; III: SUL. Solvente: metanol: agua 60:40  $\%_v$ .

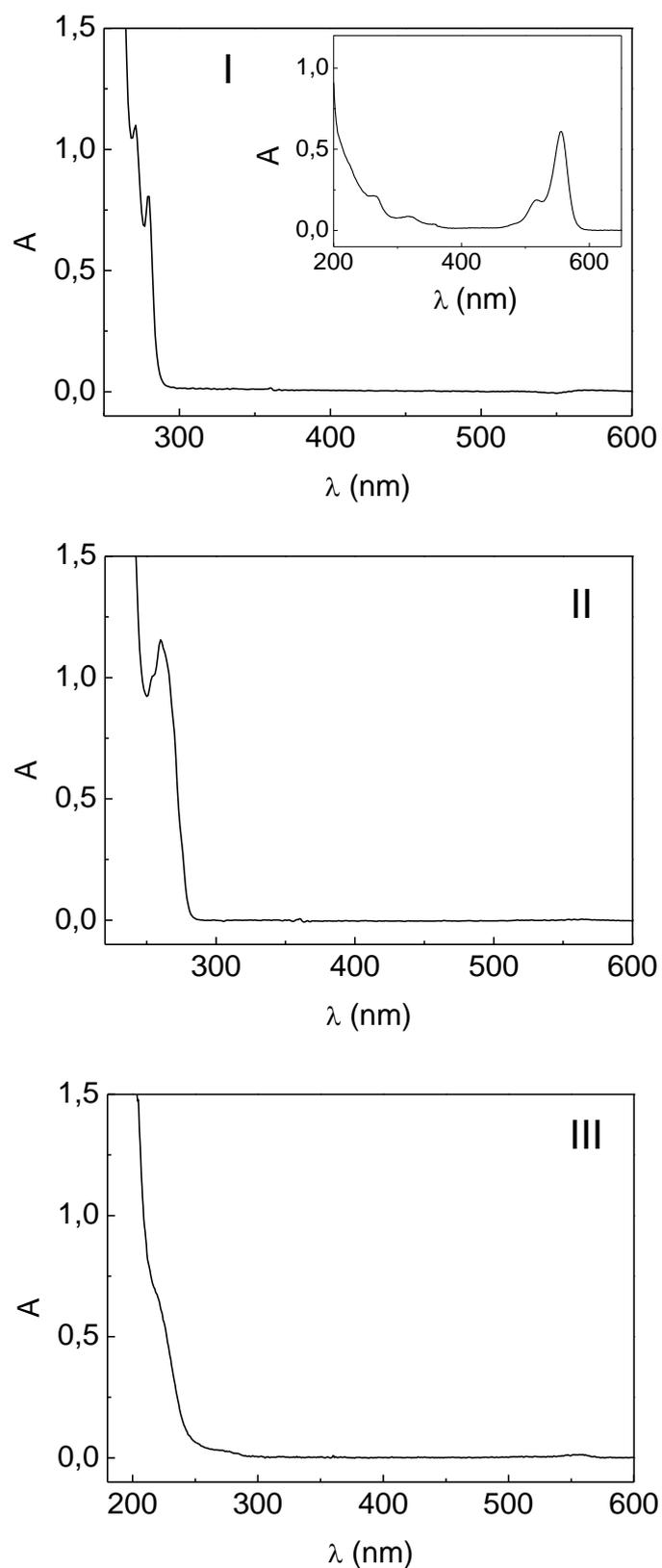
En la tabla 1 se presentan los coeficientes de absorptividad molar ( $\epsilon^\lambda$ ) obtenidos para cada uno de los AF en mezclas metanol: agua 60:40  $\%$ . Éstos fueron determinados haciendo uso de la ecuación 2 (Eq.2):

**Tabla 1:** Coeficientes de absorptividad molar de los antifúngicos TIO, CLO y SUL en mezclas metanol: agua 60:40 $\%$ .

Compuesto	TIO	CLO	SUL
$\epsilon$ ( $\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) ( $\lambda$ )	255 (279 nm)	686 (260 nm)	35.851 (221 nm)

### 5.3. Asociación oscura entre rosa de bengala y los antifúngicos.

Algunos sensibilizadores son capaces de interactuar en su estado fundamental con los sustratos fotooxidables (asociación oscura), lo que produce una disminución efectiva de la concentración de ambos. Por tal motivo, previo a la fotólisis de los sistemas AF/Sens(RB)/oxígeno(aire) se evaluó la existencia de una potencial asociación oscura entre los AF y el sensibilizador RB. Se tomaron los espectros de absorción UV-Visible de dichos sistemas vs. RB, como se muestra en la Figura 17. En el inserto de la Figura 17-I, se incluye el espectro de absorción UV-Visible de RB.

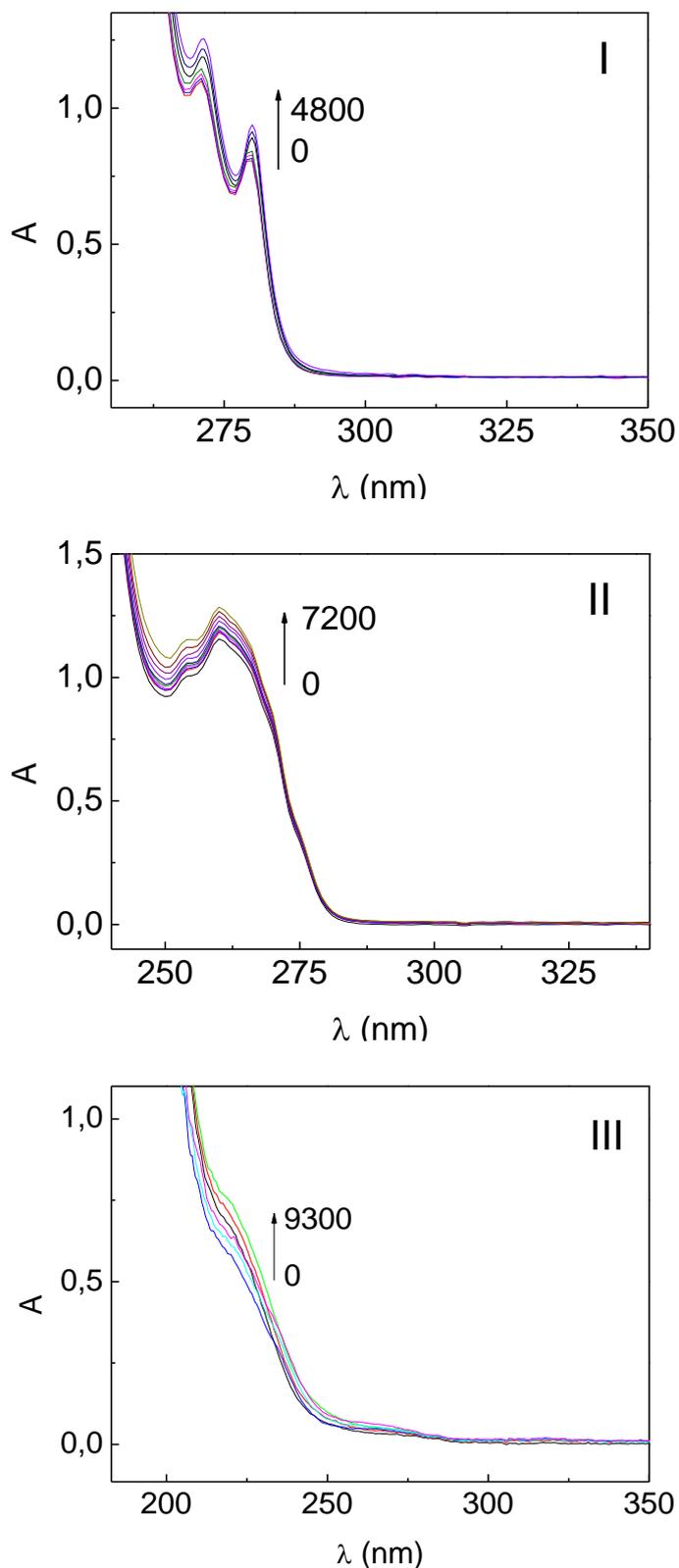


**Figura 17:** Espectros de absorción UV-Visible de los AF+RB vs. RB. **I:** TIO (ca.  $3 \times 10^{-3}$  M); **II:** CLO (ca.  $1,7 \times 10^{-3}$  M); **III:** SUL (ca.  $2 \times 10^{-3}$  M). **Inserto:** RB ( $A_{555 \text{ nm}} \approx 0,6$ ). Solvente: metanol:agua 60/40  $v/v$ .

Como se puede observar en la Figura 17, los espectros de absorción UV-Visible de las mezclas TIO, SUL y CLO (ca. 0,1 mM) + sensibilizador RB ( $A_{555\text{ nm}}=0,5$ ) vs. RB ( $A_{555\text{ nm}}=0,5$ ) no muestran modificaciones en la zona de máxima absorción visible del espectro del sensibilizador. En consecuencia, en base a este resultado, es posible descartar la existencia de una asociación oscura entre los AF y RB bajo las condiciones de trabajo

#### **5.4. Fotólisis estacionaria de los antifúngicos, sensibilizada por rosa de bengala.**

La fotólisis estacionaria de los sistemas AF/RB/oxígeno(aire) se siguió por espectroscopia de absorción UV-Visible. Se utilizó un filtro de corte de 361 nm de manera que la luz sólo fuera absorbida por el sensibilizador RB (ver espectros de absorción UV-Visible en la Figura 17). En la Figura 18 se muestra la evolución espectral de los sistemas vs. RB.



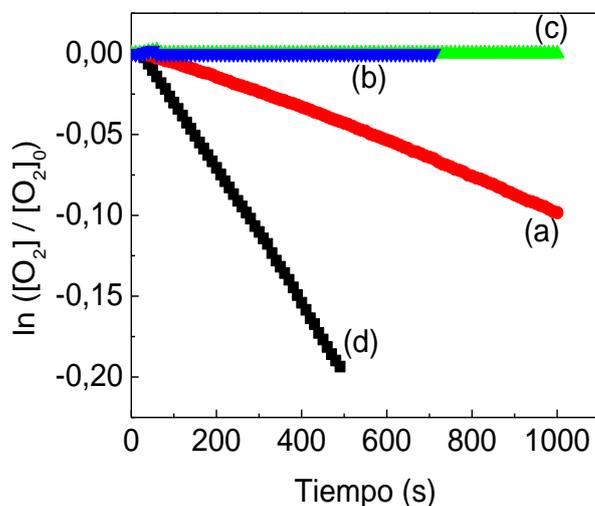
**Figura 18:** Evolución espectral de I: TIO (ca.  $3 \times 10^{-3}$  M) + RB ( $A_{555\text{nm}} = 0,5$ ) vs. RB ( $A_{555\text{nm}} = 0,5$ ); II: CLO (ca.  $1,7 \times 10^{-3}$  M) + RB ( $A_{555\text{nm}} = 0,5$ ) vs. RB ( $A_{555\text{nm}} = 0,5$ ); III: SUL (ca.  $1,5 \times 10^{-5}$  M) + RB ( $A_{555\text{nm}} = 0,5$ ) vs. RB ( $A_{555\text{nm}} = 0,5$ ). Los números en los espectros representan los tiempos de irradiación expresados en segundos. Solvente: metanol:agua 60/40  $\forall_v$ .

A partir de la Figura 18, se puede observar que la irradiación de los AF sensibilizada por RB, produce modificaciones en los espectros de absorción UV-Visible de los sustratos en función del tiempo de fotólisis. Este resultado indica que dado que RB es un generador exclusivo de  $^1\text{O}_2$ , existe interacción reactiva entre los AF y la especie  $^1\text{O}_2$  (proceso 12, Figura 6).

Asimismo, dado que no se observaron cambios en la zona visible de RB (datos no mostrados), es posible descartar la presencia de interacciones entre los AF y los estados electrónicos excitados de RB (singlete y/o triplete), bajo las condiciones de trabajo.

### 5.5. Determinación de las constantes de velocidad de desactivación reactiva de oxígeno singlete por los antifúngicos ( $k_r$ ).

Las constantes de velocidad de desactivación reactiva de  $^1\text{O}_2$  por los AF ( $k_r$ ) (proceso 12, Figura 6) fueron determinadas por el método de Foote y Ching, tal como se describió en la sección 4.3.4. Para el compuesto de referencia (furfuril alcohol) se utilizó un valor de  $k_{rR} = 1,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  el cual ha sido determinado en nuestro laboratorio. En la Figura 19 se muestran los gráficos de primer orden para el consumo de oxígeno por TIO, SUL, CLO y furfuril alcohol en presencia de RB como sensibilizador.



**Figura 19:** Gráficos de primer orden para la determinación de la constante de velocidad de desactivación reactiva de  $^1\text{O}_2$  por (a): TIO; (b): SUL; (c): CLO; (d): furfuril alcohol, en metanol:agua 60:40  $\%_v$ .  $[\text{AF}] = [\text{FFA}] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ .

Se observa que TIO es el único sustrato que presenta consumo de oxígeno detectable bajo las condiciones experimentales de trabajo. Para los otros compuestos estudiados no se registra una disminución apreciable del oxígeno disuelto en los tiempos de

fotólisis ensayados Sin embargo, de acuerdo con los resultados de la sección anterior, todos los antifúngicos muestran interacción reactiva con  $^1\text{O}_2$ . Esto podría deberse a que las  $k_r$  de SUL y CLO son demasiado pequeñas ( $< 10^{-6} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) y por lo tanto no es posible determinarlas a partir de medidas de consumo de oxígeno, debido al límite de detección del electrodo específico utilizado. En la tabla 2 se muestra el valor de  $k_r$  para TIO, determinado experimentalmente y una estimación de  $k_r$  para SUL y CLO. Se incluye también la relación  $k_r/k_t$  para los diferentes sustratos, la cual será discutida en la próxima sección.

**Tabla 2:** Constantes de velocidad de desactivación reactiva ( $k_r$ ) y total ( $k_t$ ) de  $^1\text{O}_2$  por los antifúngicos (TIO, CLO y SUL), y relación  $k_r/k_t$  en metanol:agua 60:40 %.

Sustrato	TIO	SUL	CLO
$k_r (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$3,0 \times 10^7$	$< 1 \times 10^6$	$< 1 \times 10^6$
$k_t (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$5,0 \times 10^7$	$6,1 \times 10^7$	$4,4 \times 10^7$
$k_r/k_t$	0,6	$< 0,02$	$< 0,02$

### 5.6. Determinación de las constantes de velocidad de desactivación total de oxígeno singlete por los antifúngicos ( $k_t$ ).

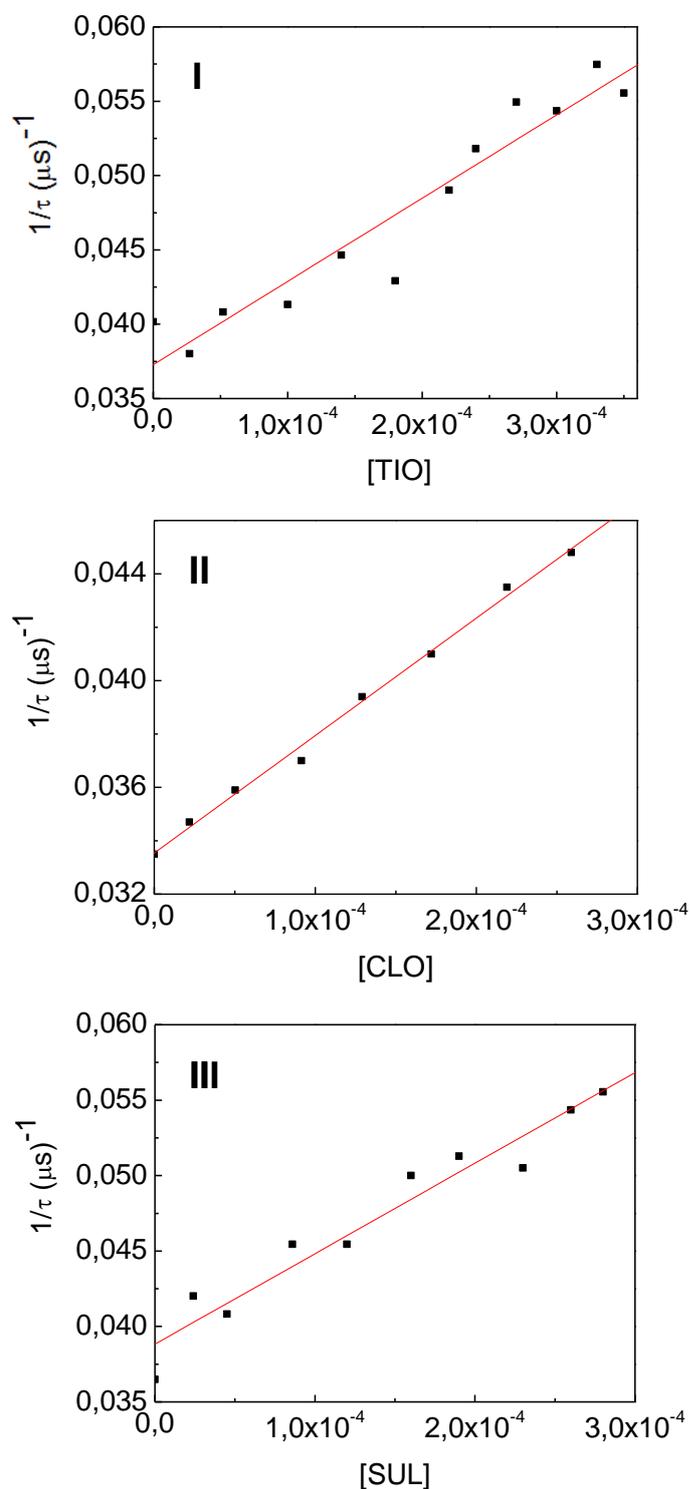
Los valores de  $k_t$  ( $k_r + k_q$ , procesos 11 y 12, Figura 6) fueron determinados por la técnica TRPD de acuerdo a lo descrito en la sección 4.3.5.

En la Figura 20, se muestran los gráficos de Stern-Volmer para TIO, SUL y CLO, a partir de los cuales fue posible obtener los valores de  $k_t$  para cada sustrato (tabla 2).

En otros trabajos se ha discutido el hecho de que la comparación directa de las constantes de velocidad  $k_r$  y  $k_t$  en las fotooxidaciones mediadas por  $^1\text{O}_2$ , no provee una información muy relevante acerca de la efectividad de la fotodegradación<sup>7,54</sup>. Por tal motivo, para evaluar la importancia real del proceso de fotooxidación se deben considerar los efectos simultáneos de desactivación física y reactiva, siendo la primera, interpretada en términos prácticos, como una forma de autoprotección contra las fotooxidaciones mediadas por  $^1\text{O}_2$ . En tal sentido, en la tabla 2, se incluye la relación  $k_r/k_t$  para los diferentes sustratos. Dicha relación es una aproximación simple y útil, que puede ser interpretada como la fracción total de colisiones sustrato- $^1\text{O}_2$  que efectivamente conducen a reacción química.

A partir de las relaciones  $k_r/k_t$  mostradas en la tabla 2 se puede decir que SUL y CLO se encuentran más protegidos frente a la reacción con  $^1\text{O}_2$  que TIO. Este resultado es sumamente interesante, ya que SUL y CLO desactivarían a  $^1\text{O}_2$  principalmente por la vía

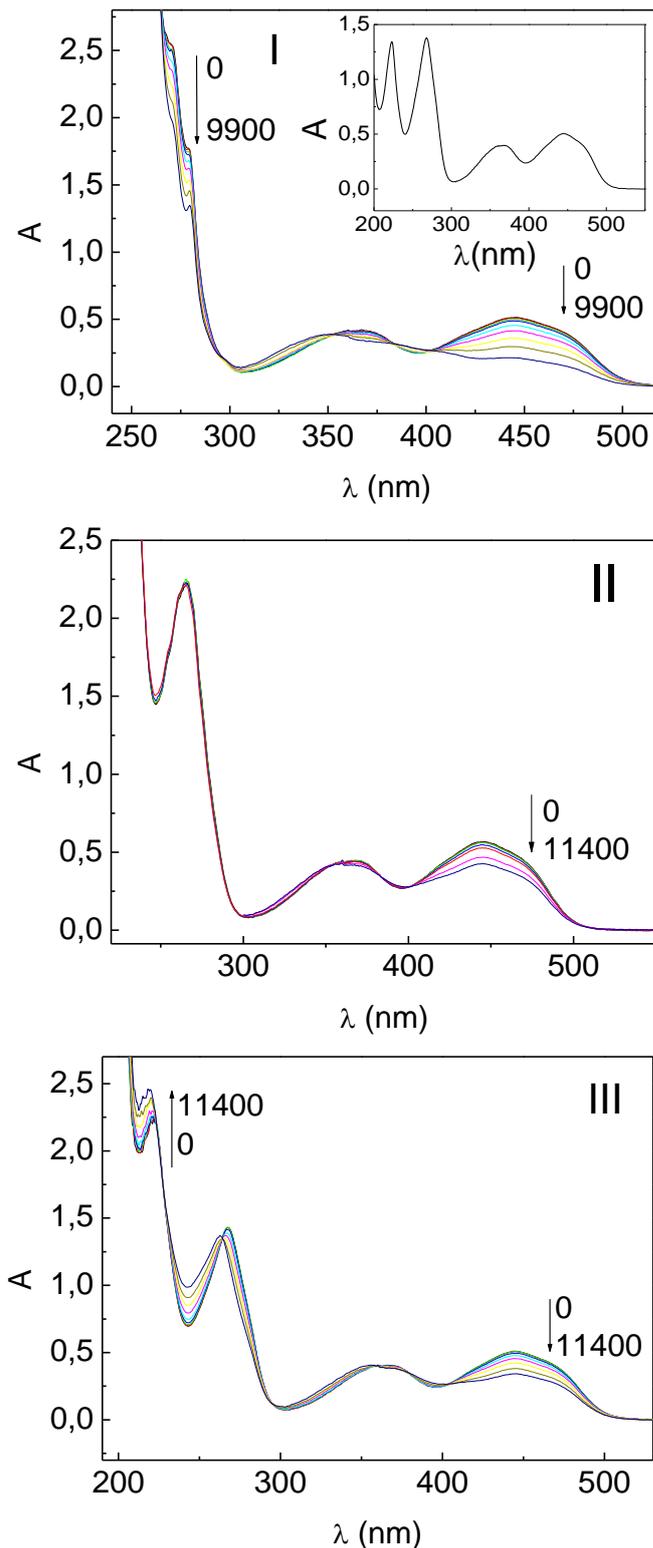
física y por tanto conservarían sus identidades químicas y sus propiedades terapéuticas específicas, en un medio biológico en condiciones de estrés oxidativo.



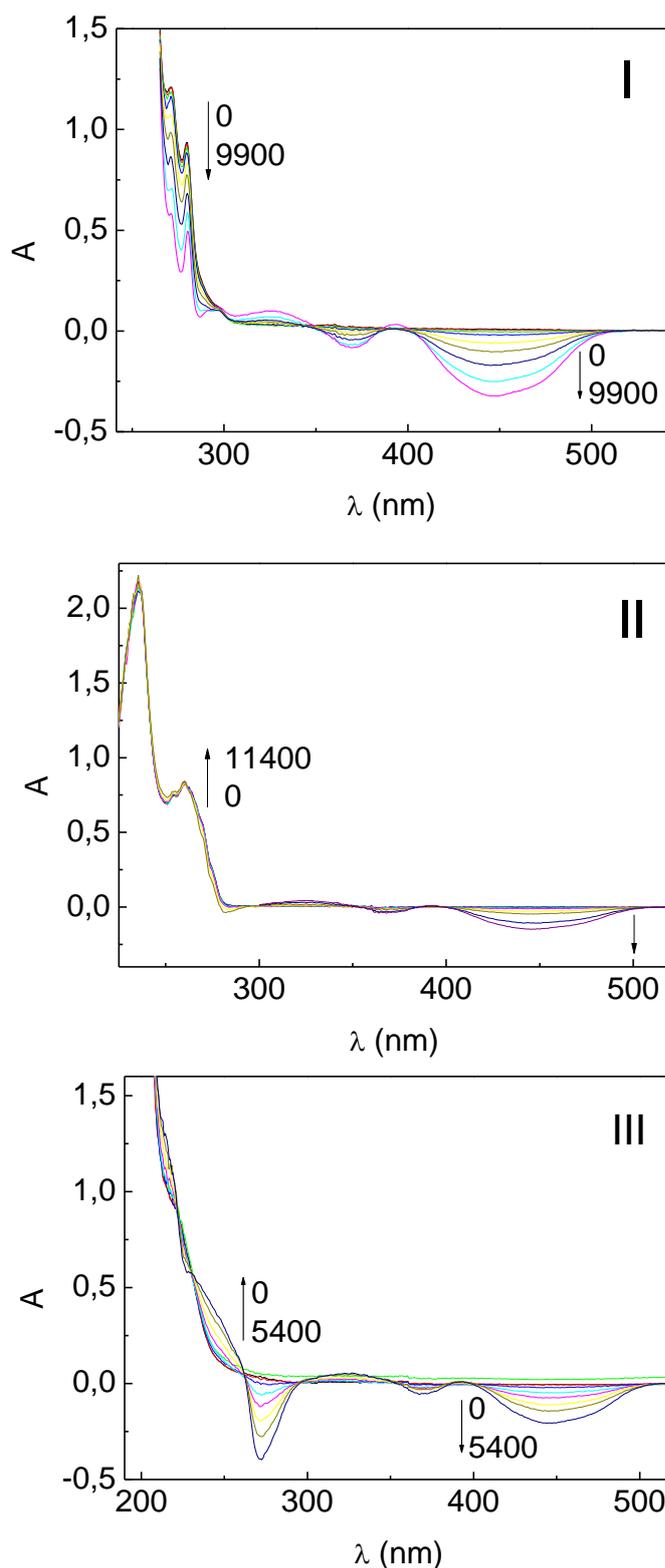
**Figura 20:** Gráficos de Stern-Volmer para la determinación de la constante de velocidad de desactivación total de  $^1\text{O}_2$  ( $k_t$ ) por I: TIO; II: CLO; III: SUL. Solvente: MeOD:D<sub>2</sub>O 60:40  $\text{v}/\text{v}$ .

### **5.7. Fotolisis estacionaria de los antifúngicos sensibilizada por riboflavina.**

El sensibilizador riboflavina amplía el abanico de posibilidades de fenómenos fotoquímicos factibles de suceder en presencia de oxígeno. Riboflavina es capaz de producir diferentes ROS, a través de un mecanismo tipo I y/o tipo II, dependiendo de las condiciones experimentales. La irradiación con luz de longitud de onda mayor a 361 nm de los sistemas AF/Sens(Rf)/oxígeno(aire) produce cambios en los espectros UV-Visible, tal como se muestra en las Figuras 21 y 22.



**Figura 21:** Evolución espectral de **I:** TIO (ca.  $3 \times 10^{-3}$  M) + Rf ( $A_{445\text{nm}} = 0,6$ ) vs. aire; **II:** CLO (ca.  $1,3 \times 10^{-3}$  M) + Rf ( $A_{445\text{nm}} = 0,6$ ) vs. aire; **III:** SUL (ca.  $2,6 \times 10^{-5}$  M) + Rf ( $A_{445\text{nm}} = 0,6$ ) vs. aire. Los números en los espectros representan los tiempos de irradiación expresados en segundos. **Inserto:** Rf ( $A_{445\text{nm}} \approx 0,5$ ). Solvente: metanol:agua 60:40  $\%_v$

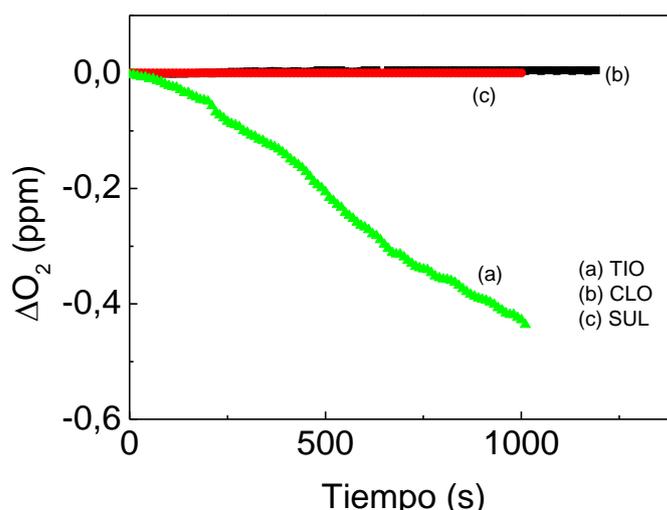


**Figura 22:** Evolución espectral de I: TIO (ca.  $3 \times 10^{-3}$  M) + Rf ( $A_{445\text{nm}} = 0,6$ ) vs. Rf ( $A_{445\text{nm}} = 0,6$ ); II: CLO (ca.  $1,3 \times 10^{-3}$  M) + Rf ( $A_{445\text{nm}} = 0,6$ ) vs. Rf ( $A_{445\text{nm}} = 0,6$ ); III: SUL (ca.  $2,6 \times 10^{-5}$  M) + Rf ( $A_{445\text{nm}} = 0,6$ ) vs. Rf ( $A_{445\text{nm}} = 0,6$ ). Los números en los espectros representan los tiempos de irradiación expresados en segundos. Solvente: metanol:agua 60:40 %<sub>v</sub>.

A partir de las Figuras 21 y 22 se puede observar que a tiempo cero de irradiación los espectros de las mezclas AF/Rf no presentan modificaciones en la zona de máxima absorción visible del sensibilizador Rf. Dicha evidencia experimental permite descartar la presencia de asociaciones oscuras AF-Rf.

Para los tres sustratos estudiados se observaron cambios espectrales tanto en la zona de absorción de los sustratos como en la zona de absorción visible del sensibilizador, luego de ser sometidos a irradiación en presencia de Rf. Por otra parte, cuando los sistemas TIO/Rf y SUL/Rf se mantuvieron en la oscuridad luego de ser irradiados durante 60 minutos, se observó que los espectros sufrieron modificaciones en la zona del sustrato y de Rf. Este resultado indica que la irradiación de estos sistemas “dispara” otros procesos fotoquímicos, los cuales se continúan en el tiempo, aún en ausencia de luz. El sistema CLO/Rf no mostró cambios en su espectro de absorción al ser mantenido en oscuridad luego de ser irradiado durante 60 minutos con luz visible de longitud de onda mayor a 361 nm.

Por otra parte, para TIO, paralelamente al consumo de sustrato sensibilizado por Rf, se observó consumo de oxígeno, tal como se muestra en la Figura 23. No obstante, para los compuestos SUL y CLO no se observa consumo de oxígeno en las condiciones de trabajo. Esto podría deberse a que la velocidad de consumo de oxígeno es demasiado baja como para detectar un cambio en la concentración de oxígeno dentro del límite de detección del electrodo utilizado. Sin embargo, los cambios espectrales observados en la Figura 22 para CLO y SUL son indicativos de la ocurrencia de una reacción química entre  $^1\text{O}_2$  y los sustratos.

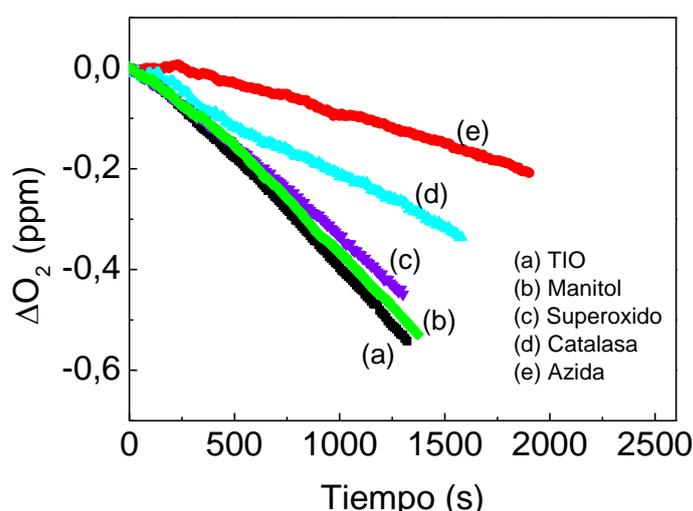
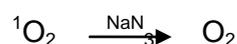


**Figura 23:** Consumo de oxígeno por **(a):** TIO (ca.  $1 \times 10^{-3}$  M), **(b):** CLO (ca.  $1 \times 10^{-3}$  M) y **(c):** SUL (ca.  $1 \times 10^{-3}$  M), bajo irradiación sensibilizada por Rf ( $A_{445\text{nm}} = 0,5$ ). Solvente: metanol:agua 60:40  $\text{v/v}$ .

Los resultados de las Figuras 21, 22 y 23 son indicativos de la existencia de interacciones entre los AF y los estados electrónicos excitados de Rf ( $^1Rf^*$ ,  $^3Rf^*$ ) y/o con ROS fotogeneradas a partir de dichos estados. Por tal motivo, se procedió a investigar la naturaleza de las ROS que participan en la degradación de los AF sensibilizada por Rf, como así también la potencial interacción  $AF-^1Rf^*$  y  $AF-^3Rf^*$ .

### 5.7.1. Determinación de la naturaleza de las especies reactivas de oxígeno en la degradación de los antifúngicos sensibilizada por riboflavina.

TIO es el único de los sustratos estudiados que presentó consumo de oxígeno detectable bajo irradiación sensibilizada por Rf. Por tal motivo se investigó la naturaleza de las ROS involucradas en dicho proceso. Se realizaron experimentos de consumo de oxígeno en ausencia y en presencia de inhibidores específicos de las distintas ROS: azida sódica ( $NaN_3$ ), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y D-manitol (Man). Los resultados fueron interpretados en función del conjunto de reacciones que se muestran a continuación:



**Figura 24:** Consumo de oxígeno por TIO (ca.  $1 \times 10^{-3}$  M) bajo irradiación sensibilizada por Rf ( $A_{445nm} = 0,5$ ) en ausencia **(a)** y presencia de inhibidores específicos de ROS: **(b)**: Man ( $1 \times 10^{-3}$  M), **(c)**: SOD (1mg/100ml), **(d)**: CAT (1mg/100ml) y **(e)**:  $NaN_3$  ( $1 \times 10^{-3}$  M).

Solvente: metanol:agua 60:40  $v/v$ .

A partir de la Figura 24 se determinaron las velocidades de consumo de oxígeno del sistema TIO/Rf en ausencia y en presencia de los inhibidores específicos. En la tabla 3 se muestran las velocidades relativas de consumo de oxígeno ( $v_r$ ) para cada caso. Las mismas se calcularon como el cociente entre la velocidad inicial de consumo de oxígeno en presencia de un inhibidor específico ( $v_{inh}$ ) y la velocidad de consumo de oxígeno en ausencia del inhibidor ( $v_0$ ).

**Tabla 3:** Velocidades relativas de consumo de oxígeno del sistema TIO/Rf/metanol:agua 60:40  $v/v$  en ausencia y presencia de inhibidores específicos ( $v_r = v_{inh}/v_0$ ).

Inhibidor	Man	SOD	CAT	NaN <sub>3</sub>
$v_r$	0,94	0,83	0,5	0,28

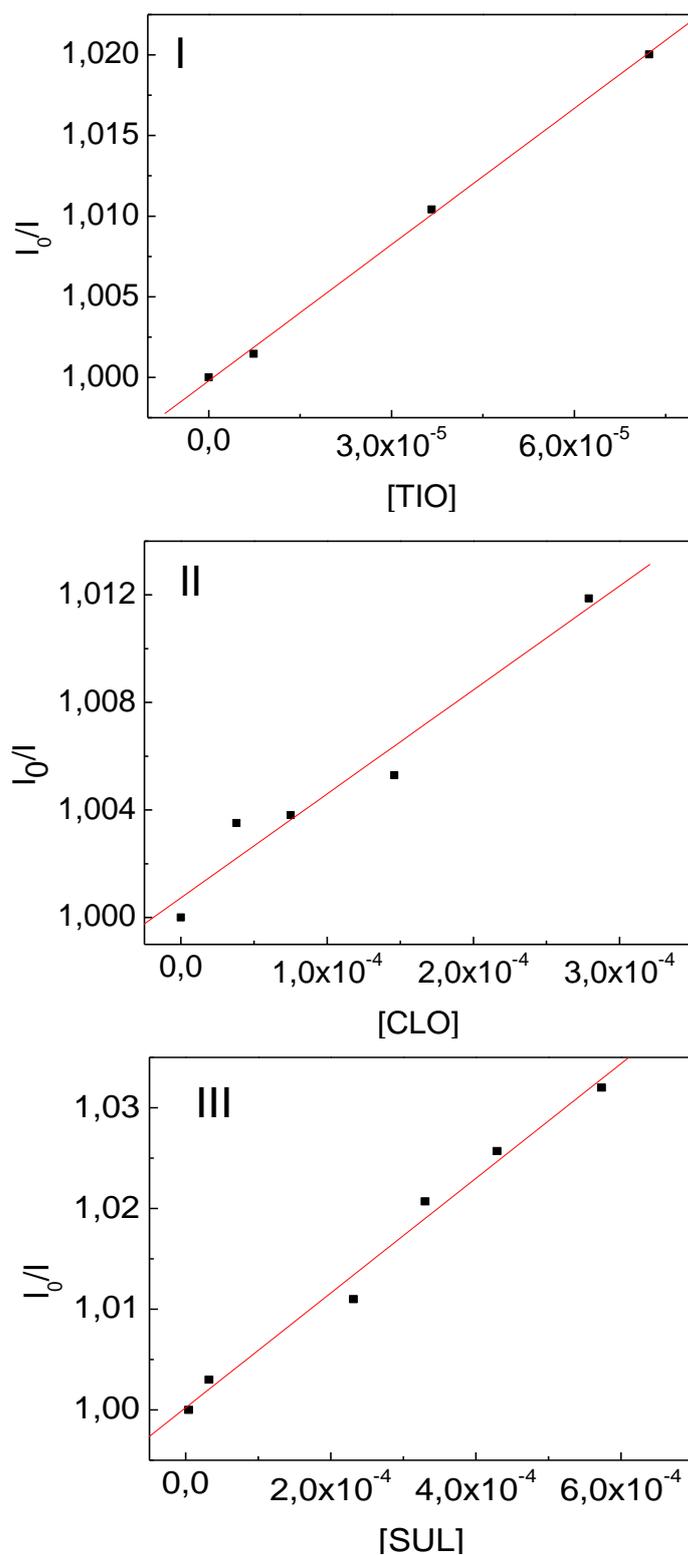
De acuerdo con lo mostrado en la Figura 24 y la tabla 3, la presencia de NaN<sub>3</sub> claramente disminuye la velocidad de consumo de oxígeno por TIO, indicando la participación de la especie <sup>1</sup>O<sub>2</sub> en la fotooxidación sensibilizada por Rf. La cuantificación de la interacción TIO/<sup>1</sup>O<sub>2</sub> fue evaluada a través de los valores de  $k_r$  y  $k_t$ , como fue descrito en las secciones 5.6 y 5.7.

Asimismo, la presencia de SOD y CAT disminuyen la velocidad de consumo de oxígeno por TIO, indicando la participación de las especies O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente en la fotooxidación sensibilizada por Rf. Por otra parte, TIO no exhibe interacción con la especie HO<sup>•</sup> (dentro de un 10% de error) ya que no se observa una disminución en la velocidad de consumo de oxígeno en presencia de D-manitol. Estos resultados confirman la ocurrencia de mecanismos del tipo I y tipo II entre TIO y Rf en presencia de oxígeno.

### **5.8. Desactivación del estado electrónico singlete excitado de riboflavina por los antifúngicos.**

Se evaluó la posibilidad de que los AF interaccionen con el estado electrónico singlete excitado del sensibilizador Rf (<sup>1</sup>Rf<sup>\*</sup>). Para ello se determinó la emisión de fluorescencia de Rf ( $\lambda_{em} = 524$  nm) en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de los AF, utilizando como  $\lambda$  de excitación 445 nm.

En la Figura 25 se muestran los gráficos de Stern-Volmer para la desactivación de  $^1Rf^*$  por los AF.

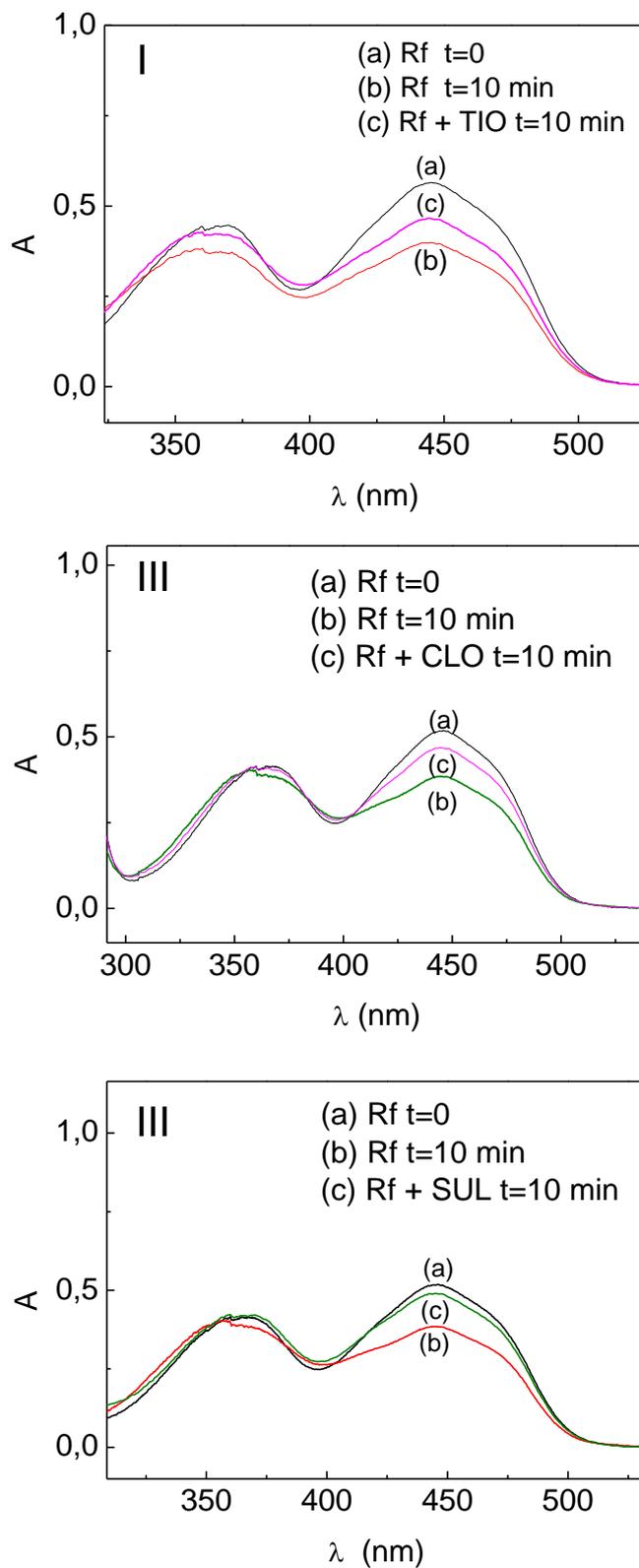


**Figura 25:** Tratamiento clásico de Stern-Volmer para la desactivación del estado electrónico singlete excitado de Rf ( $^1Rf^*$ ) por I: TIO, II: CLO y III: SUL. Solvente: metanol:agua 60:40  $\%_v$ .

En la Figura 25, se observa que a medida que aumenta la concentración de AF (desactivante), la intensidad de fluorescencia de Rf disminuye, lo cual estaría indicando que los AF interaccionan con la especie  $^1Rf^*$  (proceso 3, Figura 6). A partir de los gráficos de Stern-Volmer, los valores obtenidos para las constantes de interacción AF/ $^1Rf^*$  ( $^1k_q$ ) son del orden difusional en agua:  $5,87 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para TIO,  $8,05 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para CLO y  $1,18 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para SUL (Calculadas utilizando un valor<sup>67</sup> de  $^1\tau_0 = 4,8 \text{ ns}$ ). No obstante, este resultado no sorprende ya que habitualmente, para Rf, la determinación de dichas constantes por la técnica de fluorescencia estática produce una sobrestimación de las mismas. De todos modos, si bien no es posible obtener valores confiables de dichas  $^1k_q$  por esta técnica, los gráficos de Stern-Volmer confirman la existencia de interacción AF- $^1Rf^*$ .

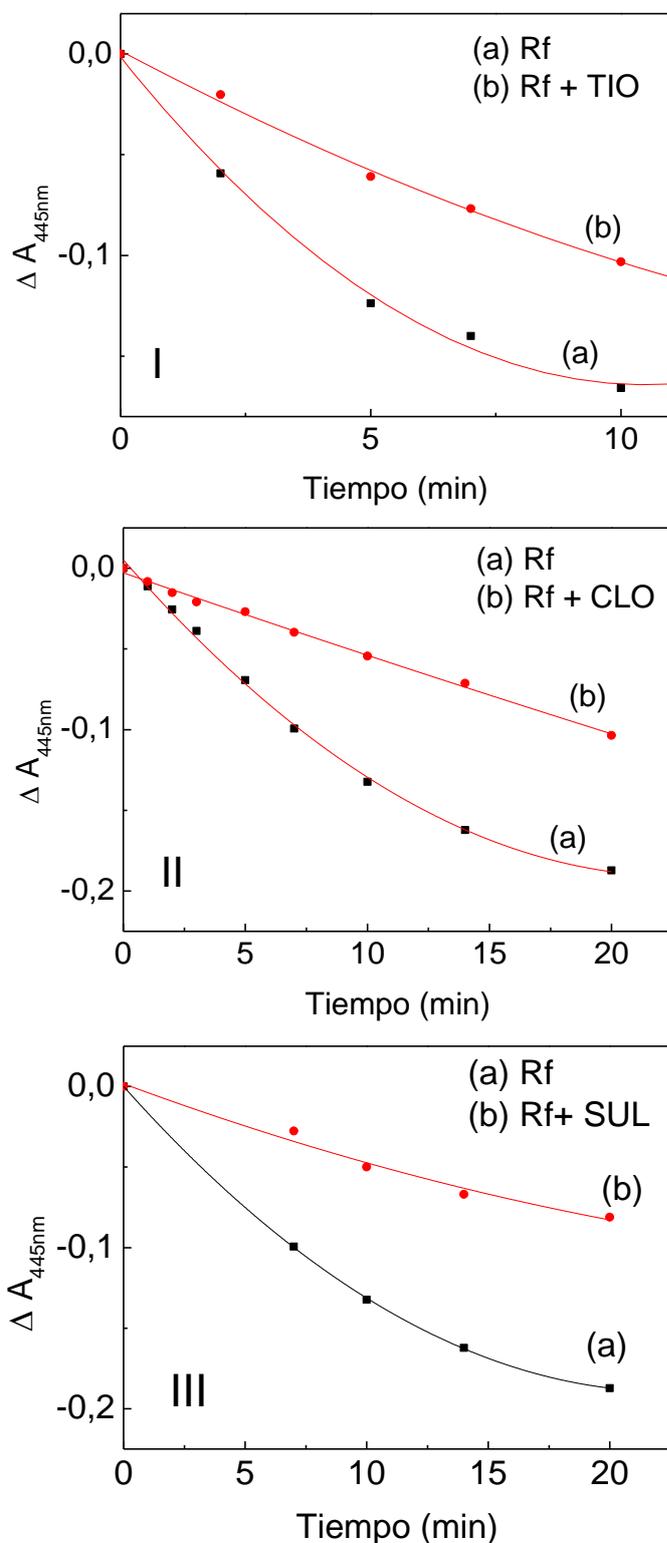
### **5.9. Desactivación del estado electrónico triplete excitado de riboflavina por los antifúngicos.**

La interacción del estado electrónico triplete excitado de Rf ( $^3Rf^*$ ) con los AF (proceso 9, Figura 6) se realizó cualitativamente mediante espectroscopia UV-Visible, en soluciones saturadas en argón. Se evaluó la disminución en la absorbancia de Rf a 445 nm en función del tiempo de irradiación en presencia y en ausencia de una dada concentración de AF, tal como se describió en la sección 4.3.8. En la Figura 26 se muestra la evolución espectral de soluciones de Rf saturadas en argón en ausencia y en presencia de los diferentes AF.



**Figura 28:** Cambios en los espectros de absorción UV-Visible de Rf en ausencia y en presencia de los AF, a t=0 y t=10 min de irradiación en solución saturada en Argón. **I:** TIO, **II:** CLO y **III:** SUL. [AF]  $\approx$  ca.  $3 \times 10^{-3}$  M. Solvente: metanol: agua 60:40  $v/v$ .

La Figura 29 muestra la velocidad de desaparición de Rf, determinada a partir de la disminución en su absorbancia a 445 nm, en función del tiempo de irradiación en ausencia y en presencia de una dada concentración de los AF.

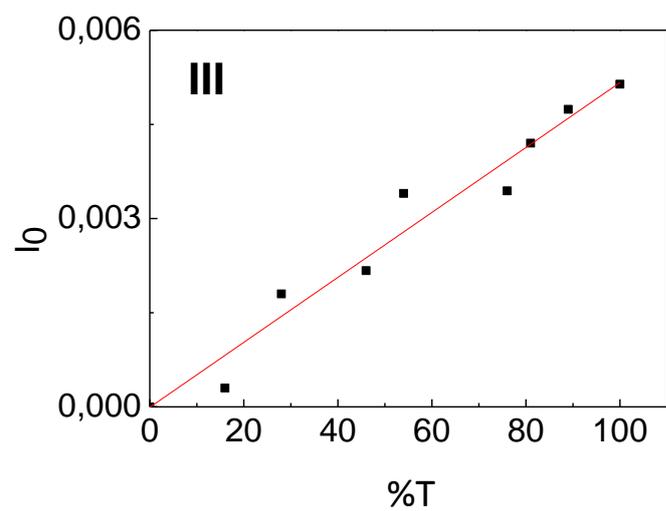
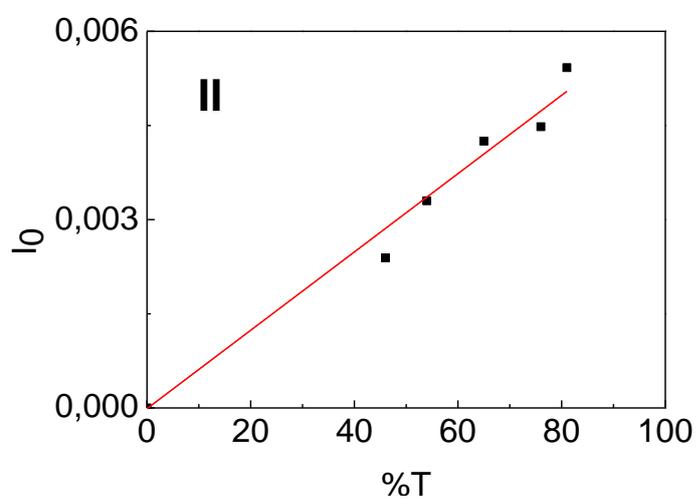
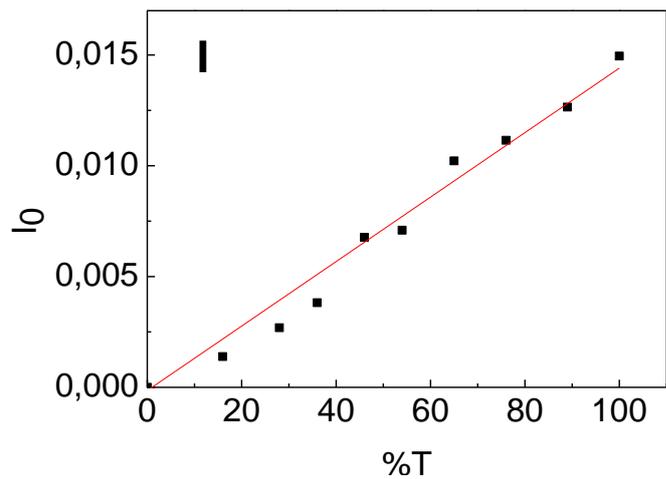


**Figura 29:** Cambio en la absorbancia de Rf a 445 nm, en ausencia y en presencia de los AF, en solución saturada en argón a diferentes tiempos de irradiación.  $[AF] \approx \text{ca. } 3 \times 10^{-3} \text{ M}$ . Solvente: metanol: agua 60:40  $\%_v$ .

En las Figuras 28 y 29 se puede observar una clara disminución de la absorbancia de Rf a 445 nm cuando la muestra es irradiada en condiciones anaeróbicas. Esta disminución puede atribuirse a la fotodegradación natural del sensibilizador, que en ausencia de oxígeno se sabe<sup>66</sup> que procede desde su estado electrónico triplete excitado ( $^3\text{Rf}^*$ ). Asimismo se puede observar que la velocidad de fotodegradación es menor en presencia de los AF que en ausencia de los mismos a igual tiempo de irradiación, este resultado constituye una evidencia cualitativa de la interacción entre los AF y  $^3\text{Rf}^*$  (proceso 9, Figura 6).

#### **5.10. Rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete por los antifúngicos.**

Los rendimientos cuánticos de generación de  $^1\text{O}_2$  se determinaron mediante el método actinométrico expuesto en la sección 4.3.9. En la Figura 30 se muestran las gráficas de  $I_0$  en función de la energía del láser representada como el porcentaje de transmitancia de las soluciones utilizadas para filtrar el haz de excitación. En la tabla 4 se muestran los  $\Phi_\Delta$  obtenidos según la ecuación 7 (Eq.7) para cada AF, utilizando perinaftenona como compuesto de referencia (actinómetro).



**Figura 30:** Intensidad de emisión de fosforescencia de  $^1\text{O}_2$  a tiempo cero ( $I_0$ ) en función del porcentaje de transmitancia del haz de excitación (%T). Solvente: MeOD:D<sub>2</sub>O 60:40  $\text{v/v}$ .  
 Sustratos: I: Perinaftenona (referencia); II: TIO; III: CLO.

**Tabla 4:** Rendimiento cuántico de generación de  $^1\text{O}_2$  por los antifúngicos (TIO, CLO y SUL) en MeOD:D<sub>2</sub>O 60:40 %<sub>v</sub>, bajo irradiación directa a 266 nm.

Sustrato	$\Phi_{\Delta}$
TIO	0,46
CLO	0,38
SUL	NG

NG: no se observó generación de  $^1\text{O}_2$ .

A partir de estos resultados, se puede decir que TIO y CLO tienen capacidad sensibilizadora pudiendo generar  $^1\text{O}_2$  en ambientes iluminados en presencia de oxígeno molecular. Este resultado no sería favorable desde el punto de vista clínico ya que implicaría que los propios fármacos oftálmicos, en el medio ocular, representarían una vía para la generación de  $^1\text{O}_2$  que, como se explicó previamente, está asociada a múltiples efectos citotóxicos. Si bien los AF son capaces de absorber luz por debajo de 300 nm, la luz de  $\lambda$  menor a 400 nm es filtrada por las estructuras oculares y por lo tanto, sería poco probable que se reunieran dichas condiciones dentro del medio ocular.

En el caso de SUL, no se observó generación de  $^1\text{O}_2$  en las condiciones de trabajo.

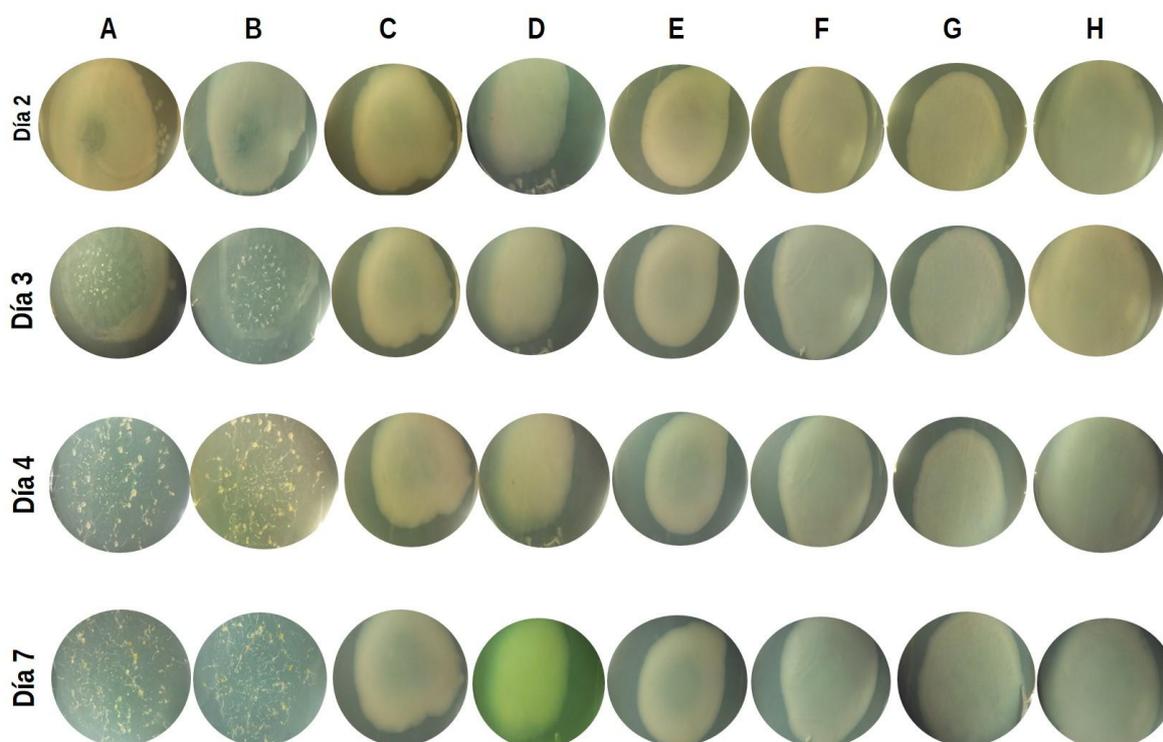
#### **5.11. Ensayos de toxicidad utilizando el microorganismo modelo *D. discoideum*.**

Dado que la interacción de los AF con ROS puede generar productos eventualmente tóxicos, se realizaron ensayos de toxicidad utilizando como modelo el microorganismo *D. discoideum*, como ya se comentó en la sección 2.13. Para la realización de estos ensayos, se seleccionó el antifúngico TIO por presentar mayor reactividad frente a  $^1\text{O}_2$  que CLO y SUL (ver tabla 2, sección 5.5).

El desarrollo del ciclo de vida característico de *D. discoideum* fue evaluado durante 7 días (Figura 31). Durante los primeros días se observa crecimiento bacteriano debido a la presencia de *P. putida* en el cultivo de la ameba. Esto resulta fundamental para poder evaluar el crecimiento de la ameba y poder asegurarse de que los efectos en su desarrollo o la ausencia de crecimiento se deban exclusivamente a efectos tóxicos de la muestra que se está ensayando.

En el caso de los ensayos blanco con agua y solvente, se observa que al segundo día del experimento aparecen los primeros signos de desarrollo que incluyen la formación de placas de lisis sobre el césped crecido de *P. putida*. Al tercer día, en ambos ensayos, se

observa la aparición de una zona central donde el alimento ya ha sido consumido por las amebas. En consecuencia, se observa la aparición de los primeros cuerpos fructíferos. A medida que los días transcurren, la zona de desabastecimiento de alimentos se extiende a toda la superficie del pocillo y los cuerpos fructíferos se desarrollan completamente. Al día 7 de experimento, se observan cuerpos fructíferos en toda la superficie del pocillo (Figuras 32 y 33). Este resultado permite corroborar a través del blanco con agua el normal desarrollo de *D. discoideum*, y por otro lado, que el solvente empleado (solución metanol:agua 60:40  $v/v$  + RB  $A_{555\text{ nm}} = 0,5$ ) no resulta tóxico para este microorganismo.

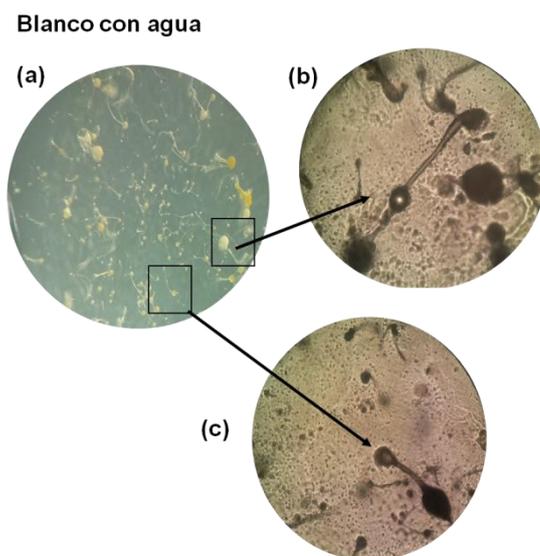


**Figura 31:** Fotografías del desarrollo de *D. discoideum*. **A:** Ensayo blanco con agua, **B:** ensayo blanco con solvente (metanol:agua 60:40  $v/v$  + RB  $A_{555\text{ nm}} = 0,5$ ), **C:** TIO  $5 \times 10^{-3}$  M sin fotolizar y TIO  $5 \times 10^{-3}$  M irradiado durante **D:** 30 minutos, **E:** 60 minutos, **F:** 120 minutos, **G:** 180 minutos, **H:** 240 minutos. Fotografías tomadas utilizando lupa (ocular 10X; objetivo 1X).

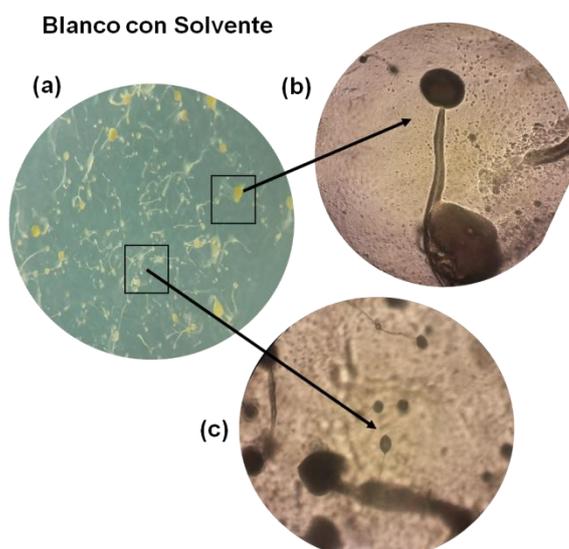
En cuanto a los ensayos con TIO sin irradiar se puede observar la ausencia de crecimiento de *D. discoideum* durante todos los días evaluados. Los ensayos fueron controlados durante un total de 15 días sin observar ninguna modificación en su comportamiento.

A partir de estas evidencias, se podría decir que TIO resulta tóxico para la ameba. Este resultado podría atribuirse a la naturaleza del mecanismo de acción terapéutico<sup>36,37</sup> de TIO, que en este caso, también afectaría a *D. discoideum*.

En el caso de las muestras de TIO irradiadas durante diferentes períodos de tiempo, se observa al igual que en el caso anterior, ausencia de crecimiento de la ameba. Esto permite deducir que probablemente los productos derivados de la reacción de TIO con  $^1\text{O}_2$  resultan igualmente tóxicos que TIO sin irradiar.



**Figura 32:** Cuerpos fructíferos observados para ensayo blanco con agua con: **a:** lupa (ocular 16 X; objetivo 1X); **b y c:** microscopio óptico (ocular 10X; objetivo 10X).



**Figura 33:** Cuerpos fructíferos observados para ensayo blanco con solvente (metanol:agua 60:40  $\%_v$  + RB  $A_{555\text{nm}} = 0,5$ ) con: **a:** lupa (ocular 16 X; objetivo 1X); **b y c:** microscopio óptico (ocular 10X; objetivo 10X).

## 6. Conclusiones.

- Todos los antifúngicos estudiados presentan interacción reactiva con la especie excitada  $^1\text{O}_2$ . La constante de velocidad de desactivación reactiva de  $^1\text{O}_2$  por SUL y CLO es menor a  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  mientras que por TIO es del orden de  $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . La comparación de éstos valores con las correspondientes constantes de desactivación total de  $^1\text{O}_2$  mediante el uso de la relación  $k_r/k_t$  muestran que SUL y CLO desactivan a  $^1\text{O}_2$  principalmente por la vía física a diferencia de TIO para quien ambas vías son relevantes. Este resultado es favorable desde el punto de vista clínico ya que implicarían que SUL y CLO conservarían su identidad química en presencia de la especie  $^1\text{O}_2$  y de este modo su eficacia terapéutica no se vería comprometida.
- TIO presenta además interacción reactiva con otras ROS tales como  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo cual, en escenarios de estrés oxidativo podría producir una alteración de la farmacocinética y la farmacodinámica de los AF.
- Todos los antifúngicos estudiados interaccionan con los estados electrónicamente excitados del sensibilizador Rf. Estas interacciones suponen vías alternativas para la degradación de los mismos, y dado que Rf es un sensibilizador que se encuentra naturalmente presente en el medio ocular podrían, en última instancia, contribuir a la disminución de la concentración local de los antifúngicos.
- TIO y CLO fueron capaces de generar  $^1\text{O}_2$  al ser irradiados directamente a 266 nm. Esta longitud de onda es filtrada por las estructuras oculares y en principio, no podrían darse las condiciones necesarias a nivel ocular para la generación de esta ROS por la acción fotodinámica de estos antifúngicos. Al menos no por absorción directa de la radiación ambiental. Por su parte, SUL no presentó capacidad generadora de  $^1\text{O}_2$  por irradiación directa a 266 nm.
- TIO y sus fotoproductos de degradación oxidativa mediados por  $^1\text{O}_2$  resultan tóxicos frente al microorganismo *D. discoideum*. Dada la similitud de este microorganismo con las propias células humanas, este resultado constituiría una especie de alerta para pacientes que se encuentran en estado de estrés oxidativo y están sometidos a tratamientos con TIO a las concentraciones analizadas en este estudio.

## 7. Bibliografía.

---

- <sup>1</sup> Hunter, J. J., Morgan, J. I., Merigan, W. H., Sliney, D. H., Sparrow, J. R., & Williams, D. R. (2012). The susceptibility of the retina to photochemical damage from visible light. *Progress in retinal and eye research*, 31(1), 28-42.
- <sup>2</sup> Sande Pérez, I. (2015). Fototoxicidad retiniana.
- <sup>3</sup> Mainster, M. A., Ham Jr, W. T., & Delori, F. C. (1983). Potential retinal hazards: instrument and environmental light sources. *Ophthalmology*, 90(8), 927-932.
- <sup>4</sup> Glickman, R. D. (2002). Phototoxicity to the retina: mechanisms of damage. *International Journal of Toxicology*, 21(6), 473-490.
- <sup>5</sup> Organisciak, D. T., & Vaughan, D. K. (2010). Retinal light damage: mechanisms and protection. *Progress in retinal and eye research*, 29(2), 113-134.
- <sup>6</sup> Roberts, J. E., Reme, C. E., Dillon, J., & Terman, M. (1992). Exposure to bright light and the concurrent use of photosensitizing drugs. *The New England journal of medicine*, 326(22), 1500.
- <sup>7</sup> Cacciari, D., Reynoso, E., Spesia, M. B., Criado, S., & Biasutti, M. A. (2017). Vancomycin-sensitized photooxidation in the presence of the natural pigment vitamin B2: Interaction with excited states and photogenerated ROS. *Redox Report*, 22(4), 166-175.
- <sup>8</sup> Turro, N. J. (1991). *Modern molecular photochemistry*. University science books.
- <sup>9</sup> Carey, F. A., & Sundberg, R. J. (2007). *Advanced organic chemistry: part A: structure and mechanisms*. Springer Science & Business Media.
- <sup>10</sup> Lakowicz, J. R. (1999). Introduction to fluorescence. In *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer, Boston, MA.
- <sup>11</sup> Baggott, J. E., & Gilbert, A. (1991). *Essentials of molecular photochemistry*. Oxford: Blackwell Scientific.
- <sup>12</sup> Braslavsky, S. E. (2007). Glossary of terms used in photochemistry, (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry*, 79(3), 293-465.
- <sup>13</sup> Irion, M. P. (1992). AM Braun, M.-Th. Maurette, E. Oliveros: Photochemical Technology, J. Wiley & Sons. New York 1991, ISBN 0-471-92652-3, 559 Seiten, (Erstveröffentlichung: Technologie Photochimique, Presses Polytechniques Romandes Lausanne 1986). *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, 96(3), 523-524.
- <sup>14</sup> Ebner, J., Riley, D., Foote, C. S., Valentine, J. S., Greenberg, A., & Liebman, J. F. (1995). Active Oxygen in Chemistry, SEARCH Series, Vol. 2. *Blackie Academic and Professional Publishers*, 205.
- <sup>15</sup> Foote, C. S., & Clennan, E. L. (1995). Properties and reactions of singlet dioxygen. In *Active oxygen in chemistry* (pp. 105-140). Springer, Dordrecht.

- 
- <sup>16</sup> Pedraza Chaverri, J., & Cárdenas Rodríguez, N. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes. Aspectos básicos. *Educacion química*, 17(2), 164-173.
- <sup>17</sup> Min, D. B., & Boff, J. M. (2002). Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 1(2), 58-72.
- <sup>18</sup> DeRosa, M. C., & Crutchley, R. J. (2002). Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 233, 351-371.
- <sup>19</sup> Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*, 552(2), 335-344.
- <sup>20</sup> Wilkinson, F., Helman, W. P., & Ross, A. B. (1993). Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *Journal of physical and chemical reference data*, 22(1), 113-262.
- <sup>21</sup> Fresnadillo, D. G. (2005). Fotosensibilización y el sensibilizador: síntesis, propiedades y limitaciones. *Capítulo*, 8, 253-269.
- <sup>22</sup> Redmond, R. W., & Gamlin, J. N. (1999). A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochemistry and photobiology*, 70(4), 391-475.
- <sup>23</sup> Merkel, P. B., & Kearns, D. R. (1972). Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. Experimental and theoretical study of electronic-to-vibrational energy transfer. *Journal of the American Chemical Society*, 94(21), 7244-7253.
- <sup>24</sup> Martínez, L. A., Martínez, C. G., Klopotek, B. B., Lang, J., Neuner, A., Braun, A. M., & Oliveros, E. (2000). Nonradiative and radiative deactivation of singlet molecular oxygen ( $O_2(^1\Delta_g)$ ) in micellar media and microemulsions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 58(2-3), 94-107.
- <sup>25</sup> Foote, C. S. (1991). Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochemistry and photobiology*, 54(5), 659-659.
- <sup>26</sup> García, N. A., Criado, S. N., & Massad, W. A. (2006). Riboflavin as a visible-light-sensitizer in the aerobic photodegradation of ophthalmic and sympathomimetic drugs. *Flavins: Photochemistry and Photobiology; Silva, E., Edwards, AM, Eds*, 61-82.
- <sup>27</sup> Choe, E., Huang, R., & Min, D. B. (2005). Chemical reactions and stability of riboflavin in foods. *Journal of food science*, 70(1), R28-R36.
- <sup>28</sup> Edwards, A. M., Bueno, C., Saldano, A., Silva, E., Kassab, K., Polo, L., & Jori, G. (1999). Photochemical and pharmacokinetic properties of selected flavins. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 48(1), 36-41.
- <sup>29</sup> Taverne, Y. J., Bogers, A. J., Duncker, D. J., & Merkus, D. (2013). Reactive oxygen species and the cardiovascular system. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.

- 
- <sup>30</sup> Frej, B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *The American journal of medicine*, 97(3), S5-S13.
- <sup>31</sup> Rodríguez Perón, J. M., Menéndez López, J. R., & Trujillo López, Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 30(1), 15-20.
- <sup>32</sup> Campolo Halty, N. (2013). Nitración y oxidación de tirosina por peroxinitrito mediada por metales de transición: mecanismos de reacción y relevancia biológica.
- <sup>33</sup> Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de medicina militar*, 31(2), 126-133.
- <sup>34</sup> Zorrilla García, A. E. (2002). El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 21(3), 178-185.
- <sup>35</sup> Halliwell, B. (1989). Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *British journal of experimental pathology*, 70(6), 737.
- <sup>36</sup> Fortún Abete, J. (1998). Antifúngicos: azoles, imidazoles, triazoles. *Medicine*, 7(91), 4231.
- <sup>37</sup> Gregorí Valdés, B. S. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(2), 1-1.
- <sup>38</sup> Sequeira, S., Cabrita, E. J., & Macedo, M. F. (2012). Antifungals on paper conservation: An overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 74, 67-86.
- <sup>39</sup> Gupta, A. K., & Krishna, V. (2009). Corneal topography and wavefront sensing. *Clinical ophthalmology: Contemporary perspectives*. 9th ed. Dehli: Elsevier, 3-20.
- <sup>40</sup> Kanski, J. J., & Bowling, B. (2011). *Clinical ophthalmology: a systematic approach*. Elsevier Health Sciences.
- <sup>41</sup> Baños i Díez, J. E., & March Pujol, M. A. (2002). Farmacología ocular.
- <sup>42</sup> Thomas, P. A. (2003). Current perspectives on ophthalmic mycoses. *Clinical microbiology reviews*, 16(4), 730-797.
- <sup>43</sup> Y. Gross et al (2008). *U.S. Patent Application No 11/883,774*.
- <sup>44</sup> Sawaya, A. (2007). *U.S. Patent Application No. 11/738,451*.
- <sup>45</sup> Dannat, K., Tillner, J., Winckler, T., Weiss, M., Eger, K., & Dingermann, T. (2003). Effects of medicinal compounds on the differentiation of the eukaryotic microorganism *Dictyostelium discoideum*: can this model be used as a screening test for reproductive toxicity in humans?. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58(3), 204-210.
- <sup>46</sup> Rodríguez-Ruiz, A., Marigómez, I., Boatti, L., & Viarengo, A. (2013). *Dictyostelium discoideum* developmental cycle (DDDC) assay: a tool for Hg toxicity assessment and soil health screening. *Science of the Total Environment*, 450, 39-50.

- 
- <sup>47</sup> Galardi-Castilla, M., & Sastre, L. (2011). *Dictyostelium discoideum*, una ameba peculiar. *Treballs de la Societat Catalana de Biologia*, 61-78.
- <sup>48</sup> Amaroli, A., Gallus, L., Passalacqua, M., Falugi, C., Viarengo, A., & Corrado, M. U. D. (2003). Detection of cholinesterase activities and acetylcholine receptors during the developmental cycle of *Dictyostelium discoideum*. *European journal of protistology*, 39(2), 213-222.
- <sup>49</sup> Eichinger, L., Pachebat, J. A., Glöckner, G., Rajandream, M. A., Suggang, R., Berriman, M., ... & Tunggal, B. (2005). The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 435(7038), 43.
- <sup>50</sup> OSPAR (2005), Clotrimazol.
- <sup>51</sup> Gennaro, A. R. (2003). *Remington farmacia* (Vol. 2). Ed. Médica Panamericana.
- <sup>52</sup> Neckers, D. C. (1989). Rose bengal. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 47(1), 1-29.
- <sup>53</sup> Thermo Electron Corporation (2003). *Orion Oxygen Electrode Instruction Manual*.
- <sup>54</sup> Nonell, S., Moncayo, L., Trull, F., Amat-Guerri, F., Lissi, E. A., Soltermann, A. T., ... & Garcia, N. A. (1995). Solvent influence on the kinetics of the photodynamic degradation of Trolox, a water-soluble model compound for vitamin E. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 29(2-3), 157-162.
- <sup>55</sup> Criado, S., Bertolotti, S. G., & García, N. A. (1996). Kinetic aspects of the rose bengal-sensitized photo-oxygenation of tryptophan alkyl esters. Ground state and photopromoted dye-tryptophan derivative interactions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 34(1), 79-86.
- <sup>56</sup> Miskosky, S., Bertolotti, S. G., García, N. A., & Argüello, G. A. (1993). On the O<sub>2</sub> (1 Δ g)-mediated photooxidative behaviour of tripeptide glycyl-tyrosyl-alanine in alkaline medium A kinetic study. *Amino acids*, 4(1-2), 101-110.
- <sup>57</sup> Madigan, M. T., Martinko, J. M., Barrachina, C., Berlanga, M., Gonzalo, M., Diaz, C., ... & Ruiz Berraquero, F. (2009). *Brock: Biología de los microorganismos*. Pearson Educación..
- <sup>58</sup> Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2008). *Principios de análisis instrumental* 6ta. ed. Cengage Learning, México, DF.

- 
- <sup>59</sup> Foote, C. S., & Ching, T. Y. (1975). Chemistry of singlet oxygen. XXI. Kinetics of bilirubin photooxygenation. *Journal of the American Chemical Society*, 97(21), 6209-6214.
- <sup>60</sup> Wilkinson, F., Helman, W. P., & Ross, A. B. (1995). Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 24(2), 663-677.
- <sup>61</sup> Wilkinson, F., Helman, W. P., & Ross, A. B. (1995). Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 24(2), 663-677.
- <sup>62</sup> Zang, L. Y., & Misra, H. P. (1992). 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. *Journal of Biological Chemistry*, 267(33), 23601-23608.
- <sup>63</sup> Tratnyek, P. G., & Hoigne, J. (1991). Oxidation of substituted phenols in the environment: a QSAR analysis of rate constants for reaction with singlet oxygen. *Environmental science & technology*, 25(9), 1596-1604.
- <sup>64</sup> Silva, E., Ugarte, R., Andrade, A., & Edwards, A. M. (1994). Riboflavin-sensitized photoprocesses of tryptophan. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 23(1), 43-48.
- <sup>65</sup> Iuliano, L., Pratico, D., Ghiselli, A., Bonavita, M. S., & Violi, F. (1992). Reaction of dipyridamole with the hydroxyl radical. *Lipids*, 27(5), 349-353.
- <sup>66</sup> Heelis, P. F. (1982). The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazines). *Chemical Society Reviews*, 11(1), 15-39.
- <sup>67</sup> Challier, C., Mártire, D. O., García, N. A., & Criado, S. (2017). Visible light-mediated photodegradation of imidazoline drugs in the presence of Riboflavin: Possible undesired effects on imidazoline-based eye drops. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 332, 399-405.