



**UNIVERSIDAD NACIONAL
DE RÍO CUARTO**

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Departamento de Química

Doctorado en Ciencias Químicas

Tesis doctoral

**“AGENTES FOTOSENSIBILIZADORES DERIVADOS DE
FTALOCIANINAS CON APLICACIONES EN LA INACTIVACIÓN
FOTODINÁMICA DE MICROORGANISMOS”**

Lic. Estefanía Baigorria

DIRECTORA: Dra. María Elisa Milanesio

CO-DIRECTOR: Dr. Edgardo N. Durantini

Río Cuarto, 20 de febrero 2019.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

*Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Química*

Lic. Estefanía Baigorria Firma..... Aclaración.....

Dra. M. Elisa Milanesio Firma..... Aclaración.....

Dr. Edgardo Néstor Durantini Firma..... Aclaración.....

COMISIÓN ASESORA Y JURADO

Dra. Marcela Beatriz Kurina Sanz Firma.....

Departamento de Química Orgánica.

Facultad de Químicas, Bioquímica y

Farmacia. Universidad Nacional de San Luis.

Aclaración.....

Dr. Marisa Rosana Santo

Firma.....

Departamento de Física. Facultad de Cs.

Exactas Físico-Químicas y Naturales.

Universidad Nacional de Río Cuarto.

Aclaración.....

...

Dr. Diego Fernando Acevedo

Firma.....

Departamento de Química. Facultad de Cs.

Exactas Físico-Químicas y Naturales.

Universidad Nacional de Río Cuarto.

Aclaración.....

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:.....Calificación:.....

La creatividad es la inteligencia divirtiéndose...

Albert Einstein

Agradecimientos

El principal agradecimiento es a mis padres que me dieron el privilegio de educarme, posibilitando mis estudios, además de estar presente y acompañarme en cada paso que doy.

A Telva, Nelly, Juan, Rafael, Betty, Horacio, Ale, Anita, Noe y Martín por impulsarme y acompañarme en cada paso.

A Berenice, Adrián, Francina, Emilia, Teresa y Daniel por la confianza en mí y por su acompañamiento constante como mi familia.

Sin embargo el paso por la universidad me llenó de gente que apoyó, acompañó e impulsó mi paso por esta carrera. A los integrantes del Infierno & Asociados agradezco por el aguante, la paciencia y el cariño. A mis familiares y amigos de Rufino por el apoyo constante. A mis amigas de la vida Dayana y Tatiana. A Katy y a los personajes del Súper Gran Becario e integrantes del PDI group.

A Lucas Fernández de Espacitores Diseño e Impresiones por entender y llevar a cabo mis caprichos para llegar al bello diseño de la Tesis.

Por último un agradecimiento muy importante a mis jefecitos Elisa y Edgardo por la confianza brindada, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y ayudarme desde el día cero de trabajo. A los miembros del jurado. A ANPCyT y CONICET por financiar mis estudios de posgrado y a la UNRC por brindarme una educación pública, gratuita y de gran calidad y a todos los docentes que la conforman y que formaron parte de mi formación como Licenciada, Profesora y en mis estudios de posgrado.

Y eternamente agradezco a la Luz que siempre me ilumina en cada paso.

Tefy



Resumen

El uso indiscriminado de fármacos frente a infecciones microbianas ha generado el advenimiento de la resistencia a múltiples medicamentos en los microorganismos. La inactivación fotodinámica (PDI) ha sido propuesta como una terapia alternativa para la erradicación de microbios. En este sentido, diferentes estudios han mostrado que derivados de ftalocianinas presentan utilización potencial como agentes fototerapéuticos. Así, en este trabajo de tesis, se sintetizaron diferentes derivados de ftalocianinas con el fin de utilizarlos en tratamientos de PDI.

Inicialmente, se obtuvieron tres ftalocianinas catiónicas ($\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$, $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ y $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$) con el objetivo de utilizarlas como fotosensibilizadores. Los estudios espectroscópicos mostraron las bandas de absorción y emisión de fluorescencia características de esta familia de compuestos. La molécula $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ generó especies reactivas de oxígeno (ROS) con alta eficiencia. Los experimentos de PDI se realizaron en *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los resultados indicaron que $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ fue muy efectiva para la erradicación de microorganismos.

Por otra parte, se sintetizaron conjugados de ftalocianinas con polímeros precursores catiónicos, tales como quitosano (Q-ZnPc) y polietiliminina (PA-ZnPc). Estos polímeros pueden adquirir cargas positivas en el medio biológico debido a la disponibilidad de grupos amino libres que presentan. Las características espectroscópicas de absorción, fluorescencia e IR indicaron la funcionalización de los conjugados ftalocianinas-polímeros. Además, presentaron considerables rendimientos cuánticos de generación de oxígeno singlete (Φ_Δ) tanto en DMF como en medio acuoso. Los estudios de PDI indicaron que PA-ZnPc presentó una mayor eficiencia en la erradicación de *C. albicans* y *S. aureus*, comparado con Q-ZnPc. Debido a la baja inactivación de *E. coli* por parte de estos conjugados, la PDI se potenció con el agregado de quitosano.

Por último, se llevó a cabo la síntesis de ftalocianinas con el objetivo de formar películas poliméricas con aplicación en PDI (EDOT-ZnPc y EDOT-CuPc). Mediante la voltametría cíclica de EDOT-Pcs se formaron electropolímeros con características espectroscópicas y fotoquímicas interesantes para su aplicación en PDI. EDOT-ZnPc/película presentó un mayor efecto en la erradicación de *S. aureus* en suspensiones celulares planctónicas y en biopelículas con el agregado de KI al medio. Estas películas fotoactivas pueden ser aplicadas en la inactivación de microorganismos evitando la acumulación del PS en el medio y permitiendo su reutilización en tratamientos posteriores.

Abstract

The inappropriate use of the drugs against microbial infections has generated the advent of multidrug resistance in microorganisms. The photodynamic inactivation (PDI) has been proposed as alternative therapy to eradicate microbial cells. Different studies have shown that phthalocyanine derivatives have the potential use as phototherapeutic agents. Thus, in this thesis work, different phthalocyanine derivatives were synthesized with the aim of using in PDI treatment.

First, three cationic phthalocyanines ($\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$, $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ y $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$) were obtained with the objective of being used as photosensitizers. The spectroscopic studies showed the absorptions bands and emission of the fluorescence bands characteristics of these compounds. The $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ molecule generated reactive oxygen species (ROS) with high efficiency. The PDI experiments were accomplished in *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The results indicated that $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ was more effective for the microbial eradications.

Moreover, phthalocyanines conjugated with cationic precursors polymers were synthesized, such as chitosan (Q-ZnPc) and polyethylenimine (PA-ZnPc). These polymers can take positive charges in biological medium due to the availability of the free amine groups. The absorptions, fluorescence and IR spectroscopic bands are characteristic of these compounds indicated to the functionalization of the phthalocyanine-polymer conjugates. In addition, they presented considerable quantum yields of the oxygen singlet generation (Φ_Δ) in both DMF and aqueous medium. The PDI studies indicated that PA-ZnPc presented a high efficiency in the *C. albicans* and *S. aureus* eradication, compared to Q-ZnPc. Due to the low inactivation of the *E. coli* by the conjugates, the PDI was potentiated with the addition of chitosan.

Finally, was carried out the synthesis of the phthalocyanines with the objective of form polymeric films with the PDI applications (EDOT-ZnPc y EDOT-CuPc). By cyclic voltammetries of the EDOT-Pcs were formed electropolymers with spectroscopies and photochemistry characteristics interesting for the PDI applications. EDOT-ZnPc/film presented a high effect in the *S. aureus* eradication in planktonic cellular suspensions and in biofilms with the KI added to the medium. These photoactive films can be applied in PDI avoiding the accumulation of photosensitizers in the medium and allowing reusing the films in later treatments.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	<i>xvi</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>xviii</i>
ÍNDICE DE ESQUEMAS	<i>xxiv</i>
Glosario de símbolos y abreviaturas	<i>xxvi</i>
Glosario de estructuras	<i>xxvi</i>
Capítulo 1 - INTRODUCCIÓN	<i>xxxi</i>
1 Introducción	<i>39</i>
1.1. Aspectos históricos de la fototerapia	<i>39</i>
1.1.1. Terapia fotodinámica de cáncer	<i>40</i>
1.1.2. Terapia fotodinámica de microorganismos	<i>42</i>
1.2. Mecanismos de acción fotodinámica	<i>45</i>
1.3. Microorganismos	<i>46</i>
1.3.1. Bacterias	<i>47</i>
1.3.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>48</i>
1.3.1.2. <i>Escherichia coli</i>	<i>49</i>
1.3.2. Hongos	<i>50</i>
1.3.2.1. Levaduras	<i>51</i>
1.3.2.1.1. <i>Candida albicans</i>	<i>52</i>
1.3.3. Biopelículas de microorganismos	<i>53</i>
1.4. Agentes antimicrobianos	<i>55</i>
1.4.1. Agentes antibióticos	<i>57</i>
1.4.2. Agentes antifúngicos	<i>59</i>
1.5. Agentes fototerapéuticos	<i>61</i>
1.6. Ftalocianinas	<i>63</i>
1.6.1. Características generales	<i>63</i>
1.6.2. Síntesis	<i>67</i>
1.6.2.1. Conjugados de Pcs con polímeros	<i>70</i>
1.6.2.1.1. Quitosano	<i>71</i>
1.6.2.1.2. Poliaminas	<i>72</i>
1.6.2.2. Películas poliméricas fotoactivas para la PDI de microorganismos	<i>73</i>
Capítulo 2- OBJETIVOS	<i>75</i>
2 Objetivos	<i>77</i>
2.1. Objetivo general	<i>77</i>
2.2. Objetivos específicos	<i>77</i>
Capítulo 3 - METODOLOGÍA	<i>79</i>

3	Metodología	81
3.1.	Equipamiento general	81
3.2.	Reactivos y solventes	82
3.3.	Síntesis de ftalocianinas	83
3.3.1.	Síntesis de ftalocianinas catiónicas	83
3.3.1.1.	Cloro [2,9(10),16(17)-trinitrosubftalocianinato] boro(III) (SubNPc) ...	83
3.3.1.2.	4-((4'-trifluorometilbezil)oxi)ftalonitrilo (CF ₃ -Pn).....	83
3.3.1.3.	Cinc (II) 2-[(trifluorometilbezil)oxi]-9(10),16(17),23(24)-tris(nitro)ftalocianina (CF ₃ N ₃ -ZnPc).....	83
3.3.1.4.	Cinc (II) 2-[(trifluorometilbezil)oxi]-9(10),16(17),23(24)-tris(amino)ftalocianina (CF ₃ (NH ₂) ₃ -ZnPc).....	83
3.3.1.5.	Cinc (II) 2-[(trifluorometilbezil)oxi]-9(10),16(17),23(24)-tris(N,N,N-trimetilamonio)ftalocianina (CF ₃ (NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺).....	84
3.3.1.6.	Cinc (II) 2,3-(1,3-buta-1,3-dienil)-9(10),16(17),23(24)-tris(nitro)ftalocianina (AN ₃ -ZnPc).....	84
3.3.1.7.	Cinc (II) 2,3-(1,3-buta-1,3-dienil)-9(10),16(17),23(24)-tris(amino)ftalocianina (A(NH ₂) ₃ -ZnPc)	84
3.3.1.8.	Cinc (II) 2,3-(1,3-buta-1,3-dienil)-9(10),16(17),23(24)-tris(N,N,N-trimetilamonio)ftalocianina (A(NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺)	85
3.3.1.9.	Cinc (II) 2,9(10),16(17),23(23)-tetrakis(nitro)ftalocianina (N ₄ -ZnPc) ..	85
3.3.1.10.	Cinc (II) 2,9(10),16(17),23(24)- tetrakis(amino)ftalocianina ((NH ₂) ₄ -ZnPc)	85
3.3.1.11.	Cinc (II) 2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis(N,N,N-tetrametilamonio)ftalocianina ((NM ₃) ₄ -ZnPc ⁴⁺).....	86
3.3.2.	Síntesis de conjugados de ftalocianinas con polímeros precursores catiónicos .	86
3.3.2.1.	2-[carbometoxifenoxi]ftalonitrilo (Bn-Pn)	86
3.3.2.2.	Cinc (II) 2-[carbometoxifenoxi]ftalocianina (Bn-ZnPc)	86
3.3.2.3.	Cinc 2-[carboxifenoxi]ftalocianina (A-ZnPc).....	87
3.3.2.4.	Conjugado Quitosano – Cinc Ftalocianina (Q -ZnPc)	87
3.3.2.5.	Conjugado Polietilenimina – Cinc Ftalocianina (PA -ZnPc).....	87
3.3.3.	Síntesis de ftalocianinas para la formación de películas poliméricas	87
3.3.3.1.	4-((2,3-dihidrotieno[3,4-b]dioxin-2-il)metoxi)ftalonitrilo (EDOT-Pn) .	87
3.3.3.2.	Cinc (II) 2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis(2,3-Dihidrotieno[3,4-b]dioxin-2-il) metoxi)ftalocianina (EDOT-ZnPc).....	88
3.3.3.3.	Cobre (II) 2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis(2,3-Dihidrotieno[3,4-b]dioxin-2-il)metoxi) ftalocianina (EDOT-CuPc)	88
3.4.	Preparación de soluciones stock.....	89
3.5.	Estudios espectroscópicos	89
3.5.1.	Generación de especies de yodo	89

3.6.	Fotólisis en estado estacionario	90
3.6.1.	Estudios de fotooxidación de derivados del antraceno	90
3.6.2.	Estudios de fotodescomposición de azul de nitrotetrazolio	91
3.6.3.	Estudios de fotooxidación de L-triptófano	91
3.7.	Estudios en medios biológicos	93
3.7.1.	Estudios en soluciones celulares planctónicas.....	93
3.7.1.1.	Cultivos de las cepas microbianas.....	93
3.7.1.2.	Estudios de la localización intracelular del fotosensibilizador	93
3.7.1.3.	Unión del fotosensibilizador a las células microbianas	94
3.7.1.4.	Inactivación fotodinámica de las cepas microbianas	95
3.7.2.	Inactivación fotodinámica de <i>C. albicans</i> creciendo en colonias sobre agar	96
3.7.3.	Inactivación fotodinámica de <i>S. aureus</i> empleando superficies electropolimerizadas	96
3.7.4.	Inactivación fotodinámica de biopelículas microbianas	97
3.7.4.1.	PDI de biopelículas de <i>C. albicans</i>	97
3.7.4.2.	PDI de biopelículas de <i>S. aureus</i>	98
3.8.	Formación de películas poliméricas.....	98
3.8.1.	Caracterización y generación electroquímica de las películas poliméricas..	98
3.8.2.	Espectroelectroquímica	99
<i>Capítulo 4 - Fotosensibilizadores catiónicos para la inactivación fotodinámica de microorganismo</i>		101
4.	<i>Resultados y discusiones</i>	103
4.1.	Síntesis de ftalocianinas catiónicas	103
4.2.	Estudios espectroscópicos	109
4.3.	Fotólisis en estado estacionario	114
4.3.1.	Estudios de fotooxidación de derivados del antraceno	114
4.3.2.	Estudios de fotodescomposición de azul de nitrotetrazolio	116
4.3.3.	Estudios de fotooxidación de L-triptófano	118
4.3.4.	Estudios de fotooxidación de L-Trp en presencia desactivantes de ROS... 122	
4.4.	Estudios en medios biológicos	124
4.4.1.	Estudios en suspensiones celulares planctónicas	124
4.4.1.1.	PDI de las cepas microbianas	124
4.4.1.2.	Estudios de la localización intracelular del fotosensibilizador	128
4.4.1.3.	Unión del fotosensibilizador a las células microbianas	129
4.4.2.	Inactivación fotodinámica de <i>C. albicans</i> creciendo en colonias sobre agar	132
4.4.3.	Inactivación fotodinámica de biopelículas microbianas	134
4.4.3.1.	PDI de biopelículas de <i>C. albicans</i>	134

<i>Capítulo 5 - Fotosensibilizadores conjugados de ftalocianinas con polímeros precursores catiónicos para la inactivación fotodinámica de microorganismos</i>	139
5. Resultados y discusiones	141
5.1. Síntesis de conjugados de ftalocianinas con polímeros precursores catiónicos .	141
5.2. Estudios espectroscópicos	145
5.3. Fotólisis en estado estacionario	152
5.3.1. Estudios de fotooxidación de derivados del antraceno	152
5.3.2. Estudios de fotodescomposición de azul de nitrotetrazolio	156
5.3.3. Estudios de fotooxidación de L-triptófano	157
5.3.4. Estudios de fotooxidación de L-Trp en presencia atrapadores químicos...	159
5.4. Estudios en medios biológicos	161
5.4.1. Estudios en suspensiones celulares planctónicas	161
5.4.1.1. Unión del fotosensibilizador a las células microbianas	161
5.4.1.2. Inactivación fotodinámica de las cepas microbianas	162
<i>Capítulo 6 - Ftalocianinas para la formación de películas poliméricas</i>	167
6. Resultados y discusiones	169
6.1. Síntesis de ftalocianinas para la formación de películas poliméricas	169
6.2. Estudios espectroscópicos	171
6.3. Fotólisis en estado estacionario	174
6.3.1. Estudios de fotooxidación de derivados del antraceno	174
6.4. Formación de películas poliméricas.....	177
6.4.1. Estudios espectroscópicos	182
6.4.2. Fotólisis en estado estacionario	182
6.4.2.1. Estudios de fotooxidación de derivados del antraceno	182
6.4.3. Generación de especies de yodo	184
6.4.4. Estudios en medios biológicos	186
6.4.4.1. Inactivación fotodinámica de <i>S. aureus</i> empleando películas electropolimerizadas	186
6.4.5. Inactivación fotodinámica de biopelículas microbianas	187
6.4.5.1. PDI de biopelículas de <i>S. aureus</i>	187
<i>Capítulo 7- CONCLUSIONES</i>	191
7. Conclusiones	193
<i>Capítulo 8 - ANEXO I: Fotosensibilizadores catiónicos aplicados en terapia fotodinámica de cáncer</i>	199
8. ANEXO I	201
<i>Fotosensibilizadores catiónicos aplicados en terapia fotodinámica de cáncer</i>	201
8.1. Introducción.....	201
8.2. Objetivos	202

8.2.1.	Objetivo general	202
8.2.2.	Objetivos específicos	202
8.3.	Metodología	203
8.3.1.	Equipamiento general	203
8.3.2.	Reactivos y solventes	204
8.3.3.	Fotosensibilizadores	204
8.3.4.	Estudios espectroscópicos	204
8.3.5.	Estudios en medios biológicos	204
8.3.5.1.	Estudios en líneas celulares	204
8.3.5.1.1.	Cultivo celulares	204
8.3.5.1.2.	Estudios de unión celular	205
8.3.5.1.3.	Estudios de fototoxicidad de ftalocianinas en células HeLa y HaCaT...	205
8.3.6.	Estudios en membranas mímicas	206
8.3.6.1.	Estudio de unión de los PS a vesículas multilaminares (MLV)	206
8.3.6.2.	Estudio del efecto fotodinámico en membranas mímicas	207
8.4.	Resultados y discusiones	208
8.4.1.	Fotosensibilizadores	208
8.4.2.	Estudios en medios biológicos	209
8.4.2.1.	Estudios en líneas celulares	209
8.4.2.1.1.	Estudios de unión celular	209
8.4.2.1.2.	Estudios de fototoxicidad de ftalocianinas en células HeLa y HaCaT...	210
8.4.3.	Estudios en membranas mímicas	212
8.4.3.1.	Estudio de unión de los PSs a MLV	212
8.4.3.2.	Estudio del efecto fotodinámico en membranas mímicas	213
8.5.	Conclusiones	214
BIBLIOGRAFÍA		215
<i>Bibliografía</i>		217

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características espectroscópicas de las ftalocianinas y rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) en DMF.	114
Tabla 2. Parámetros cinéticos (k_{obs}) para la descomposición de DMA sensibilizada por ftalocianinas y rendimientos cuánticos de $O_2(^1\Delta_g)$ (Φ_Δ) en DMF.	116
Tabla 3. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de L-Trp (k_{obs}) en DMF/agua 1% ($\lambda_{irr}= 530-800$ nm)	120
Tabla 4. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de L-Trp (k_{obs}) en DMF ($\lambda_{irr}= 680$ nm).....	121
Tabla 5. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de L-Trp (k_{obs}) en DMF/agua 5%.	124
Tabla 6. Características espectroscópicas de las ftalocianinas y rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) en DMF.	150
Tabla 7. Parámetros cinéticos (k_{obs}) para la descomposición de ADM y ABMM sensibilizada por ftalocianinas y rendimientos cuánticos de $O_2(^1\Delta_g)$ (Φ_Δ).....	155
Tabla 8. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de L-Trp (k_{obs}) en DMF ($\lambda_{irr}= 680$ nm).....	159
Tabla 9. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de L-Trp (k_{obs}) en DMF/agua 5%.	160
Tabla 10. Características espectroscópicas de las ftalocianinas y rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) en DMF.	174
Tabla 11. Parámetros cinéticos (k_{obs}) para la descomposición de DMA sensibilizada por ftalocianinas y rendimientos cuánticos de $O_2(^1\Delta_g)$ (Φ_Δ) en DMF.	177
Tabla 12. Parámetros cinéticos (k_{obs}) para la descomposición de DMA sensibilizada por ftalocianinas y rendimientos cuánticos de $O_2(^1\Delta_g)$ (Φ_Δ) en DMF.	184

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Niels Ryberg Finsen, Premio Nobel 1903.	39
Figura 2. Representación esquemática del campo de aplicación microbiológico de PDI. .45	
Figura 3. Célula bacteriana.	47
Figura 4. Estructura de las paredes celulares de bacterias Gram positiva y Gram negativa.	48
Figura 5. Colonias de <i>S. aureus</i> creciendo sobre placa de agar sangre (izquierda). Microscopía electrónica de barrido de cocos de <i>S. aureus</i> (derecha).	49
Figura 6. Colonias de <i>E. coli</i> creciendo sobre placa de agar sangre (izquierda). Microscopía electrónica de barrido de bacilos de <i>E. coli</i> (derecha).	50
Figura 7. Célula fúngica.	51
Figura 8. Estructura de la pared celular de levaduras.	52
Figura 9. Colonias de <i>C. albicans</i> creciendo sobre placa de agar Sabouraud (izquierda). Microscopía electrónica de barrido de <i>C. albicans</i> (derecha).	52
Figura 10. Formación de biopelículas a partir de células planctónicas.	54
Figura 11. Alexander Fleming y la estructura de la penicilina.	59
Figura 12. Espectro de absorción de ZnPc en THF.	65
Figura 13. Curva de calibración de (A) A(NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺ , (B) Q-ZnPc Y (C) PA-ZnPc en SDS al 2 % (λ_{exc} = 660 nm, $\lambda_{m\acute{a}x}$ = 672 nm).	95
Figura 14. Espectros de absorción de (A) CF ₃ NM ₃ -ZnPc (azul), AN ₃ -ZnPc (rojo) y N ₄ -ZnPc (negro) y (B) CF ₃ (NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺ (azul), A(NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺ (rojo) y (NM ₃) ₄ -ZnPc ⁴⁺ (negro) en DMF.	110
Figura 15. Espectros de absorción de CF ₃ (NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺ (A), A(NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺ (B) (NM ₃) ₄ -ZnPc ⁴⁺ (C) en DMF (rojo), DCM (azul) y metanol (negro).	111
Figura 16. Espectros de emisión de CF ₃ (NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺ (azul), A(NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺ (rojo), (NM ₃) ₄ -ZnPc ⁴⁺ (negro) y M ₄ -ZnPc (línea discontinua negra) en DMF (λ_{exc} = 610 nm)	112
Figura 17. Espectros de emisión de fluorescencia de CF ₃ (NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺ (A), A(NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺ (B) (NM ₃) ₄ -ZnPc ⁴⁺ (C) en DMF (rojo), DCM (azul) y metanol (negro).	113
Figura 18. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación (Δt = 60 s) para la fotooxidación de DMA sensibilizada por A(NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺ en DMF (λ_{irr} = 680 nm).	115
Figura 19. Gráfico de primer orden de la cinética de fotooxidación de DMA (35 μ M) sensibilizado por M ₄ -ZnPc (■), CF ₃ (NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺ (▲), A(NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺ (●) y (NM ₃) ₄ -ZnPc ⁴⁺ (▼) (λ_{irr} = 680 nm) en DMF.	116
Figura 20. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación para la fotooxidación de NBT + β -NADH sensibilizada por A(NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺ en DMF/H ₂ O 1% (λ_{irr} = 680 nm).	117
Figura 21. Detección de O ₂ ⁻ mediante la reacción con NBT a diferentes tiempos de irradiación (λ_{irr} = 680 nm). NBT + β -NADH + M ₄ -ZnPc (■), NBT + β -NADH + A(NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺ (●), NBT + β -NADH (▲), NBT + A(NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺ (▼) y β -NADH+ A(NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺ (◄).	118
Figura 22. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación para la fotooxidación de L-Trp sensibilizada por A(NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺ en DMF/agua 1% (λ_{irr} = 530-800 nm).	119

Figura 23. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de L-Trp (20 μM) sensibilizada por $\text{M}_4\text{-ZnPc}$ (●), $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ (■), $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$ (▲), $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ (▼) ($\lambda_{\text{irr}}=530\text{-}800\text{ nm}$) en DMF/agua 1%.....	120
Figura 24. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de L-Trp (20 μM) sensibilizada por $\text{M}_4\text{-ZnPc}$ (■) y $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ (●) ($\lambda_{\text{irr}}=680\text{ nm}$) en DMF.	121
Figura 25. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de L-Trp (20 μM) sensibilizada por $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ (▲), $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ + D-manitol (■) y $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ + azida de sodio (●) ($\lambda_{\text{irr}}=680\text{ nm}$) en DMF/agua 5%.....	124
Figura 26. PDI de <i>C. albicans</i> sensibilizada con 5 μM de sensibilizadores $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ (●), $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ (▲) y $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$ (▼) a distintos tiempos de irradiación (5, 15 y 30 min). Control irradiación (■).....	125
Figura 27. PDI de (A) <i>C. albicans</i> , (B) <i>S. aureus</i> y (C) <i>E. coli</i> sensibilizadas por $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ a diferentes concentraciones 1,0 μM (●), 2,5 μM (▲) y 5,0 μM (▼) a distintos tiempos de irradiación (2, 5 y 15 min para <i>S. aureus</i> y 5, 15 y 30 min para <i>C. albicans</i> y <i>E. coli</i>). Control irradiación (■).	127
Figura 28. PDI de <i>C. albicans</i> sensibilizada por $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ 2,5 μM , expuesta a diferentes etapas de lavados y a 5 min de irradiación con luz visible, luego de 30 min de incubación previa. 1) Control de células; 2) células en ausencia de $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ e irradiadas; 3) células tratadas con $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ y mantenidas en la oscuridad.....	128
Figura 29. Localización de $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ 5 μM en células de (A) <i>C. albicans</i> , (B) <i>S. aureus</i> y (C) <i>E. coli</i> : controles en campo claro (imagen superior) y fluorescencia de $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ (roja) (imagen inferior).....	129
Figura 30. Cantidad de $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ recuperada de células de (A) <i>C. albicans</i> ($\sim 10^6$ UFC/mL), (B) <i>S. aureus</i> y (C) <i>E. coli</i> ($\sim 10^8$ UFC/mL) tratadas con 1,0 μM (■), 2,5 μM (●) y 5,0 μM (▲) del sensibilizador a diferentes tiempos de incubación a 37°C.....	130
Figura 31. Cantidad de $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ recuperada de células de (A) <i>C. albicans</i> ($\sim 10^6$ UFC/mL), (B) <i>S. aureus</i> y (C) <i>E. coli</i> ($\sim 10^8$ UFC/mL) tratadas con 2,5 μM incubadas 15 min a 37 °C y expuesta a diferentes etapas de lavados (0 Lav, 1 Lav y 2 Lav).....	132
Figura 32. Crecimiento de colonias de <i>C. albicans</i> en AS tratadas con (A) 1 nmol, (B) 5 nmol y (C) 10 nmol de $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ e irradiadas con luz visible (30 mW/cm^2) por 3 h.	134
Figura 33. PDI de biopelículas de <i>C. albicans</i> sensibilizada por (A) ZnPc^{4+} y (B) $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ a distintas concentraciones y tiempos de irradiación (30 y 60 min). 5 μM de los PS (●), 10 μM (▲). Control irradiación (■).....	136
Figura 34. Espectros de absorción de Bn-ZnPc (azul), Q-ZnPc (rojo) y PA-ZnPc (negro) en DMF.	146
Figura 35. Espectros de absorción de (A) Bn-ZnPc, (B) Q-ZnPc y (C) PA-ZnPc en DMF (rojo), DCM (azul), metanol (negro), tolueno (verde).	147
Figura 36. Espectros de absorción de Q-ZnPc (negro) y PA-ZnPc (rojo) en agua.	148
Figura 37. Espectros de emisión de Bn-ZnPc (azul), Q-ZnPc (rojo), PA-ZnPc (verde) y $\text{M}_4\text{-ZnPc}$ (línea discontinua negra) en DMF ($\lambda_{\text{exc}}=610\text{ nm}$).....	148
Figura 38. Espectros de emisión de (A) Bn-ZnPc, (B) Q-ZnPc y (C) PA-ZnPc en DMF (rojo), DCM (azul), metanol (negro) y tolueno (verde).	150

Figura 39. Espectro FT-IR. Bn-ZnPc (A), polietilenimina (B), PA-ZnPc (C), quitosano (D) y CH-ZnPc (E).	151
Figura 40. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación ($\Delta t = 60$ s) para la fotooxidación de DMA sensibilizada por Bn-ZnPc en DMF ($\lambda_{irr} = 680$ nm).	153
Figura 41. Gráfico de primer orden de la cinética de fotooxidación de DMA (35 μ M) sensibilizado por M ₄ -ZnPc (■), Bn-ZnPc (●), Q-ZnPc (▲) y PA-ZnPc (▼) ($\lambda_{irr} = 680$ nm) en DMF.	153
Figura 42. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación ($\Delta t = 120$ s) para la fotooxidación de ABMM sensibilizada por Q-ZnPc en agua ($\lambda_{irr} = 530-800$ nm).	154
Figura 43. Gráfico de primer orden de la cinética de fotooxidación de ABMM (35 μ M) sensibilizado por ZnPyPc (■), Q-ZnPc (▲) y PA-ZnPc (▼) ($\lambda_{irr} = 530-800$ nm) en agua.	155
Figura 44. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación para la fotooxidación de NBT + β -NADH sensibilizada por PA-ZnPc en DMF/agua 1% ($\lambda_{irr} = 680$ nm).	156
Figura 45. Detección de O ₂ ⁻ mediante la reacción con NBT a diferentes tiempos de irradiación ($\lambda_{irr} = 680$ nm). NBT + β -NADH + M ₄ -ZnPc (■), NBT + β -NADH + Bn-ZnPc (●), NBT + β -NADH + Q-ZnPc (▲), NBT + β -NADH + PA-ZnPc (▼), NBT + β -NADH (◄), NBT + PS (▼) y β -NADH + PS (►).	157
Figura 46. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación para la fotooxidación de L-Trp sensibilizada por PA-ZnPc en DMF ($\lambda_{irr} = 680$ nm).	157
Figura 47. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de L-Trp (20 μ M) sensibilizada por M ₄ -ZnPc (■), Bn-ZnPc (●), Q-ZnPc (▲) y PA-ZnPc (▼) ($\lambda_{irr} = 680$ nm) en DMF.	158
Figura 48. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de L-Trp (20 μ M) sensibilizada por (A) Bn-ZnPc, (B) Q-ZnPc y (C) PA-ZnPc. PS (▲), PS + D-manitol (■) y PS + azida de sodio (●) ($\lambda_{irr} = 680$ nm) en DMF/agua 5%.	160
Figura 49. Cantidad de Q-ZnPc (●) y PA-ZnPc (■) recuperados de células de (A) ($\sim 10^6$ UFC/mL), (B) <i>S. aureus</i> y (C) <i>E. coli</i> ($\sim 10^8$ UFC/mL) tratadas con 5 μ M del sensibilizador para <i>C. albicans</i> y <i>S. aureus</i> y 10 μ M para <i>E. coli</i> , a diferentes tiempos de incubación a 37°C.	162
Figura 50. PDI de <i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> sensibilizados con 5 μ M de sensibilizadores Bn-ZnPc (azul), Q-ZnPc (gris) y PA-ZnPc (verde), irradiados 30 min. Control celular (negro).	163
Figura 51. PDI de <i>C. albicans</i> sensibilizada por (A) Q-ZnPc y (B) PA-ZnPc a diferentes concentraciones 1,0 μ M (●), 2,5 μ M (▲) y 5,0 μ M (▼) a distintos tiempos de irradiación (5, 15 y 30 min). Control irradiación (■).	164
Figura 52. PDI de <i>S. aureus</i> sensibilizada por (A) Q-ZnPc y (B) PA-ZnPc a diferentes concentraciones 1,0 μ M (●), 2,5 μ M (▲) y 5,0 μ M (▼) a distintos tiempos de irradiación (5, 15 y 30 min). Control irradiación (■).	164
Figura 53. Supervivencia celular de <i>E. coli</i> ($\sim 10^8$ CFU/mL) tratadas con diferentes concentraciones de Q (0,25 y 0,25 mg/mL). Oscuridad (columna gris) e irradiado (columna gris rayado).	165
Figura 54. Supervivencia celular de <i>E. coli</i> ($\sim 10^8$ CFU/mL) tratadas con: (A) Q-ZnPc, (B) PA-ZnPc. [PS]: 10 μ M y Q 0,125 mg/mL. Oscuridad (negro) e irradiado (gris).	166
Figura 55. Espectros de absorción de EDOT-ZnPc (azul), EDOT-CuPc (rojo) y M ₄ -ZnPc (negro) en DMF.	171

Figura 56. Espectros de absorción de (A) EDOT-ZnPc, (B) EDOT- CuPc, en DMF (rojo), DCM (azul), metanol (negro) y tolueno (verde).....	172
Figura 57. Espectros de emisión de EDOT-ZnPc (rojo), EDOT-CuPc (azul) y M ₄ -ZnPc (línea discontinua negra) en DMF ($\lambda_{exc}= 610$ nm).....	173
Figura 58. Espectros de emisión de (A) EDOT-ZnPc, (B) EDOT-ZnPc en DMF (rojo), DCM (negro), metanol (azul) y tolueno (verde) ($\lambda_{exc}= 610$ nm).....	174
Figura 59. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación para la fotooxidación de DMA sensibilizada por EDOT-ZnPc en DMF ($\lambda_{irr}= 680$ nm).....	175
Figura 60. Cinética de fotooxidación de DMA (35 μ M) sensibilizado por ftalocianinas. Gráfico de primer orden para las ftalocianinas EDOT-ZnPc (●), EDOT-CuPc (▲) y M ₄ -ZnPc (■) ($\lambda_{irr}= 680$ nm) en DMF.....	176
Figura 61. Voltagramas cíclicos para (A) monómero de EDOT-CuPc/película mostrando el incremento de la corriente de oxidación con el número de ciclos. Rango -0,4 a 1,4 V, velocidad de barrido 100 mV/s. (B) electropolimero de EDOT-CuPc/ película medidas a 25, 50, 75, 100, 150 y 200 mV/s. Grafico inserto en la figura (B) Corriente del pico de oxidación <i>versus</i> velocidad de barrido. Utilizando un electrodo de Pt en solución de DCM con electrolito soporte hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (0,1 M).....	178
Figura 62. Voltagramas cíclicos para (A) monómero de EDOT-CuPc/ película mostrando el incremento de la corriente de oxidación con el número de ciclos. Rango -0,4 a 1,1 V. (B) película electropolimerizada de EDOT-CuPc/ película medidas a 25, 50, 75, 100, 150 y 200 mV/s. Grafico inserto en la figura (B) Corriente del pico de oxidación <i>versus</i> velocidad de barrido. Utilizando un electrodo de Pt en solución de DCM con electrolito soporte.....	178
Figura 63. (A) Espectros de absorción de EDOT-ZnPc/ película e imagen fotográfica de la película a diferentes potenciales aplicados. (B) traza de absorción a diferentes longitudes de onda en función del potencial aplicado.....	180
Figura 64. Fotografía se las películas de (A) EDOT-ZnPc/ película (1) y EDOT-CuPc/ película (2) e imagen a microscopio de las películas de (B) EDOT-CuPc/ película y (C) EDOT-ZnPc/ película (objetivo del microscopio 5x).....	181
Figura 65. Imagen SEM de la película de EDOT-ZnPc/película obtenida a partir de un ciclado en el rango: -0,4 a 1,1 V.....	181
Figura 66. Espectros de absorción de las películas poliméricas de EDOT-ZnPc (rojo) y EDOT-CuPc (azul).....	182
Figura 67. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación para la fotooxidación de DMA sensibilizada por EDOT-ZnPc/película en DMF ($\lambda_{irr}= 530-800$ nm).....	183
Figura 68. Cinética de fotooxidación de DMA (35 μ M) sensibilizado por ftalocianinas electropolimerizadas. Gráfico de primer orden para las ftalocianinas (A) EDOT-ZnPc (●), EDOT-CuPc (▲) y (B) M ₄ -ZnPc (■) (gráfico inserto). ($\lambda_{irr}= 530-800$ nm) en DMF.....	184
Figura 69. Espectros de absorción de: (A) EDOT-ZnPc/película y (B) EDOT-CuPc/película en PBS con KI 0,1 M a diferentes tiempos de irradiación, 0 min (negro), 30 min (rojo) y 60 min (azul).....	185
Figura 70. PDI de <i>S. aureus</i> empleando películas electropolimerizadas: (A) EDOT-ZnPc y (B) EDOT-CuPc, potenciadas con KI 0,1 M e irradiadas 30 min (gris), 60 min (cian). Control oscuridad (negro).....	187

Figura 71. PDI de biopelículas de *S. aureus*: (A) EDOT-CuPc(●), EDOT-ZnPc (▲) ITO (■). (B) EDOT-CuPc + KI (0,1 M) (●), EDOT-ZnPc + KI (0,1 M)(▲), ITO + KI (0,1 M) (■).....189

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Principio de la terapia fotodinámica para el tratamiento de cáncer (PDT).	41
Esquema 2. Mecanismos de muerte celular.	42
Esquema 3. Principio de la inactivación fotodinámica de microorganismos (PDI).	44
Esquema 4. Procesos fotoquímicos involucrados en la PDI.	46
Esquema 5. Mecanismo del proceso fotodinámico.	46
Esquema 6. Estructura del Salvarsan.	56
Esquema 7. Estructura del Protosil.	57
Esquema 8. Estructura química de diferentes familias de antibióticos.	58
Esquema 9. Estructura química de azoles: imidazoles y triazoles.	61
Esquema 10. Estructura de agentes fotodinámicos.	63
Esquema 11. Estructura general de la ftalocianinas.	64
Esquema 12. Posibles geometrías de agregados de ftalocianinas.	66
Esquema 13. Precursores de ftalocianinas.	67
Esquema 14. Esquema de la reacción de ciclotetramerización.	68
Esquema 15. Esquema de la reacción de condensación estadística.	69
Esquema 16. Estructura general de las subftalocianinas.	69
Esquema 17. Esquema de la reacción de expansión del anillo de las SubPc.	70
Esquema 18. Reacción de hidrólisis de quitina para obtener quitosano.	71
Esquema 19. Estructura química de la polietilenimina.	72
Esquema 20. Ilustración de la utilización de superficies poliméricas dopadas con PS para la descontaminación de aguas mediante PDI.	73
Esquema 21. Estructura química del EDOT.	74
Esquema 22. Sistema de irradiación: monocromador (A), lámpara halógena de 150 W (B) y porta celda de cuarzo (C).	81
Esquema 23. Sistema de irradiación: lámpara halógena de 150 W, suspensión celular planctónica de microorganismos en policubeta.	82
Esquema 24. Potenciostato: Electrodo de trabajo (T), Electrodo de referencia (R) y Contra-electrodo (C).	99
Esquema 25. Estructura de los derivados de Pcs: $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$, $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+y}$ $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$.	103
Esquema 26. Síntesis de SubNPc.	104
Esquema 27. Síntesis del $\text{CF}_3\text{-Pn}$.	105
Esquema 28. Síntesis de $\text{CF}_3\text{N}_3\text{-ZnPc}$.	105
Esquema 29. Obtención de $\text{CF}_3(\text{NH}_2)_3\text{-ZnPc}$.	106
Esquema 30. Obtención de $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$.	106
Esquema 31. Síntesis de $\text{AN}_3\text{-ZnPc}$.	107
Esquema 32. Obtención de $\text{A}(\text{NH}_3)_3\text{-ZnPc}$.	107
Esquema 33. Obtención de $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$.	108
Esquema 34. Síntesis de $\text{N}_4\text{-ZnPc}$.	108
Esquema 35. Obtención de $(\text{NH}_2)_4\text{-ZnPc}$.	109
Esquema 36. Obtención de $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$.	109
Esquema 37. Reacción del DMA con $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.	114

Esquema 38. Formación del DF a partir de la reacción entre $^3\text{PS}^*$ y $\beta\text{-NADH}$, y entre el O_2^- y NBT.	117
Esquema 39. Solución de NBT + $\beta\text{-NADH}$ + $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{+3}$ en 2 mL de DMF/agua 1%. a) Sin irradiar y b) después de 5 min de irradiación con luz monocromática ($\lambda_{\text{irr}}= 680$ nm).....	117
Esquema 40. Reacciones de descomposición para L-Trp.	119
Esquema 41. Desactivación del $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ y del $^3\text{PS}^*$ por el ion azida.	122
Esquema 42. Desactivación de radicales libres por D-manitol.	123
Esquema 43. Síntesis de Bn-Pn.....	142
Esquema 44. Síntesis de Bn-ZnPc.....	143
Esquema 45. Síntesis de A-ZnPc	143
Esquema 46. Síntesis de Q-ZnPc	144
Esquema 47. Síntesis de PA-ZnPc	145
Esquema 48. Reacción del ABMM con $\text{O}_2(^1\Delta_g)$	152
Esquema 49. Síntesis de EDOT-Pn.	170
Esquema 50. Síntesis de EDOT-ZnPc y EDOT-CuPc.	170
Esquema 51. Reacciones generadas a partir de la combinación del anión ioduro con la especie $\text{O}_2(^1\Delta_g)$	185

Glosario de símbolos y abreviaturas

A

Abs: absorbancia

A_b: Absorbancia del blanco

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

AN₃-ZnPc: cinc (II) 2,3-(1,3-buta-1,3-dienil)-9(10),16(17),23(24)-tris(nitro)ftalocianina

AN₃-ZnPc: cinc (II) 2,3-(1,3-buta-1,3-dienil)-9(10),16(17),23(24)-tris(nitro)ftalocianina

A(NM₃)₃-ZnPc³⁺: cinc (II) 2,3-(1,3-buta-1,3-dienil)-9(10),16(17),23(24)-tris(N,N,N-trimetilamonio)ftalocianina

A^{ref}: Absorbancia de la referencia

AS: Agar Sabouraud

A^{sens}: Absorbancia del sensibilizador

ATS: Agar Tripticasa Soya

A-ZnPc: cinc 2-[carboxifenoxi]ftalocianina

B

BioH: Sustrato biológico

β-NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

Bn-Pn: 2-[carbometoxifenoxi]ftalonitrilo

Bn-ZnPc: cinc (II) 2-[carbometoxifenoxi]ftalocianina

C

C. albicans: *Candida albicans*

CDCl₃-d₆: Cloroformo-*d*₆

CF₃-Pn: 4-((4'-trifluorometilbezil) oxi)ftalinitrilo

CF₃N₃-ZnPc: cinc (II) 2-[(trifluorometilbezil)oxi]-9(10),16(17),23(24)-tris(nitro) ftalocianina

CF₃(NH₂)₃-ZnPc: cinc (II) 2-[(trifluoro-metilbezil)oxi]-9(10),16(17),23(24)-tris(amino)ftalocianina (

CF₃(NM₃)₃-ZnPc³⁺: cinc (II) 2-[(trifluoro-metilbezil)oxi]-9(10),16(17),23(24)-tris(N,N,N-trimetilamonio)ftalocianina (

CS: Caldo Sabouraud

CTS: Caldo Tripticasa Soya

D

DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno

DCC:1,3-diciclohexilcarbodiimide

DCM: Diclorometano

DCM-*d*₆: Diclorometano- *d*₆

DMA: 9,10-dimetilantraceno

DMF: *N,N*-dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfósido

DMSO-*d*₆: Dimetilsulfósido - *d*₆

E

E. coli: *Escherichia coli*

EDOT-Pn: 4-((2,3-Dihidrotieno[3,4-b]dioxin-2-il)metoxi)ftalonitrilo

EDOT-ZnPc: cinc (II)
2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis(2,3-Dihidrotieno[3,4-b]dioxin-2-il)metoxi)ftalocianina

EDOT-CuPc: cobre (II)
2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis(2,3-Dihidrotieno[3,4-b]dioxin-2-il)metoxi)ftalocianina

F

FT-IR: Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

G

H

¹HNMR: Resonancia magnética nuclear de ¹H

I

η: Índice de refracción del medio

I^{sens}: Intensidad de fluorescencia del sensibilizador

I^{ref}: Intensidad de fluorescencia de la referencia

IC: Decaimiento térmico

ICS: Entrecruzamiento de sistema

ITO: Indium tin oxide

J

K

k_{obs}: Constante de velocidad observada

k_r: Constante de reacción

k_q: Constante de quenching

L

λ_{máx}: Longitud de onda de un máximo de absorción/emisión

λ_{em}: Longitud de onda de emisión de fluorescencia

λ_{exc}: Longitud de onda de excitación de fluorescencia

λ_{irr}: Longitud de onda de irradiación

Ln: Logaritmo natural

log: Logaritmo decimal

L-Trp: L-Triptófano

M

MS: Espectrometría de masa

MPc: metaloftalocianinas

N

NHS: *N*-hidroxisuccinimide

N₃: Azida de sódio

NBT: Azul de nitrotetrazolio

N₄-ZnPc: cinc (II) 2,9(10),16(17),
23(23)-tetrakis(nitro)ftalocianina

(NH₂)₄-ZnPc: cinc (II) 2,9(10),16(17),
23(24)- tetrakis(amino)ftalocianina

(NM₃)₄-ZnPc⁴⁺: cinc (II) 2,9(10),
16(17),23(24)- tetrakis(N,N,N-
tetrametilamonio)ftalocianina

O

O₂(¹Δ_g): Oxígeno molecular singlete

O₂(³Σ_g⁻): Oxígeno molecular triplete

O₂⁻: Radical anión superóxido

OH: Radical hidroxilo

ON: Overnight

P

P: Producto

PA: Polietilenimina

PA-ZnPc: Conjugado Polietilenimina –
cinc Ftalocianina

PBS: Buffer fosfato salino

Pc: Ftalocianina

PDI: Inactivación fotodinámica

PDT: Terapia fotodinámica

Pn: Ftalonitrilo

PS: Fotosensibilizador

⁰PS: Sensibilizador en estado basal

¹PS*: Sensibilizador en estado excitado
singlete

³PS*: Sensibilizador en estado excitado
triplete

Q

Q: Quitosano

Q-ZnPc: Conjugado Quitosano – cinc
Ftalocianina

R

ROS: Especies reactivas del oxígeno

Rpm: Revoluciones por minuto

Φ_Δ: Rendimiento cuántico de oxígeno
singlete

Φ_F: Rendimiento cuántico de
fluorescencia

S

SDS: Dodecil sulfato sódico

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

SubPc: Cloruro de subftalocianina de
Boro

SubNPc: Cloro [2,9(10),16(17)-
trinitrosubftalocianinato] boro(III)

T

t: Tiempo

THF: Tetrahidrofurano

TLC: Cromatografías en capa fina

U

UFC: Unidades formadoras de colonias

UV: Ultravioleta

UV-visible: Ultravioleta visible

V

VC: Voltimetría cíclica

W

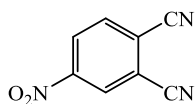
X

Y

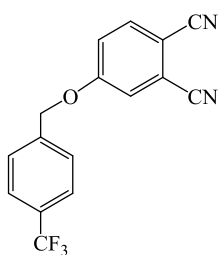
Z

GLOSARIO DE ESTRUCTURAS

Precusores de ftalocianinas

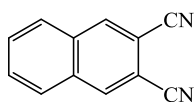


4-nitroftalonitrilo

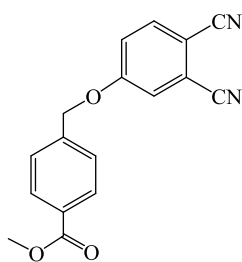


CF₃-Pn

4-((4'-trifluorometilbezil)oxi)ftalinitrilo

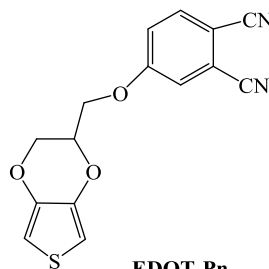


2,3-naftalendicarbonitrilo



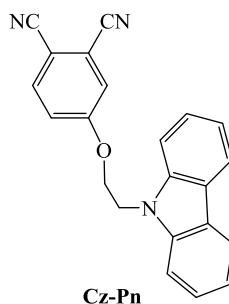
Bn-Pn

2-[carbometoxifenoxi]ftalonitrilo



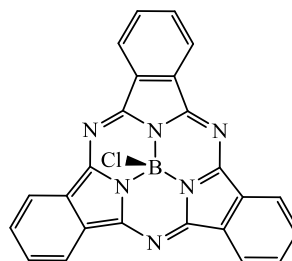
EDOT-Pn

4-((2,3-Dihidrotieno[3,4-b]dioxin-2-il)metoxi)ftalonitrilo



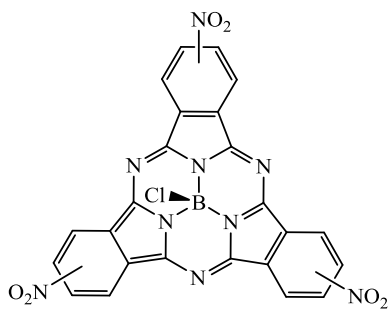
Cz-Pn

4-[9H-carbazol-9-etoxi] ftalonitrilo



SubPc

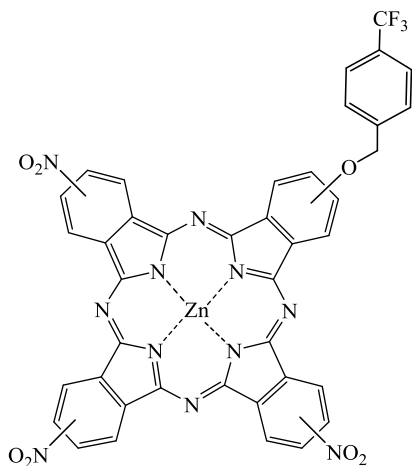
Cloruro de subftalocianina de Boro



SubNPc

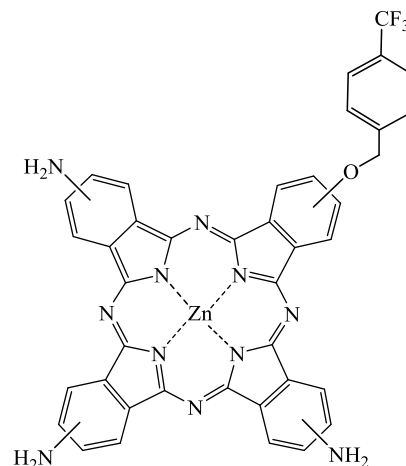
Cloro [2,9(10),16(17)-trinitrosubftalocianinato]boro(III)

Ftalocianinas catiónicas y sus precursoras



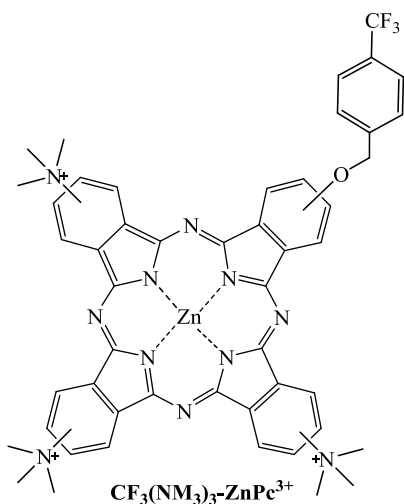
CF₃N₃-ZnPc

Zinc (II) 2-[(trifluorometilbezil)oxi]-9(10),16(17),23(24)-tris(nitro)ftalocianina



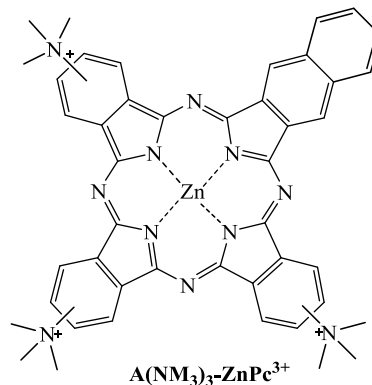
CF₃(NH₂)₃-ZnPc

Zinc (II) 2-[(trifluorometilbezil)oxi]-9(10),16(17),23(24)-tris(amino)ftalocianina

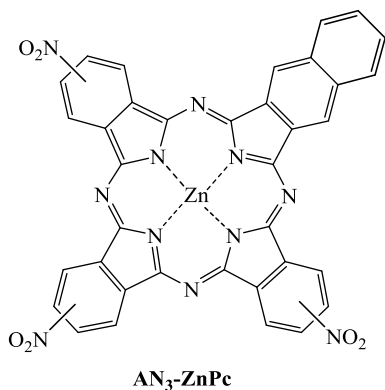


Zinc (II) 2-[(trifluorometilbezil)oxi]-9(10),16(17),23(24)-tris(N,N,N-trimetilamonio)ftalocianina

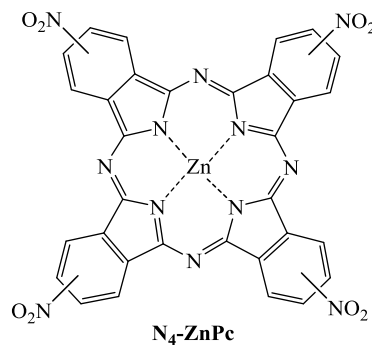
Zinc (II) 2,3-(1,3-butadienil)-9(10),16(17),23(24)-tris(nitro)ftalocianina



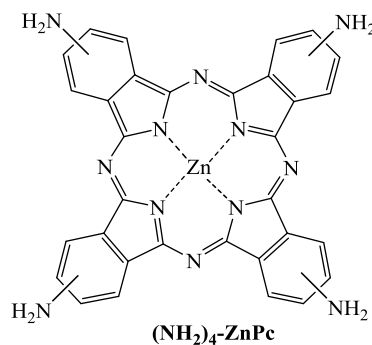
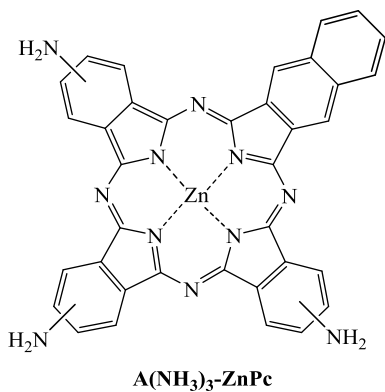
Zinc (II) 2,3-(1,3-butadienil)-9(10),16(17),23(24)-tris(N,N,N-trimetilamonio)ftalocianina



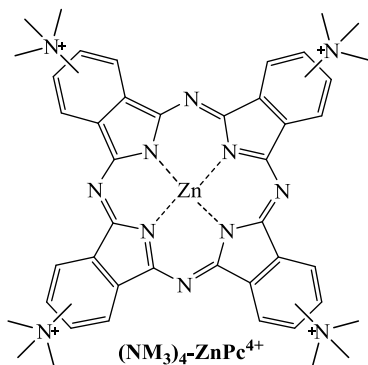
Zinc (II) 2,3-(1,3-butadienil)-9(10),16(17),23(24)-tris(nitro)ftalocianina



Zinc (II) 2,9(10),16(17),23(23)-tetrakis(nitro)ftalocianina

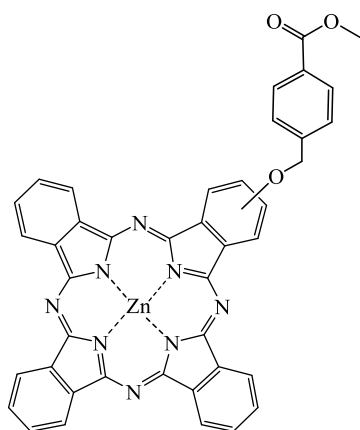


Zinc (II) 2,9(10),16(17),23(24)-
tetrakis(amino)ftalocianina



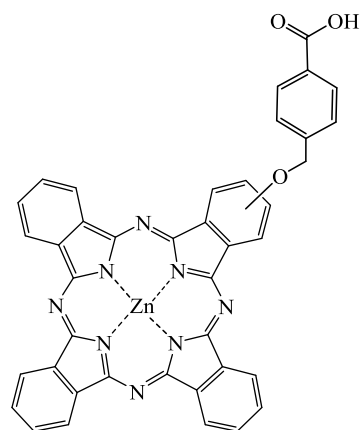
Zinc (II) 2,9(10),16(17),23(24)-
tetrakis(N,N,N-
tetrametilamonio)ftalocianina

Conjugados de ftalocianinas con polímeros precursores catiónicos



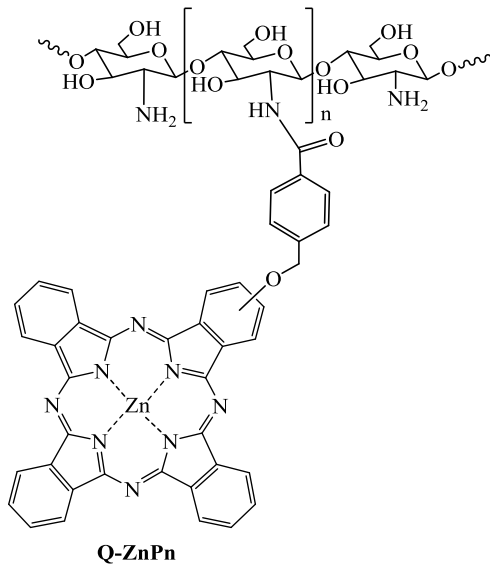
Bn-ZnPc

Zinc (II) 2-
[carbometoxifenoxi]ftalocianina

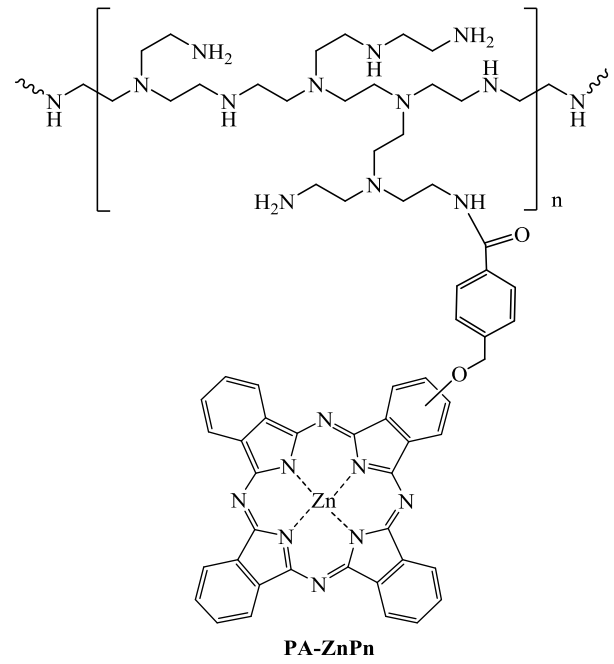


A-ZnPc

Zinc 2-[carboxifenoxi]ftalocianina

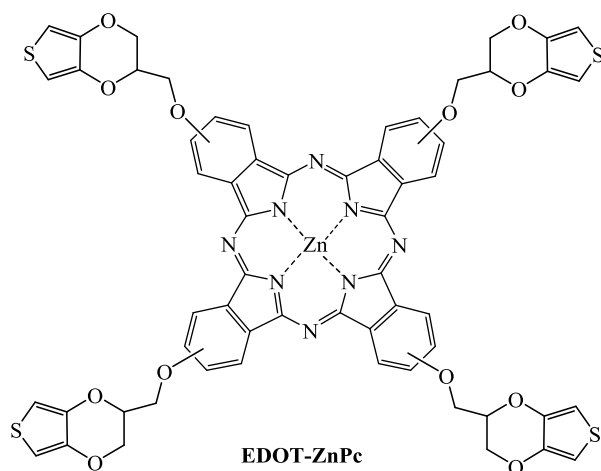


*Conjugado Quitosano – Zinc
Ftalocianina*

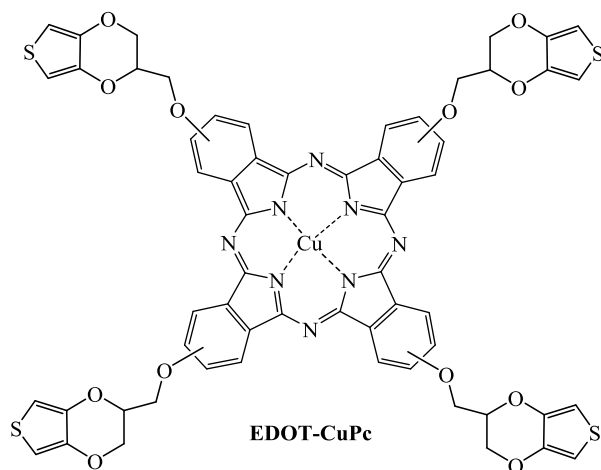


*Conjugado Polietilendiimida – Zinc
Ftalocianina*

Ftalocianinas para la formación de películas poliméricas



Zinc (II) 2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis(2,3-Dihidrotieno[3,4-b]dioxin-2-il) metoxy)ftalocianina



Cobre (II) 2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis(2,3-Dihidrotieno[3,4-b]dioxin-2-il)metoxy) ftalocianina

Capítulo 1 - INTRODUCCION

1 Introducción

1.1. Aspectos históricos de la fototerapia

Desde comienzos del siglo XX se ha utilizado la fototerapia, como terapia alternativa al uso de fármacos, para el tratamiento de enfermedades tales como cáncer, herpes, psoriasis, entre otras [1]. El concepto de fototerapia respaldado por el método científico surgió de la mano de Niels Ryberg Finsen (Figura 1), quien realizó experimentos con especies de origen animal utilizando radiación ultravioleta. Esta metodología está basada esencialmente en la utilización de luz ultravioleta, visible o del infrarrojo cercano, en el tratamiento de enfermedades [1].



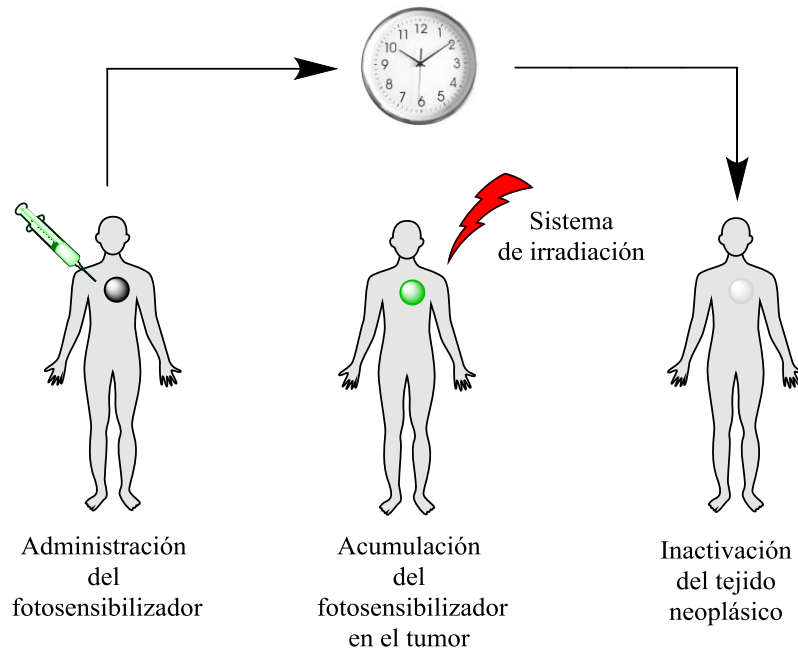
Figura 1. Niels Ryberg Finsen, Premio Nobel 1903.

Existen diferentes maneras de llevar a cabo la fototerapia, una de ellas es sin la administración de droga, siendo la luz absorbida sólo por las moléculas presentes en el organismo (directa), o bien cuando se integra una sustancia, un sensibilizador, y luego se irradia. Esta última se refiere a la fotoquimioterapia, proceso que es iniciado con la irradiación de la luz que, subsiguientemente, es absorbida por el sensibilizador (indirecta) [1]. Posterior a la segunda guerra mundial, la fotoquimioterapia reapareció con aplicaciones en terapias alternativas tales como la terapia de cáncer y más recientemente a partir de los 90 como la terapia antimicrobiana [1].

1.1.1. Terapia fotodinámica de cáncer

El progreso de la investigación básica ha permitido obtener una mejor comprensión del comportamiento biológico de células tumorales lo cual contribuyó considerablemente en el diseño de nuevas generaciones de fármacos dirigidos [2]. Sin embargo, los ensayos clínicos realizados con fármacos dirigidos, han registrado pequeños incrementos en la eficiencia a dichos tratamientos. Estos resultados indicaron la necesidad de aumentar las investigaciones en enfoques terapéuticos alternativos, tales como la fototerapia aplicada al cáncer (PDT) [2].

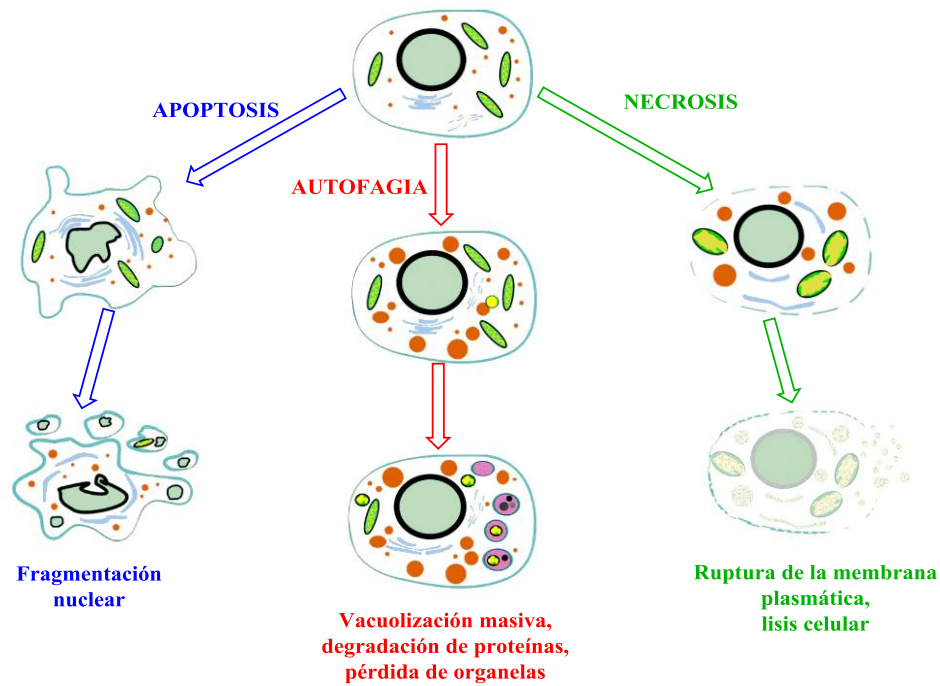
En los últimos años, la PDT ha evolucionado considerablemente convirtiéndose en una alternativa importante para el tratamiento de enfermedades cancerosas [2-3]. La PDT combina la utilización de una droga (fotosensibilizador, PS), luz visible y oxígeno [1]. Los tratamientos de terapia fotodinámica se basan en la administración de una molécula fotosensibilizadora, la cual se acumula e incorpora selectivamente en células neoplásicas. La posterior exposición a la luz visible del tejido dañado origina diferentes eventos bioquímicos provocando la eliminación de productos tóxicos que inactivan de manera específica a células neoplásicas (Esquema 1) [4-5]. Sin bien, los mecanismos fotoquímicos y fotobiológicos que dan lugar a dichos eventos no se encuentran completamente dilucidados, está aceptado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) son las principales responsables del fotodaño [3,6]. Las principales especies responsables de causar la toxicidad en las células involucran al oxígeno molecular singlete ($O_2(^1\Delta_g)$), el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical oxidrilo (OH^{\cdot}) [2,5].



Esquema 1. Principio de la terapia fotodinámica para el tratamiento de cáncer (PDT).

La PDT es capaz de inducir varios mecanismos de muerte celular controlada (apoptosis y autofagia), como así también mecanismos de muerte celular descontrolada (necrosis) (Esquema 2) [7]. La muerte celular por apoptosis se caracteriza por un encogimiento del citoplasma, condensación de cromatina iniciada en la membrana nuclear y luego involucrando todo el núcleo, fragmentación nuclear y alteraciones de otros orgánulos que culmina en la formación de cuerpos discretos que inicialmente retienen la integridad de la membrana plasmática (cuerpos apoptóticos). Por otro lado, la autofagia presenta una extensa vacuolización del citoplasma con pérdida de organelas y la necrosis exhibe características diferentes a las de apoptosis y autofagia, se genera la ruptura de la membrana plasmática seguida por la lisis celular [7].

La eficiencia y el mecanismo de PDT se encuentran ampliamente relacionados con la localización intracelular del PS [8]. Los PSs pueden concentrarse en diferentes organelas celulares tales como la mitocondria, retículo endoplásmico o lisosomas, induciendo la muerte celular apoptótica [9-12]. No obstante, en condiciones experimentales similares se ha observado la presencia de muerte celular necrótica en algunas líneas celulares [13-14].



Esquema 2. Mecanismos de muerte celular.

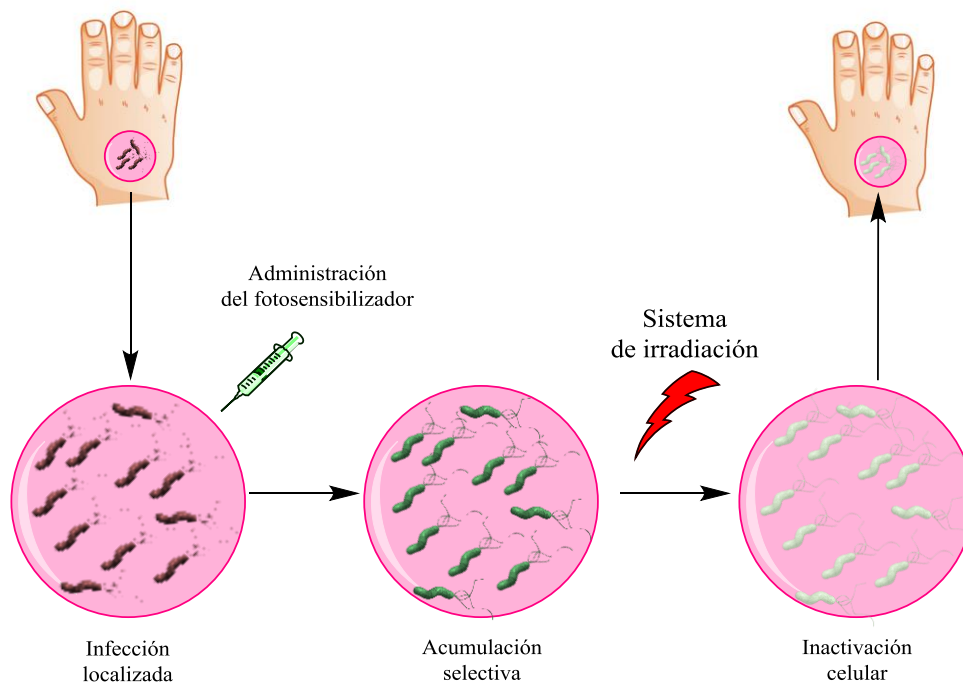
1.1.2. Terapia fotodinámica de microorganismos

La fototerapia se originó en un principio como una modalidad antimicrobiana. En 1900, Raab describió la fotoinhibición de paramecios mediante experimentos con naranja de acridina y observó que, en ausencia de luz visible, no era posible la erradicación de dichos microorganismos. Otras experiencias previas realizadas por Jodlbauer y von Tappainer demostraron que además de la luz, la presencia de oxígeno era un requisito esencial para que la fotosensibilización se llevara a cabo [15]. Además, en 1903, Niels Finsen recibió el premio Nobel por su invención de la terapia de luz para la tuberculosis cutánea (Figura 1). Recientemente, casi un siglo después, Moller y su equipo de investigadores, informaron que el efecto terapéutico del método de Finsen probablemente fue fotodinámico, como resultado de la excitación con luz a 440 nm de la coproporfirina III presente en *Mycobacterium tuberculosis* [16].

Pese a estos resultados, la terapia fotodinámica aplicada a microorganismos o también llamada inactivación fotodinámica de microorganismos (PDI), se investigó luego de varias décadas debido al descubrimiento de los antibióticos. Estos fármacos, en un principio, presentaron incidencia en la reducción de enfermedades infecciosas con rapidez sin representar una amenaza para la salud humana [17].

Unos años después de 1946, la utilización de antibióticos se tornó un problema serio debido a que comenzaron a aparecer cepas microbianas que presentaron resistencia a los mismos. Este problema se originó debido a una combinación de factores, incluidas la gran variedad de estrategias adoptadas por los patógenos para neutralizar los cambios físicos y químicos, en conjunto con la prescripción médica inadecuada y el uso de altas dosis de antibióticos en animales domésticos. Además, la expansión de la pobreza y el aumento del número de viajes internacionales, posibilitaron la rápida diseminación de los patógenos por el mundo [17].

Por lo mencionado anteriormente, hasta el momento no se ha identificado una estrategia integral para el tratamiento de enfermedades infecciosas. En este sentido, la PDI podría convertirse en una herramienta que permita encontrar una solución al problema planteado [15,17]. La PDI de microorganismos consta de la administración de una molécula fotosensibilizadora no tóxica, la cual es acumulada preferencialmente en las células microbianas que, en combinación con la luz visible a una longitud de onda correcta, excita al PS generando la inactivación del microorganismo. La presencia de oxígeno es una condición esencial, debido a que los PS en estado excitado son capaces de transferir energía o electrones al oxígeno molecular y así producir ROS. Estas especies son capaces de producir daños específicos en las células que, consecuentemente, desencadenan eventos que conllevan a la inactivación de los microorganismos (Esquema 3) [15,18-19]. En general en PDI, el PS es aplicado de manera tópica, por instilación, inyección intersticial o mediante el suministro de aerosol en el área infectada [15,18].



Esquema 3. Principio de la inactivación fotodinámica de microorganismos (PDI).

Entre los años 1900 y 1990 los científicos investigaron la fotoinactivación de bacterias y hongos patógenos. En un principio no existía certeza de cómo abordar el combate de las enfermedades microbianas. Ellos observaron que los fotosensibilizadores de naturaleza hidrofóbica (por ejemplo derivados de benzoporfirinas) o de carácter aniónico (por ejemplo protoporfirina IX), si bien resultaban eficientes en su actividad antitumoral, el efecto en células bacterianas era mínimo. Los avances en este campo permitieron el descubrimiento de fotosensibilizadores catiónicos de las familias de porfirinas, ftalocianinas y fenotiazinas que conseguían una alta eficiencia contra enfermedades infecciosas [17].

La PDI de microorganismos presenta características importantes que favorecen su aplicación, entre las que se pueden citar:

- Alta susceptibilidad al tratamiento exhibida por cepas microbianas resistentes a los antibióticos sin la selección paralela de especies fotoresistentes, incluso después de múltiples tratamientos.

- Bajo riesgo en la inducción de efectos mutagénicos en los microorganismos.
- Capacidad de desarrollar regímenes de tratamiento eficaces que actúan en la mayoría de patógenos microbianos, incluyendo bacterias Gram positivas y Gram negativas, levaduras, hongos, protozoos y parásitos (Figura 2).

- Posibilidad de activar la acción fotodinámica de los PS por medio de fuentes de luz visible (medio barato y seguro) y aunque puede aplicarse rápidamente para la terapia de

infecciones en órganos fácilmente accesibles, el progreso continuo en la tecnología de fibra óptica hace que incluso infecciones profundas sean susceptibles a la fotoactivación [15].

Debido a las ventajas presentadas por este tipo de tratamiento, es probable que la PDI, se convierta en una opción terapéutica corriente en un futuro cercano [15].

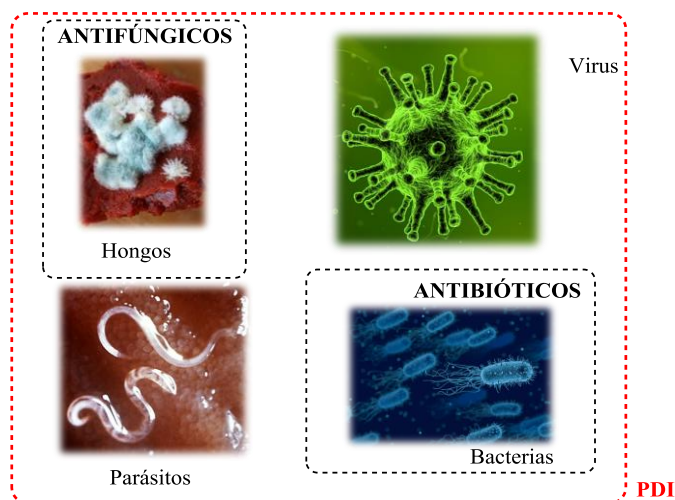
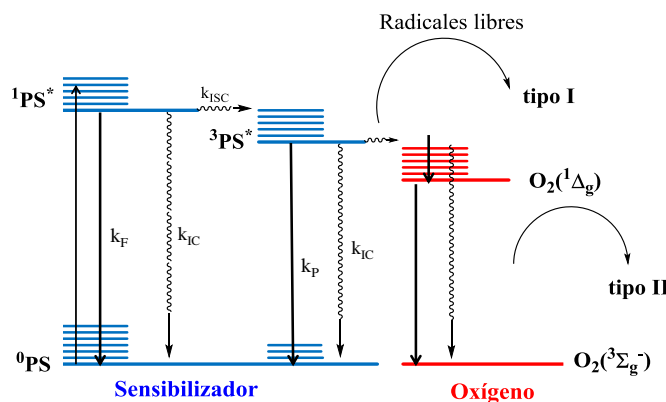


Figura 2. Representación esquemática del campo de aplicación microbiológico de PDI.

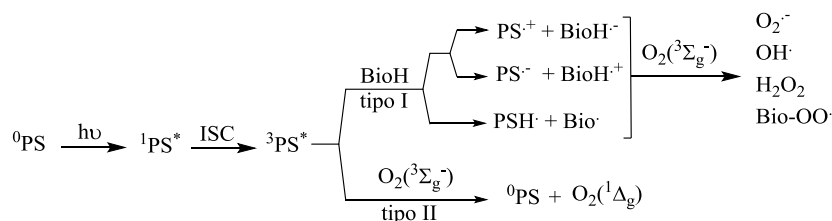
1.2. Mecanismos de acción fotodinámica

La PDI puede ocurrir mediante diferentes mecanismos. La combinación de luz, PS y oxígeno son considerados los principales elementos implicados en el fotodaño de células [20-21]. Los mecanismos involucran diversos procesos que presentan como componente principal al PS en estado basal (^0PS), el cual por la absorción de luz es promovido a un estado excitado singlete de mayor energía ($^1\text{PS}^*$), seguido por un entrecruzamiento de sistema (ICS) a un estado excitado triplete ($^3\text{PS}^*$). Existen procesos que permiten la disipación de energía desde el estado excitado del PS. Los procesos radiativos como la fosforescencia (P) disipan la energía desde el $^3\text{PS}^*$, mientras que aquellos que emiten fluorescencia (F) lo hacen desde $^1\text{PS}^*$. Sin embargo, desde cualquiera de los estados excitados ($^1\text{PS}^*$ o $^3\text{PS}^*$), pueden retornar a su estado fundamental por decaimiento térmico (IC), mediante procesos no radiativos. (Esquema 4) [22]. En el estado triplete excitado, el PS puede reaccionar con un sustrato (BioH), tal como una biomolécula, formando radicales libres mediante transferencia de electrones o protones. Muchos de estos radicales reaccionan con oxígeno generando una mezcla de ROS a través del mecanismo tipo I. Estos intermediarios son capaces de oxidar una amplia variedad de biomoléculas [20,23]. Los radicales libres tienen además la posibilidad de recombinarse y no reaccionar. En las reacciones tipo II la energía de $^3\text{PS}^*$ es

transferida al oxígeno molecular en estado basal ($O_2(^3\Sigma_g^-)$) para formar $O_2(^1\Delta_g)$ (Esquema 5). Tanto el mecanismo tipo I, como el tipo II, pueden ocurrir simultáneamente, y la relación entre los dos procesos depende del PS, el sustrato y la naturaleza del medio [9].



Esquema 4. Procesos fotoquímicos involucrados en la PDI.



Esquema 5. Mecanismo del proceso fotodinámico.

Las ROS reaccionan con una gran variedad de sustratos, como lo son la membrana plasmática, liposomas, mitocondrias, ADN, entre otros [24], presentes en las células induciendo daños en las biomoléculas que conducen a la pérdida de la función biológica, produciendo la inactivación celular [5].

1.3. Microorganismos

La PDI aplicada para la inactivación de microorganismos tiene como objetivo principal la reducción de microorganismos patógenos, como bacterias, hongos, protozoos y virus. Debido a sus diferencias estructurales, metabólicas y al comportamiento de los microorganismos, la efectividad de PDI está sujeta a variaciones ya que la permeabilidad y las cargas de las membranas celulares pueden dificultar o facilitar la penetración del PS en el interior de las células [17]. En particular, la aplicación de PDI en bacterias y hongos será motivo de estudio en este trabajo de Tesis Doctoral. Por lo tanto, es necesaria la descripción de diversas características fundamentales que presentan estos microorganismos patógenos de mayor interés para estos estudios.

1.3.1. Bacterias

Las bacterias son los organismos más abundantes del planeta, se encuentran en la mayoría de los hábitats y son capaces de soportar condiciones ambientales extremas. Son microorganismos unicelulares, procariotas y presentan una estructura muy simple y formas variadas [17,25]. Son seres microscópicos de tamaño pequeño, presentan de 0,2 a 0,5 μm de diámetro y 1 a 6 μm de longitud pudiendo llegar a tener hasta 10 μm de diámetro y 25 μm de longitud. A pesar de su diminuto tamaño, son responsables de innumerables enfermedades que aquejan a la sociedad [17,25]. La morfología de las bacterias diferencian a este microorganismo de otros, debido a su tamaño, forma y al arreglo de organelas que poseen (Figura 3) [17].

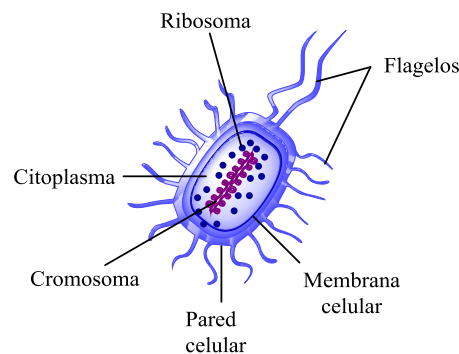


Figura 3. Célula bacteriana.

Las bacterias pueden clasificarse e identificarse de acuerdo con la estructura de la pared celular que poseen. La técnica de Gram, descubierta por Hans Christian Gram en 1884, es una técnica de coloración que permite diferenciar células de acuerdo con su estructura en la pared celular. Las bacterias Gram positivas adquieren una coloración azul-violeta y las Gram negativas, rojas en presencia violeta de metilo [17].

Las bacterias Gram positivas poseen una membrana citoplasmática rodeada por una pared celular porosa, compuesta por un 90 % de peptidoglicano y ácido lipoteicoico, la cual permite una fácil incorporación de los agentes fototerapéuticos (Figura 4). Los grupos fosfatos de los ácidos teicoicos le confieren una carga negativa en el exterior de la pared celular lo cual le permite regular la captación de cationes desde el medio externo hacia el interior de las células [17,20,26].

Por otro lado, las bacterias Gram negativas poseen una envoltura celular constituida por una membrana citoplasmática interna y una membrana externa que están separadas por el periplasma que contiene peptidoglicano. Contiene lipoproteínas, lipopolisacáridos y

proteínas con función porina que proporcionan a la superficie exterior de la membrana un continuo de cargas negativas (Figura 4). Estas, se encuentran parcialmente neutralizadas por los iones Mg^{2+} y Ca^{2+} . Si bien los PS presentan un mayor tamaño que estos cationes, la estructura de los lipopolisacáridos se ve distorsionada ante la presencia de estas moléculas permitiendo la unión o penetración de las mismas a las células. La complejidad de la pared celular de las bacterias Gram negativas es mayor que las Gram positivas debido a que poseen una segunda membrana de revestimiento celular. La membrana externa forma una barrera de permeabilidad efectiva entre la célula y su entorno y tiende a restringir la unión y la penetración de muchas estructuras terapéuticas (Figura 4) [17,20,26].

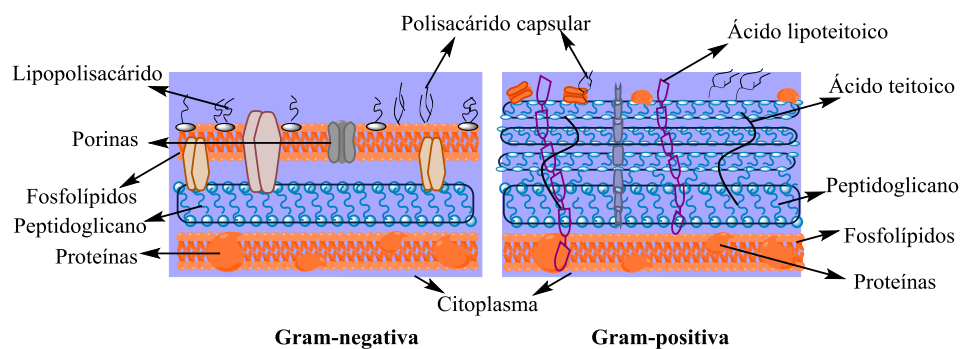


Figura 4. Estructura de las paredes celulares de bacterias Gram positiva y Gram negativa.

El efecto de PDI frente a células bacterianas se ve afectado debido a la diversidad fisiológica que esta especie de microorganismos posee y de la composición del revestimiento celular. Las bacterias Gram positivas son más susceptibles a la acción de PDI que las bacterias Gram negativas. Es por ello que la estructura del fotosensibilizador a utilizar cumple un rol importante en la PDI de bacterias [27]. De modo general, las moléculas de PS neutras, catiónicas o aniónicas inactivan eficientemente a bacterias Gram positivas, mientras que sólo aquellos PS catiónicos atraviesan la barrera de permeabilidad de Gram negativas para luego generar la inactivación [27]. Las bacterias *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) y *Escherichia coli* (Gram negativa) son las de principal interés en el presente trabajo.

1.3.1.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus forma parte del género *Staphylococcus* y la familia *Micrococcaceae*. Son células Gram positivas, inmóviles, esféricas, no esporuladas y usualmente catalasa positiva. Su tamaño puede variar de 0,5 a 1,5 μm y están dispuestas de a pares, tétradas o racimos irregulares (Figura 5). Soportan el calor (hasta 50°C durante 30 min) y altas concentraciones de cloruro de sodio. Son organismos anaerobios facultativos que producen ácidos a partir de

glucosa, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Presentan una temperatura de crecimiento entre 30-37 °C. En medios sólidos las colonias típicas se presentan como circulares, lisas, mantecosas, redondas, ligeramente convexas y con un diámetro de 1 a 4 mm [20].



Figura 5. Colonias de *S. aureus* creciendo sobre placa de agar sangre (izquierda). Microscopía electrónica de barrido de cocos de *S. aureus* (derecha).

S. aureus es un agente etiológico de diversas patologías, tales como infecciones de piel y tejidos blandos, bacteremia, endocarditis, infección del sistema nervioso central y del tracto génito-urinario. Debido a su ubicuidad, y en función de los procedimientos médicos llevados a cabo y el uso de antimicrobianos, se confiere especial énfasis al aislamiento y estudio epidemiológico de *S. aureus*, considerando su rol primordial en las infecciones nosocomiales [28].

El desarrollo de cepas resistentes a múltiples cantidades de antibióticos tales como la meticilina, ocurre en los hospitales de todo el mundo y causa una importante morbilidad y mortalidad. En este sentido, la PDI forma parte de las propuestas alternativas para el control de infecciones ocasionadas por *S. aureus* [29-30].

1.3.1.2. Escherichia coli

E. coli pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo y oxidasa negativo (Figura 6). Aquellas bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* se caracterizan por ser capaces de respirar facultativamente, anaeróticamente en el interior del intestino y aeróticamente en el ambiente exterior. Es por ello que presenta la capacidad de crecer en condiciones aerobias y anaerobias, preferentemente a 37 °C [29,31].

E. coli es el principal organismo anaerobio facultativo del sistema digestivo, coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se lo considera un microorganismo de flora normal. No obstante, estas cepas pueden producir infecciones en

pacientes inmunodeprimidos, las cuales pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos (infecciones urinarias, meningitis, sepsis) [29,32]



Figura 6. Colonias de *E. coli* creciendo sobre placa de agar sangre (izquierda). Microscopía electrónica de barrido de bacilos de *E. coli* (derecha).

La resistencia a los antibióticos de las bacterias patógenas tales como *S. aureus* y *E. coli*, presenta en la actualidad un desafío para el desarrollo de terapias antibacterianas alternativas. El uso injustificado de antibióticos en la práctica familiar, en la cría de animales y/o en ambientes hospitalarios, han generado resistencia de bacterias a una múltiple variedad de fármacos [27]. La transferencia genética de plásmidos codificando la resistencia a los antibióticos y el uso común de los antibióticos dan ventaja selectiva a los patógenos resistentes y son responsables del aumento de la mortalidad de los pacientes. Es por ello que la posibilidad de erradicar bacterias mediante fármacos activados por luz, parece ser un potencial terapéutico inmediato para el manejo clínico de enfermedades infecciosas [29].

1.3.2. Hongos

En un principio, los hongos eran considerados vegetales, pero presentaban diferencias importantes entre ellos que no justificaba la inclusión en el mismo grupo debido a que no son capaces de sintetizar clorofila ni otros compuestos fotosintéticos, no almacenan almidón y no poseen celulosa en la pared celular. Su comportamiento es único y son encontrados tanto en vegetales como animales, incluido el hombre. En el agua, desempeñan un papel importante en la mineralización del carbono orgánico y en la descomposición de materia orgánica [17].

Los hongos pertenecen al dominio Eucarya y cuentan con aproximadamente 100.000 especies, entre las cuales hay tanto benéficas como perjudiciales para el entorno humano, en el área de la salud y la producción. Contribuyen a la descomposición de la materia orgánica y participan en los ciclos biológicos. Un número reducido, son considerados patógenos para animales y plantas [33]. Constituyen un gran y diverso conjunto, dentro del que se

encuentran: hongos filamentosos, levaduras y setas. Presentan diferentes formas, desde microorganismos unicelulares de forma redonda u ovalada como las levaduras (colonias lisas) hasta pluricelulares como los hongos filamentosos o mohos que pueden formar largas cadenas de células [34].

Los hongos pueden ser diferenciados fácilmente de los procariotas por su mayor tamaño. Son organismos eucariotas típicos sin diferenciación tisular, poseen un núcleo que contiene varios cromosomas delimitado por una membrana nuclear, con nucléolo rico en ARN y organelas citoplasmáticas, tales como mitocondrias, vacuolas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y ribosomas 80 S (Figura 7)[35].

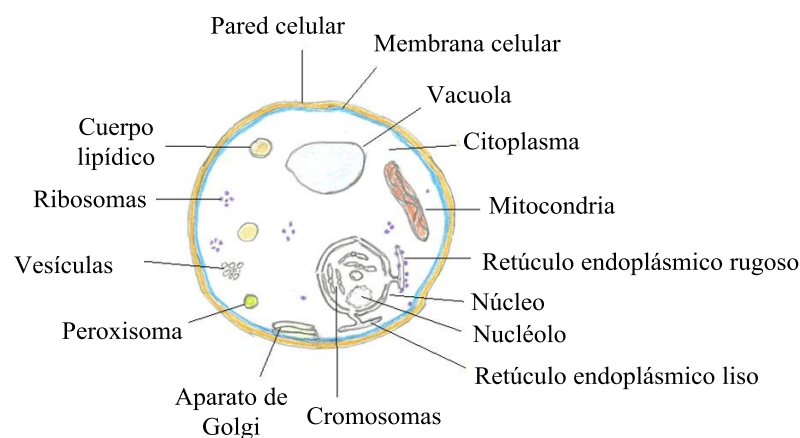


Figura 7. Célula fúngica.

Además, son capaces de ocasionar patologías en el hombre por varios mecanismos: intoxicación alimentaria por sustancias químicas constituyentes del hongo ingerido (micetismo), intoxicación por ingestión de toxinas elaboradas por el metabolismo del hongo al crecer en algunos alimentos (micotoxicosis), reacciones de hipersensibilidad debidas a mecanismos inmunológicos (alergias) e infecciones por invasión de los tejidos superficiales o profundos, capaces de producir enfermedad (micosis) [36].

1.3.2.1. Levaduras

Las levaduras son organismos generalmente unicelulares que se reproducen por fisión binaria o por gemación asexualmente. Pueden distinguirse además por la presencia de elementos intracelulares tales como el núcleo. Las levaduras están rodeadas por una pared celular rígida compuesta principalmente por polisacáridos solubles e insolubles, como quitina, β -glucanos y manoproteínas, consiste en una doble capa de lípidos que contiene proteínas y esteroides (Figura 8).

La envoltura celular actúa como una barrera de permeabilidad, es relativamente impermeable a drogas neutras y aniónicas. La eficiencia de la fotosensibilización puede aumentarse utilizando PS con cargas positivas intrínsecas [37]. Estos agentes catiónicos interactúan fuertemente con la superficie externa incrementando la eficiencia de los procesos fotodinámicos [38].

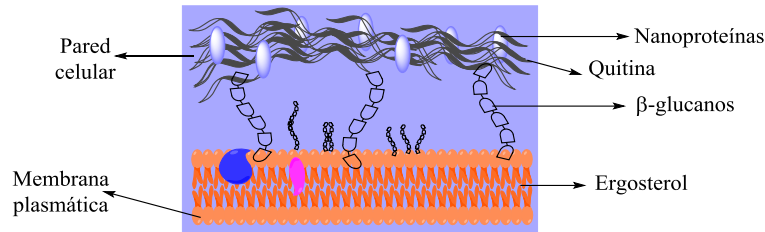


Figura 8. Estructura de la pared celular de levaduras.

1.3.2.1.1. *Candida albicans*

C. albicans pertenece al reino: Hongo, división: Deuteromycota, clase: Blastomycetes, familia: *Cryptococcaceae*, género: *Candida*; especies: *albicans* [39]. Esta especie se encuentra dentro de las doce especies pertenecientes al género *Candida* que poseen la facultad de adaptarse a una temperatura de 37 °C y pueden ser ocasionalmente patógenas para el hombre [40].

Esta levadura suele presentarse como una célula oval levaduriforme con paredes finas, de 2 a 4 μm (Figura 9); en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 μm de diámetro y pseudohifas (células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí) [33]. La síntesis de los componentes de la pared celular está dinámicamente influenciada por las condiciones de crecimiento y por los estadios metabólicos [41].



Figura 9. Colonias de *C. albicans* creciendo sobre placa de agar Sabouraud (izquierda). Microscopía electrónica de barrido de *C. albicans* (derecha).

C. albicans es capaz de generar micosis superficial (en uñas, mucosa oral), micosis profunda localizada (absceso, artritis, nefritis) o micosis sistémica (septicemia) [42]. La infección oral fúngica más frecuente en humanos es la candidiasis y se manifiesta en diversas formas clínicas: pseudomembranosas, eritematosa y hiperplásica, variantes que recientemente describen un eritema gingival lineal asociado con la infección de HIV [43].

1.3.3. Biopelículas de microorganismos

Las enfermedades infecciosas han experimentado cambios significativos que involucran la forma de enfrentar las diferentes infecciones microbianas. Aquellas enfermedades de orden infeccioso clásicas, han dejado de presentar alta relevancia para dar lugar a infecciones caracterizadas por un desarrollo crónico, que a menudo alterna con fases de exacerbaciones agudas, refractario a los tratamientos antimicrobianos y presenta mecanismos patogénicos indefinidos [44]. La mayoría de las infecciones microbianas involucran a células que “flotan” libremente (planctónicas) y de manera independiente a otras células microbianas. Un ejemplo de este tipo de enfermedades son el cólera y la difteria, cuyos mecanismos patogénicos se convirtieron epítopes para vacunas y antibióticos [44-45]. Sin embargo, investigaciones han revelado que numerosas infecciones microbianas crónicas son generadas por agregados microbianos conocidos como biopelículas (biofilms en inglés) [44].

Las biopelículas son agregados de microorganismos incrustados o depositados en una matriz extracelular de sustancias poliméricas (Figura 10). La formación de la biopelícula resulta de la producción continua de factores de virulencia y una mayor tolerancia a defensas inmunitarias y agentes antimicrobianos [45-46]. Llegar a esta definición de biopelícula involucró investigaciones por más de 25 años, desde Marshall (1976) quien señaló que logró anclar bacterias en las superficies de fibrillas de un polímero extracelular [47-48].

En 1978 se observó que las comunidades de bacterias adheridas en sistemas acuáticos estaban encerradas en una matriz de glicocalix, el cual resultó ser polisacárido natural que mediaba la adhesión celular [49]. Luego de 10 años, se demostró que la biopelícula consiste en células individuales y microcolonias, todas incrustadas en una matriz de exopolímero predominantemente aniónica hidratada [47,50].

Años posteriores a 1990, Characklis y Marshall, describieron otros aspectos de las biopelículas, como las características de la heterogeneidad espacial y temporal, y la participación de sustancias inorgánicas o abióticas mantenidas juntas en la matriz de la

biopelícula [47,51]. Además, se descubrió que las biopelículas podrían adherirse a superficies e interfaces y entre sí, incluso en la definición de agregados microbianos y flóculos, se incluyen poblaciones adherentes dentro de espacios porosos entre microorganismos [47]. Al mismo tiempo, Costerton y Lappin-Scott, afirmaron que la adhesión desencadena la expresión de genes que controlan la producción de componentes bacterianos necesarios para la adhesión y la formación de biopelículas, enfatizando que el proceso de formación de biopelículas fue regulado por genes transcritos durante la unión celular inicial [47].

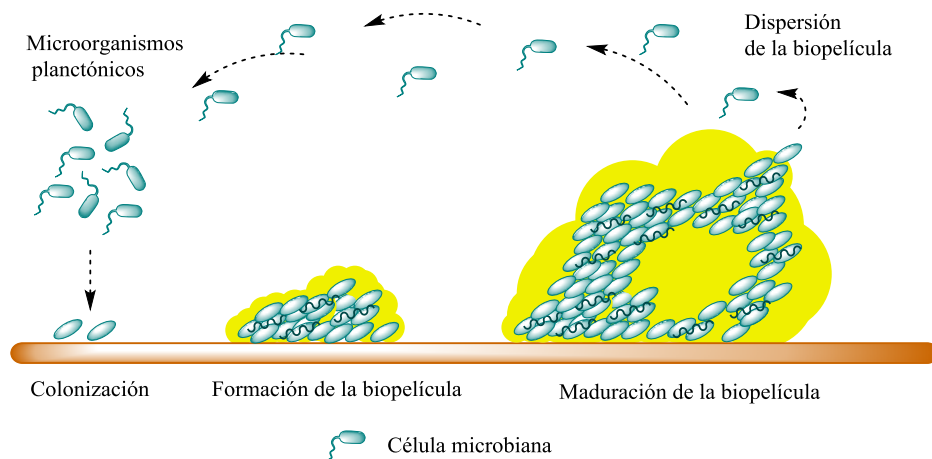


Figura 10. Formación de biopelículas a partir de células planctónicas.

Consecuentemente, la definición de biopelícula debe tener en cuenta características fácilmente observables, es decir, las células unidas irreversiblemente a una superficie o interfaz, incrustadas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas mismas han producido e incluidos los componentes no celulares o abióticos. Además, poseen características fisiológicas diferenciales a los organismos planctónicos, como la tasa de crecimiento alterada y la capacidad de transcribir genes [47].

Por esta razón, se considera que los microorganismos creciendo como biopelículas, son la forma de vida más abundante de microorganismos en la naturaleza, debido a que crecen en innumerables ambientes, tales como sistemas rocosos, caños de efluentes, huesos infectados, placas dentales, lentes de contactos. Los ambientes en donde los microorganismos no se encuentran abastecidos de suficiente cantidad de nutrientes son aquellos más propicios para la formación de biopelículas [45].

Las infecciones asociadas a la formación de biopelículas presentan características distintivas, una susceptibilidad reducida a los agentes antimicrobianos comúnmente

utilizados y una gran capacidad de resistir la eliminación de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas del huésped [44]. Las biopelículas poseen características morfológicas reconocibles al microscopio electrónico de barrido, estas consisten en microorganismos encerrados en una matriz de exopolisacáridos atravesada por canales. La presencia de estos canales, permite la circulación de nutrientes, agua, oxígeno y diferentes secreciones a través de ellos [52]. Sin embargo, la presencia de estos canales permite que dentro de los mismos se creen ambientes diversos con características especiales de pH, concentración de nutrientes u oxígeno. Estas características evidencian la heterogeneidad sobre el estado fisiológico de la biopelícula [46,52]. En general, están compuestos mayoritariamente por agua (98%) y en menor medida por macromoléculas como DNA, productos de la lisis microbiana, proteínas [46,52].

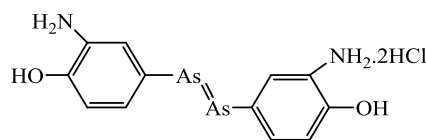
Por las características anteriormente mencionadas de las biopelículas, las infecciones causadas por las mismas son difíciles de diagnosticar debido a que no existen métodos universalmente aceptados para tal fin. Sin embargo, la visualización de agregados microbianos es un indicador de la existencia de una infección por biopelículas [46]. La incidencia de la aparición de infecciones en la salud humana causadas por biopelículas microbianas ha producido graves problemas en la salud pública debido principalmente al aumento de la resistencia de algunos patógenos contra antimicrobianos y la potencialidad de causar infecciones graves en pacientes [46]. Consecuentemente, surgió la necesidad de encontrar enfoques alternativos para el tratamiento de los patógenos presentes en las biopelículas como es la PDI [46,53].

1.4. Agentes antimicrobianos

A partir de 1945, surge la necesidad de encontrar un fármaco para el tratamiento de la sífilis, así nace la utilización de sales de mercurio. El descubrimiento de la toxicidad del mercurio en células animales y humanas fomentó la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos para la eliminación de aquellas enfermedades [54-55]. El agente antimicrobiano a utilizar debe cumplir con ciertos requisitos para lograr su plena efectividad en tratamientos de enfermedades infecciosas, no sólo debe matar o inhibir al microorganismo causante de la infección, sino que además debe ser relativamente inocuo para las células humanas, es decir exhibir toxicidad selectiva [54-55].

Los agentes antimicrobianos son sustancias químicas de origen natural o sintético. Los primeros, se obtienen principalmente de plantas y microorganismos productores de antibióticos, sin embargo la metodología de extracción, purificación, estabilización e incorporación de dicho antimicrobiano al organismo a tratar suele presentar ciertos obstáculos. Por otra parte, los antimicrobianos sintéticos son diseñados dependiendo de la utilización que se va a desarrollar [55-58]. Estos agentes, en un principio, se aplicaron como conservantes de los alimentos, sin embargo, su manejo se vio expandido a diferentes áreas de la salud [55-56].

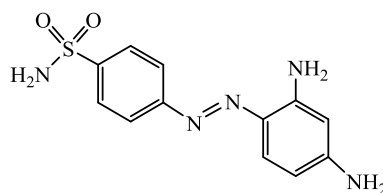
A principios del siglo XX, Paul Ehrlich creía que era posible la obtención de un compuesto químico que pudiera curar específicamente la sífilis sin dañar al paciente. Se conocía que el arsénico inhibía al microorganismo causante de la sífilis (*Treponema pallidum*) pero que también era tóxico para las células humanas. Ehrlich trabajó en la idea de que el arsénico podía incorporarse dentro de compuestos orgánicos de tal manera que perdiera su toxicidad para las células humanas manteniendo sus propiedades antimicrobianas. Después de ensayar seiscientos cinco sustancias con estas características encontró un compuesto, el seiscientos seis, que cumplía estos requisitos. A esta sustancia la llamó Salvarsan y fue el primer compuesto químico sintetizado en laboratorio que podía curar una enfermedad sin ser tóxico para el paciente (Esquema 6). Gracias a este descubrimiento le concedieron el premio Nobel en 1908. Sin embargo, años más tarde no se utilizó más Salvarsan para tratar la sífilis ya que fue reemplazado por un producto mucho más efectivo, el antibiótico penicilina [54-55].



Esquema 6. Estructura del Salvarsan.

Durante 25 años no se obtuvieron avances en el descubrimiento de agentes antimicrobianos, pero en 1935 Gerhard Domagk (trabajando en Bayer) realizó un descubrimiento importante. Luego de llevar a cabo experimentos con más de mil colorantes sintéticos para comprobar si alguno de ellos podía curar las infecciones causadas por *Streptococcus* en ratones sin dañar a los animales, descubrió que un colorante rojo llamado Prontosil era efectivo (Esquema 7). Este descubrimiento le valió el premio Nobel en 1939. Curiosamente, este colorante no era capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias crecidas

en el laboratorio; solamente era efectivo cuando las bacterias crecían dentro del cuerpo del animal. Esta aparente contradicción fue resuelta en el mismo año por un químico francés Jacques Tréfouël al observar que el Protosil era transformado en el interior del cuerpo en un compuesto incoloro diferente el cual tenía actividad específica frente a bacterias. Esta nueva sustancia era la sulfonamida. En un corto período de tiempo se determinó su estructura siendo posible sintetizarla en gran escala y desarrollar nuevos compuestos que se denominaron sulfamidas que aún hoy en día se siguen utilizando [54-55].



Esquema 7. Estructura del Protosil.

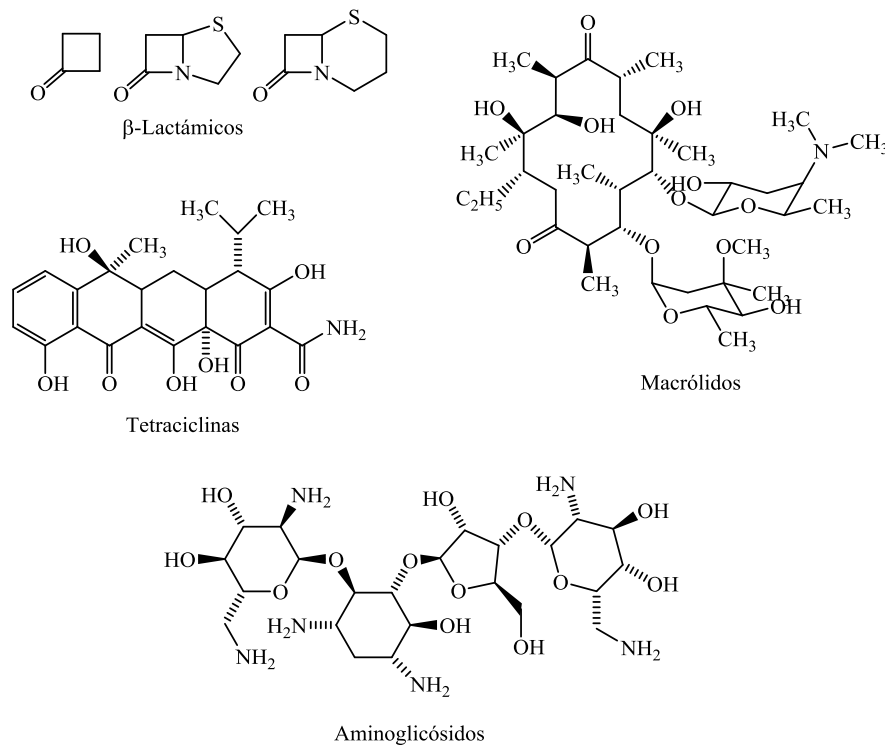
Entre una innumerable cantidad de agentes antimicrobianos existentes, tanto de origen natural como sintéticos, aquellas familias pertenecientes a antibióticos y antifúngicos son las que presentan el principal interés en este trabajo.

1.4.1. Agentes antibióticos

Los agentes antimicrobianos denominados antibióticos son aquellos capaces de matar o inhibir, a bajas concentraciones, el crecimiento de otros microorganismos, como las bacterias. [55,57-58].

Los antibióticos pueden clasificarse, además, según su estructura química en diferentes grupos, tales como β -lactámicos, macrólidos, aminoglicósidos, tetraciclinas, polipeptídicos, polienos, entre otros (Esquema 8) [54-55,59]. Su eficacia tóxica es la consecuencia de su capacidad de inhibir una reacción bioquímica específica y esencial para el microorganismo. Para que la acción del antibiótico se lleve a cabo, es necesario que dicha sustancia llegue al foco infeccioso, penetre en las bacterias (por difusión o transporte activo) y alcance intracelularmente la concentración necesaria. Una vez dentro de la célula el antibiótico puede ser bacteriostático, si inhibe la multiplicación bacteriana de forma reversible, o bactericida si tiene un efecto letal en el microorganismo. En general, cada grupo de antibióticos actúa preferentemente de una forma u otra [55-59]. Este tipo de compuestos pueden ejercer su acción en alguna de las siguientes estructuras o funciones: inhibición de la síntesis de la

pared celular, alteración sobre la membrana citoplásmica, inhibición de la síntesis proteica, bloqueo de la síntesis de los ácidos nucleicos, entre los más relevantes [55,59].



Esquema 8. Estructura química de diferentes familias de antibióticos.

En el año 1928 el científico británico Alexander Fleming descubre la penicilina, compuesto que generó una de las mayores revoluciones en el área de la medicina en el siglo XX (Figura 11). Fleming observó que en una placa de agar inoculada con *S. aureus* que estaba contaminada con el hongo *Penicillium notatum*, las colonias de *S. aureus* eran destruidas por alguna actividad de las colonias del hongo. A partir de este hongo se realizó la extracción de un compuesto que era el responsable del efecto inhibitorio al que llamó Penicilina. Debdio a este descubrimiento se logró controlar infecciones bacterianas, que hasta ese momento eran fatales y de esa manera contribuyó en mejorar la calidad de vida de la sociedad [55,58,60].

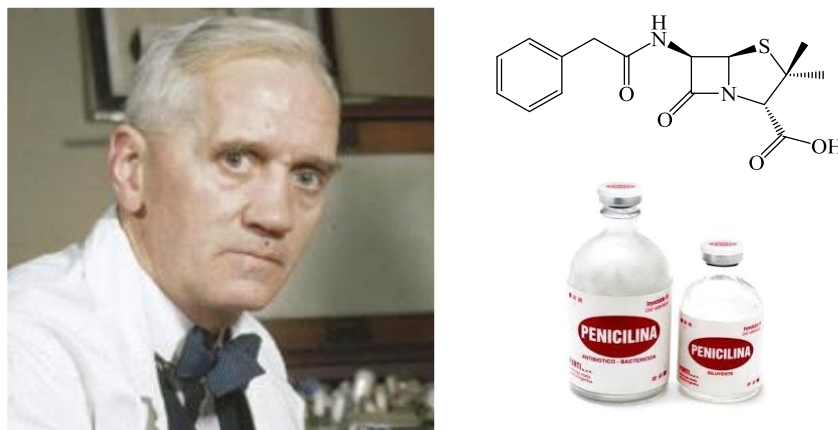


Figura 11. Alexander Fleming y la estructura de la penicilina.

A raíz de esto, se planteó en la población mundial la esperanza de que se generase la reducción de enfermedades de origen microbiológico hasta un nivel en el que ya no tendrían un gran impacto en la salud humana [58,61]. Con el correr de los años, comenzaron a aparecer nuevas cepas patógenas y cepas ya conocidas que presentaban resistencia a múltiples fármacos. Este efecto desencadenó diferentes cuestionamientos a la utilización de antibióticos como fármacos para la erradicación de enfermedades infecciosas [58,61].

Existen un gran número de mecanismos adoptados por las células microbianas para aumentar la resistencia a las agresiones externas, tales como la codificación de proteínas nuevas que imposibilitan la penetración de los fármacos, el engrosamiento de la pared externa, la aparición de mutantes deficientes en los canales porina que permiten la afluencia de productos químicos añadidos externamente [58,61].

Estos factores anteriormente mencionados desencadenaron el “final de la era de los antibióticos” y por consiguiente una serie de investigaciones con el objetivo de encontrar terapias alternativas al uso de antibióticos para combatir infecciones incurables o que presentan resistencia a los antibióticos ya conocidos. En este contexto, surge la PDI como terapia promisorio para el tratamiento de enfermedades infecciosas [15,17,58,60-61].

1.4.2. Agentes antifúngicos

La proliferación de enfermedades fúngicas se encuentra en constante crecimiento y evitarla resulta una trabajosa tarea, es por ello que se continúa con el desarrollo de antifúngicos nuevos cada vez más potentes. Cuando se intenta diseñar un fármaco para que actúe como antifúngico, es importante tener en cuenta la relación de su estructura-función, debido a que sobre la base de ellos se garantiza la muerte del hongo sin provocar graves daños al organismo hospedador [62].

Un agente antifúngico o antimicótico es cualquier sustancia capaz de producir una alteración en las estructuras de una célula fúngica. Debe conseguir la inhibición de su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, directa o indirectamente [62].

Existe un incremento en la incidencia de infecciones fúngicas debido al aumento de personas con factores de riesgo para padecerlas: pacientes inmunodeprimidos (tratamientos quimioterápicos oncológicos, trasplante de órganos, SIDA, pacientes sometidos a tratamiento esteroideo), el empleo de antibacterianos de amplio espectro y el mayor uso de procedimientos médicos invasores [63-64]. *Candida* es el microorganismo predominante en esas infecciones, siendo *C. albicans* la que ocasiona más de la mitad de los casos [64].

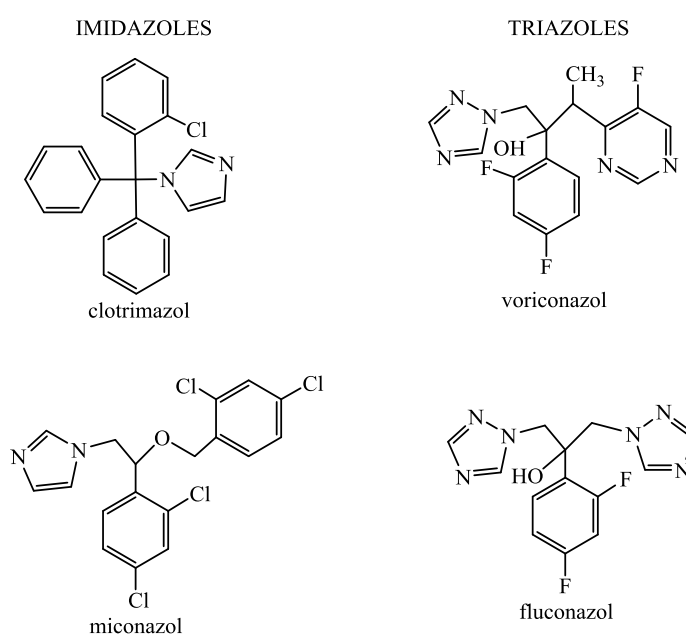
Los tratamientos antifúngicos en las últimas dos décadas se han basado en la utilización de amfotericina B, que genera un efecto tóxico, pero presenta un amplio espectro de acción y gran eficacia. En los 90' aparecieron los azoles que generaban mayor tolerabilidad, pero debido al incremento y a la constancia en su utilización favorecieron a la aparición de cepas resistentes [64]. Por ende, se torna necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos antifúngicos. Así, se ha investigado sobre nuevas fórmulas terapéuticas mejorando la estructura de los azoles para incrementar su actividad sobre los hongos y conseguir un mejor perfil de tolerabilidad en los mismos [64].

Los azoles son antifúngicos que actúan inhibiendo la actividad del citocromo P450 del hongo, uniéndose al grupo heme del citocromo y bloqueando la desmetilación de lanosterol a ergosterol, compuesto esencial de la membrana celular de hongos (levaduras) que regula la permeabilidad y fluidez de la pared. En levaduras, el ergosterol es el componente principal de las vesículas que participan en la producción de energía de la célula, por lo que se torna un componente vital en hongos y levaduras [65-68].

Los azoles representan la familia de antifúngicos más utilizadas y estudiadas; son antimicóticos fungistáticos sintéticos. En función de su contenido en nitrógeno se dividen en imidazoles (2 nitrógenos) y triazoles (3 nitrógenos) (Esquema 9). El fluconazol es un antifúngico sintético de la familia de los triazoles, es una alternativa terapéutica habitual en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas específicas. Además, es un inhibidor específico de la síntesis de esteroides en los hongos y su actividad ha sido demostrada contra micosis oportunistas, como las infecciones por especies de *Candida* e incluso candidiasis sistémica. El fluconazol también ha demostrado ser activo en animales con micosis

endémica, como infecciones por *Blastomyces dermatidis*, *Coccidioides immitis*, infecciones intracraneanas, y por *Histoplasma capsulatum* en animales normales e inmunocomprometidos. Dicho agente ejerce su acción alterando las propiedades de la membrana fúngica al inhibir la síntesis de ergosterol. Esta inhibición resulta en un incremento de la permeabilidad de la membrana causando la inestabilidad del microorganismo. Las propiedades farmacodinámicas del fluconazol son similares, ya sea que se lo administre al paciente por vía oral o intravenosa [65-68].

En su estructura, los azoles contienen un anillo imidazólico el cual es el responsable de la actividad del fármaco (Esquema 9). Las modificaciones estructurales en el diseño de fármacos se relacionan con la mayor especificidad de reacción por la enzima del hongo [65].



Esquema 9. Estructura química de azoles: imidazoles y triazoles.

La utilización de agentes antimicrobianos, tanto antibióticos como antifúngicos, ha contribuido de manera considerable para la erradicación de muchas enfermedades de orden infeccioso. Sin embargo, la constante aparición de cepas microbianas resistentes a los mismos ha permitido el avance de investigaciones hacia terapias alternativas como la PDI.

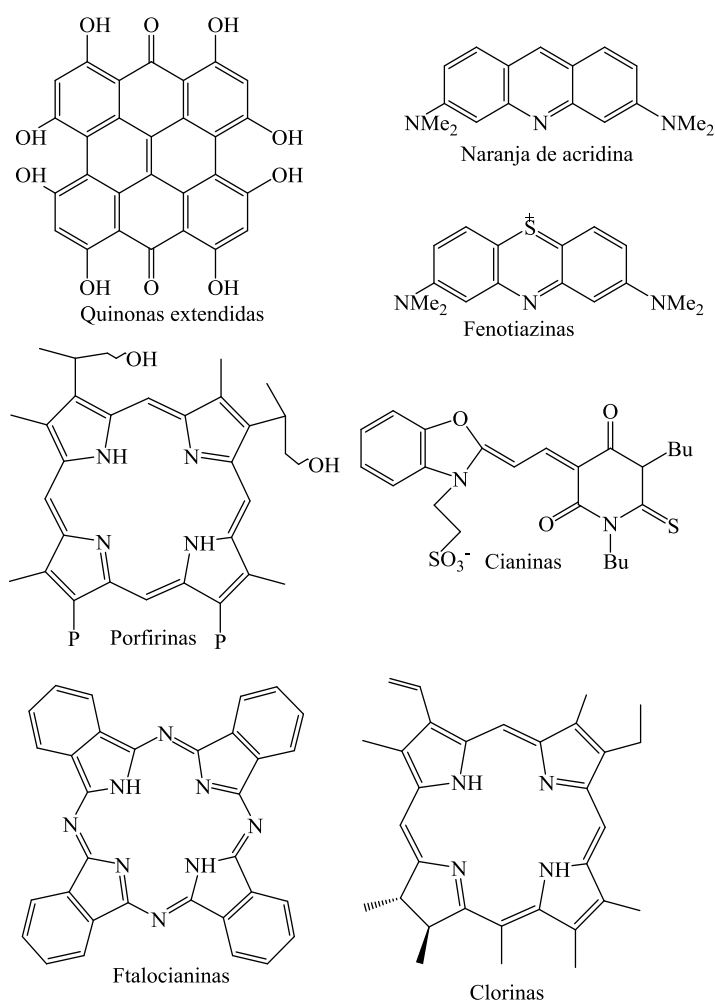
1.5. Agentes fototerapéuticos

Para las aplicaciones fotodinámicas en células pueden utilizarse diferentes familias de PSs que presenten amplia diversidad estructural. Sin embargo, estos agentes deben exhibir ciertas propiedades químicas, fotofísicas, fotoquímicas y biológicas [1,17,21]:

- Un proceso de síntesis adecuado.
- Elevada pureza química.
- Alta estabilidad.
- Alta absorción en la región del visible.
- Estado excitado triplete con un tiempo de vida largo para producir ROS eficientemente ($\tau_T > 1 \mu\text{s}$) [1,21].
- La energía del estado triplete debe ser mayor a 94 kJ/mol para lograr una eficiente transferencia de energía al estado fundamental del oxígeno.
- En solución, el PS debe encontrarse disuelto en estado monomérico (no asociado) para que su actividad fotodinámica sea más eficaz.
- Fotoestabilidad en las condiciones de tratamiento. Una velocidad de descomposición apropiada permitiría inactivar las células y luego eliminar el PS del medio disminuyendo el efecto fotocitotóxico remanente.
- Baja citotoxicidad en la oscuridad y alta selectividad por las células objetivo.

Dependiendo de la estructura química, los agentes fotodinámicos pueden clasificarse en quinonas extendidas, colorantes de acridinas, fenotiazinas, cianinas; porfirinas, clorinas y ftalocianinas (Esquema 10) [1].

Los compuestos derivados de las ftalocianinas presentan propiedades interesantes para ser aplicados como PSs en la PDT y en PDI de microorganismo [18,69-72]. En el presente trabajo se seleccionaron compuestos de la familia de ftalocianinas para ser estudiados en la fotoactivación celular.



Esquema 10. Estructura de agentes fotodinámicos.

1.6. Ftalocianinas

1.6.1. Características generales

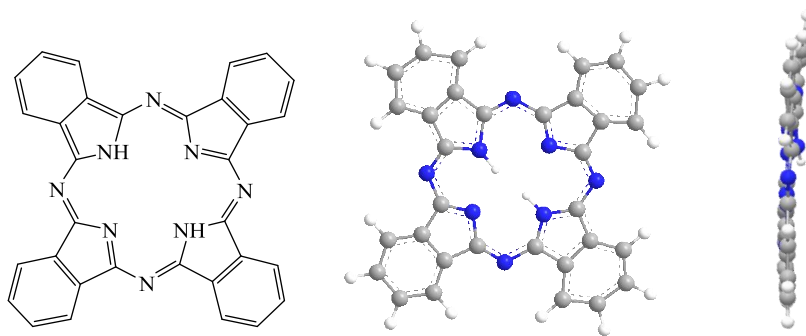
Alrededor de los años 1900s se descubrieron compuestos, como productos coloreados de la conversión química de algunos derivados de bencenos *orto*-di-sustituídos, que más tarde se denominaron ftalocianinas. La cadena de eventos, que finalmente condujo a la elucidación completa de la estructura de las ftalocianinas, comenzó en 1942 en la planta Grangemouth de Scottish Dyes Ltd, durante la preparación industrial de ftalamidas a partir de anhídrido ftálico [73].

Las ftalocianinas son compuestos derivados de macrociclos tetrapirrólicos, pertenecientes a la familia de las tetrabenzotetraazaporfirinas. Su mitad pirrólica está unida por nitrógenos aza a anillos bencénicos fusionados en los pirroles. Además, el macrociclo de la ftalocianina puede formar quelatos con diversos metales, tales como Zn(II), Cu(II) y

Si(IV), y sus anillos bencénicos pueden ser sustituidos por distintos grupos. Presentan, importantes características espectroscópicas y diversas propiedades de coordinación [24].

Dichos compuestos han sido utilizados extensamente como pigmentos y colorantes en la industria de la pintura, textil y en la del papel. Generalmente son estructuras de color azul-verde intenso, fotoestables, químicamente inertes e insolubles en muchos solventes. Son los únicos compuestos tetrapirrólicos utilizados como catalizadores industriales. Además, la importancia de las ftalocianinas y su potencial están en auge en diversos campos de estudio como electrocromismo, sensores químicos, semiconductores, compuestos poliméricos y terapia fotodinámica [32,73].

El campo amplio de aplicación que presentan las ftalocianinas se debe a su singular estructura química, estabilidad térmica y química, al alto grado de aromaticidad y a la existencia de diversas rutas sintéticas que son factibles de desarrollar para su obtención. Usualmente el macrociclo existe como di-anión Pc^{2-} y puede oxidarse o reducirse a diferentes estados de oxidación, además debido a dicha característica, puede formar o no quelatos con metales (por ej. Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+}) y se denominan metaloftalocianinas (MPc). Aquellas ftalocianinas sin formar complejos con metales (H_2Pc) en comparación con las MPc evidencian una baja eficiencia en PDT y PDI (Esquema 11) [73-74].



Esquema 11. Estructura general de la ftalocianinas.

Las ftalocianinas poseen propiedades fotofísicas importantes. El espectro de absorción de ftalocianinas (Figura 12) muestra dos bandas bien definidas: la banda Q con mayor intensidad ($\epsilon > 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a 600-700 nm, en la región de la ventana fototerapéutica y la banda B (Soret) en la región del ultravioleta (UV), a 350 nm. Las características de absorción de esta familia de compuestos son las responsables de la coloración azul-verdosa de las Pcs. En general, la banda Q presenta una sensibilidad particular a la sustitución y al ambiente del macrociclo, provocándose variaciones en la definición de dicha banda y corrimientos de la

misma. Las bandas Q son asignadas a las transiciones $\pi-\pi^*$ y presentan desdoblamientos para las H₂Pc mientras que son más definidas en las MPc [32,73].

Por otro lado, el espectro de Zn(II) ftalocianinas (ZnPc), muestra el patrón característico de complejos con metales, con una banda Q(0,0) intensa, desde el modo vibracional 0 del fundamental al vibracional 0 del primer estado electrónico excitado, Q(1,0) y Q(2,0) desde los estados vibracionales 1 y 2 del fundamental, respectivamente [32,73].

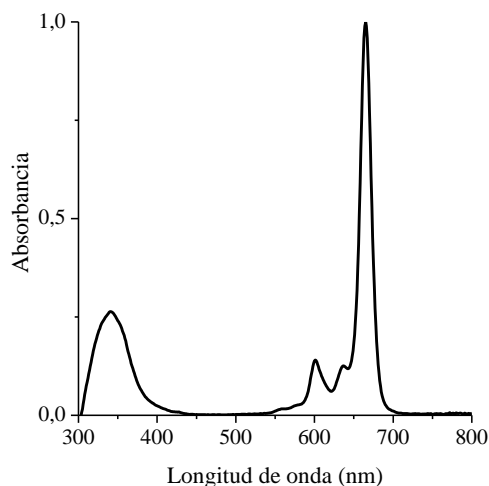


Figura 12. Espectro de absorción de ZnPc en THF.

La importancia de las ftalocianinas en terapia fotodinámica deriva de su alta producción de O₂(¹Δ_g). Estos complejos poseen baja toxicidad y tienden a localizarse en tejidos tumorales o dañados [75]. Por lo tanto, estos PSs tienen propiedades fotofísicas interesantes para utilizarse en PDT y son considerados unos de los PSs más efectivos [76,77].

Sin embargo, para la aplicación de estos complejos metalados como PS en PDT, la fotoestabilidad es una característica importante que deben poseer. Cuando se provoca la irradiación de las MPc, puede ocurrir la fotodegradación de la mismas observando así una disminución en la intensidad de las bandas en los espectros de absorción sin desplazamiento en los máximos o formación de nuevas bandas [73,76-77].

Una desventaja notoria de esta familia de compuestos es la baja solubilidad de sus derivados sin sustituir en medios polares. Esto puede deberse a la extrema hidrofobicidad del corazón aromático y a la planaridad que presentan, lo cual deriva en una alta estabilidad en la estructura cristalina. El grado de solubilidad de las ftalocianinas aumenta al adicionar grupos funcionales sustituyentes en los anillos bencénicos periféricos del macrociclo. Dicha sustitución provoca una gran variación en las propiedades físicas, químicas y electrónicas de

las ftalocianinas [32]. La relación hidrofobicidad/hidrofilicidad es importante cuando se considera la incorporación y la localización intracelular en los microorganismos. Por lo tanto, es conveniente variar las propiedades anfílicas de las ftalocianinas mediante la incorporación de grupos sustituyentes [78].

Otro de los principales inconvenientes encontrados en la utilización de estos compuestos, es la formación de agregados en solución. La agregación involucra asociación entre moléculas de soluto, que forman parte de una solución, a partir de unidades monoméricas. Los agregados pueden ser dímeros, trímeros, oligómeros o bien una mezcla de ellos. El fenómeno se origina cuando las interacciones entre moléculas de soluto son energéticamente más favorables que las interacciones entre moléculas de soluto y solvente. Existen dos tipos de agregación, una que involucra una interacción entre dos o más solutos diferentes (hetero-agregación) y otra que proviene de un único tipo de soluto (auto-agregación). Las moléculas pueden formar agregados cuando existen fuerzas intermoleculares no específicas, tales como van der Waals y dispersivas, como así también específicas como puente hidrógeno, interacciones π - π y aquellas que involucran especies dador-aceptor de electrones. En ftalocianinas con estructuras simples, las interacciones más importantes son las del tipo π - π (co-faciales) y generalmente es identificada por un corrimiento al azul en el espectro de absorción de la Pc. En el Esquema 12 se muestran las posibles geometrías involucradas en la formación de agregados de ftalocianinas [1,32,73,79-81].



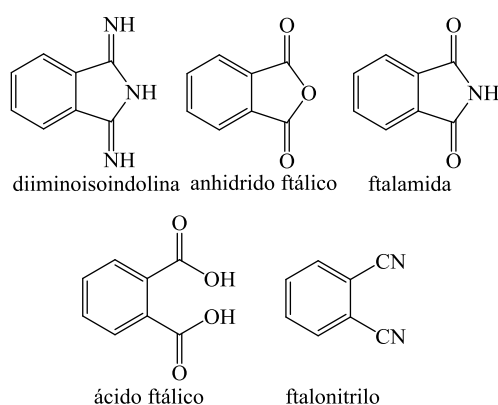
Esquema 12. Posibles geometrías de agregados de ftalocianinas.

La formación de agregados es un proceso reversible y el equilibrio es desplazado hacia los agregados por diferentes factores físicos como: disminución de la temperatura, incremento de la concentración, incremento de la polaridad del solvente y disminución del impedimento estérico [1]. Además, la formación de los mismos genera variaciones en los espectros de absorción y emisión de fluorescencia; disminución de los rendimientos cuánticos de fluorescencia; disminución en los valores de rendimientos cuánticos de producción de $O_2(^1\Delta_g)$ y disminución de la efectividad como PS [73,79-80].

La detección de la presencia de agregados en el sistema puede ser revelada mediante una desviación en la ley de Lambert-Beer; aumento en el ancho de los picos de absorción y la disminución en el coeficiente de absorción molar (ϵ) con el aumento de la concentración. Este tipo de comportamiento es característico de los agregados del tipo H y J los cuales están acompañados por la aparición de una nueva banda de absorción, en las proximidades de la banda Q [81]. La aparición de una banda cercana a los 750 nm es asignada a la formación de agregados del tipo J, mientras que una banda corrida hacia el azul, cercana a los 630 nm, es asignada a la formación de agregados tipo H [74]. En los dímeros tipo J los dipolos están en línea, mientras que en los agregados tipo H los dipolos de los macrociclos se encuentran paralelos [73-74,80].

1.6.2. Síntesis

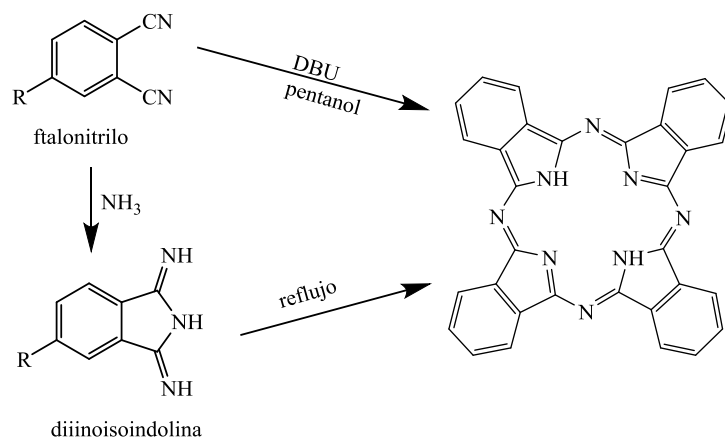
Los complejos de ftalocianinas son formados desde precursores, mediante una reacción de ciclotetramerización en presencia de un metal. Estos macrociclos pueden ser preparados desde derivados de los ácidos *orto*-dicarboxílicos aromáticos o bencenos *orto*-disustituídos, como lo son el ácido ftálico, ftalonitrilos, anhídridos ftálicos, ftalamidas y diiminoisindolinas (Esquema 13). La sustitución en la posición *orto*-, de los precursores, es un requisito previo definitivo y el más utilizado en el laboratorio de síntesis es el ftalonitrilo [32,73].



Esquema 13. Precursores de ftalocianinas.

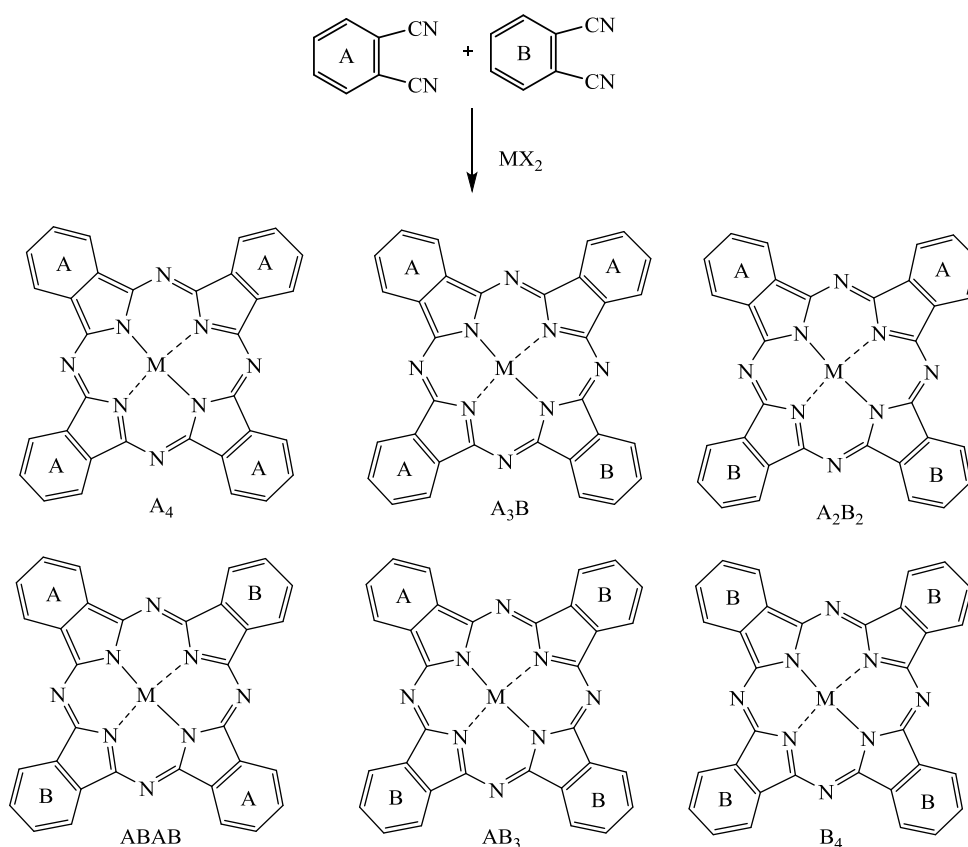
Las ftalocianinas que presentan sustitución poseen la característica de conservar la simetría en la molécula o carecer de la misma. En general, aquellas ftalocianinas de simetría A_4 (cuatro sustituyente iguales en la periferia del macrociclo) son sintetizadas mediante el método de ciclotetramerización de un único precursor, como los ftalonitrilos y las

diiminoisoindolinas. La ciclótetramerización de un ftalonitrilo en presencia de una base no nucleofílica impedida, como el 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), en pentanol, es una reacción muy eficiente. (Esquema 14) [32,73].



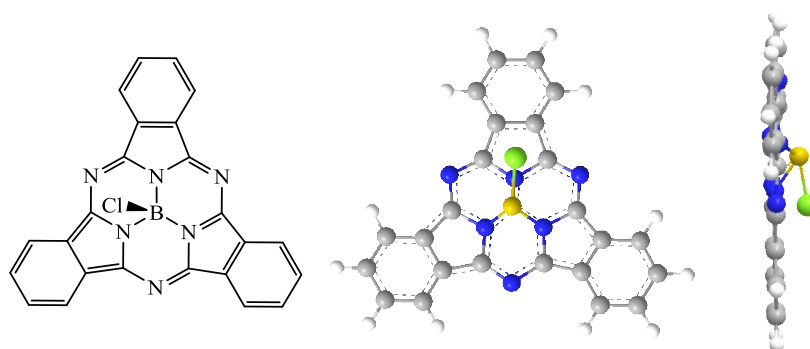
Esquema 14. Esquema de la reacción de ciclótetramerización.

Aquellas ftalocianinas que presentan baja simetría, pueden ser sintetizadas mediante la reacción de condensación estadística entre dos diferentes ftalonitrilos sustituidos o 1,3-diiminoisoindolinas (A y B), generando en principio una mezcla de seis compuestos. Esta ruta sintética demanda el uso de técnicas cromatográficas para el aislamiento de los macrociclos deseados, a partir de la mezcla estadística de los compuestos obtenidos (Esquema 15) [32,73].



Esquema 15. Esquema de la reacción de condensación estadística.

Además de la ruta de síntesis de la condensación estadística, la reacción de expansión del anillo de la subftalocianina (SubPc, Esquema 16) se presenta como una alternativa sintética promisoriosa para la obtención de Pcs de baja simetría [32].

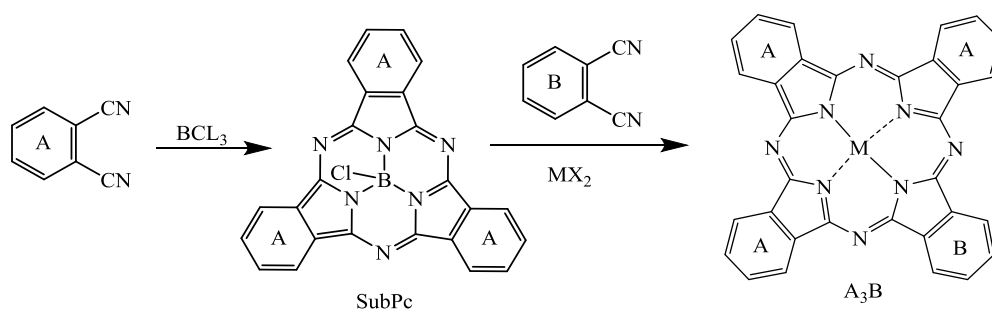


Esquema 16. Estructura general de las subftalocianinas.

En los años 1980s, Kobayashi *et al.*, descubrieron esta metodología, siendo el primer método de preparación selectiva de ftalocianinas con simetría A_3B [82]. La reacción involucra la expansión del anillo de las SubPcs, las cuales contienen boro (III) como metal central y su macrociclo presenta 14 electrones π deslocalizados. La reacción consta del

tratamiento de una SubPc con algún precursor de Pc (ftalonitrilos o diiminoisindolinas, por ejemplo), obteniendo de esta manera como producto final ftalocianinas de simetría A_3B exclusivamente [32].

Las SubPc son sintetizadas por la reacción de ftalonitrilo (A) con tricloruro de Boro (BCL_3) u otro derivado. La expansión del anillo se logra mediante la reacción de la SubPc, con simetría A_3 , con un ftalonitrilo sustituido (B) en presencia de la sal de un metal, obteniendo así ftalocianinas de simetría A_3B (Esquema 17) [32,72 ,83].



Esquema 17. Esquema de la reacción de expansión del anillo de las SubPc.

Tal como se mencionó en secciones anteriores, aquellos compuestos derivados de Pc que no presentan sustituciones en los anillos bencénicos periféricos, exhiben escasa solubilidades. Esta característica es de suma importancia cuando se considera la interacción, incorporación y localización en los microorganismos [78,84]. Sin embargo, este inconveniente puede subsanarse adicionando diferentes grupos funcionales, como sustituyentes en la periferia del macrociclo, lo que le otorgará al PS una mejora en sus propiedades físicas, químicas y electrónicas, y por ende mejorará su solubilidad [32].

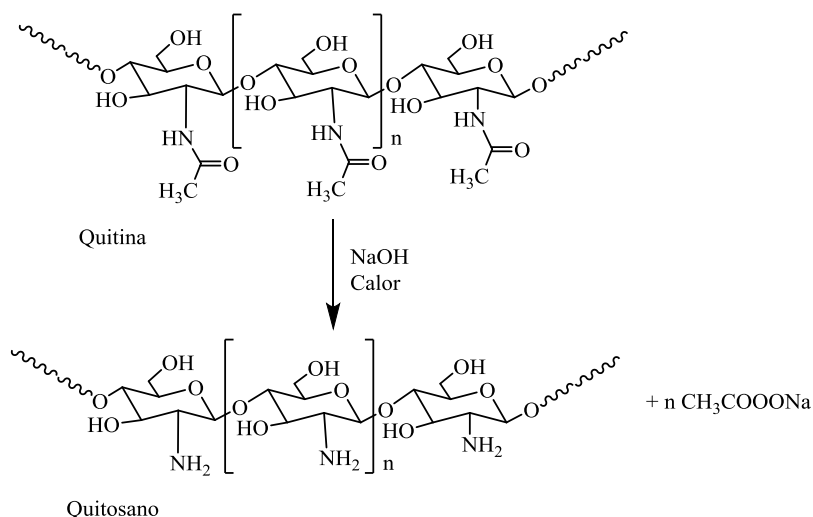
1.6.2.1. Conjugados de Pcs con polímeros

Los polímeros ofrecen la posibilidad de formar un material robusto en el que la orientación relativa de la unidad de ftalocianina contigua se puede controlar mediante una unión covalente, en lugar de las fuerzas intermoleculares no covalentes mucho más débiles. Dependiendo del modo en que los polímeros interactúan y se incorporan al macrociclo de la Pc, se clasifican según su estructura general como polímeros de red, co-faciales (o puenteados) y de cadena lateral. Dicha clasificación nace a partir del método de síntesis utilizado y de la forma en que el macrociclo tetrapirrólico interactúa con la estructura polimérica [73].

Debido a la baja solubilidad de las Pcs, como se mencionó anteriormente, la sustitución de los anillos bencénicos de la periferia del macrociclo mejora considerablemente la solubilidad del PS. Una alternativa viable para mejorar la solubilidad de los PSs en medios biológicos, es la unión electrostática o covalente a un polímero [85,86]. En particular, para el tratamiento de microorganismos es conveniente utilizar compuestos capaces de adquirir cargas positivas en el medio, tales como quitosano o poliaminas [84]. En estos conjugados, el polímero puede actuar como vehículo del PS hacia la célula objetivo mejorando la solubilización y la unión a los microorganismos. Además, los polímeros catiónicos pueden desestabilizar la envoltura celular de los microorganismos aumentando la inactivación celular y favoreciendo la acción fotodinámica de los PSs [84].

1.6.2.1.1. Quitosano

El quitosano (Q) es un polímero natural obtenido a partir de la quitina que es, después de celulosa, el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza. En la obtención de quitosano, la quitina es sometida a un proceso de hidrólisis en medio alcalino a altas temperaturas, donde sufre una deacetilación parcial (Esquema 18) [84,87]. A partir de la reacción de hidrólisis se pueden obtener diferentes tipos de Q, con grados disímiles de deacetilación (GDA) y pesos moleculares, razón por la cual es importante conocer el grado de acetilación del mismo. Los quitosanos con un GDA entre 75% y 85%, presentan un bajo peso molecular [88].



Esquema 18. Reacción de hidrólisis de quitina para obtener quitosano.

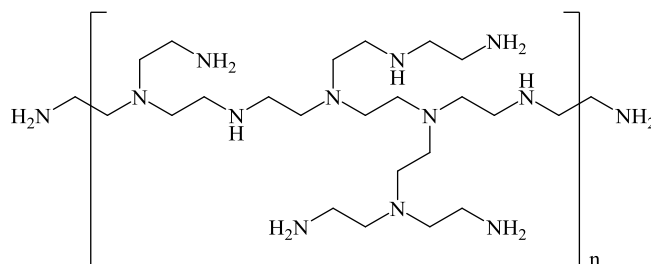
El Q presenta una amplia gama de aplicaciones en los campos de la biomedicina y de las industrias alimentarias, la agricultura y la ciencia ambiental, además de actividad

antibacteriana y antifúngica [84,87,88]. Las consideraciones clave que justifican este interés son que Q es biocompatible y biodegradable [84,87,88]. Este biopolímero hidrófilo con un gran número de grupos hidroxilo y amino libres se ha utilizado para numerosas modificaciones químicas [87]. Los grupos aminos libres del Q dependiendo el medio en donde se encuentren, presentan la posibilidad de protonarse considerándolo así, un polímero catiónico. Esta propiedad importante del Q permite que en medio acuoso pueda interactuar con las membranas celulares incrementando su permeabilidad. Esto es debido a la interacción de los grupos carbonilos y fosforilos de los fosfolípidos que componen las membranas celulares y los grupos NH_3^+ del Q [84,87,89].

1.6.2.1.2. Poliaminas

Las poliaminas son compuestos naturales que juegan un papel multifuncional importante en los procesos celulares tales como, la proliferación y la diferenciación celular. Si bien estas moléculas pueden ser biosintetizadas por las células, también pueden ser incorporadas desde fuentes exógenas. Estas características, además, han llevado al uso de poliaminas como vectores potentes para la liberación selectiva de fármacos [90].

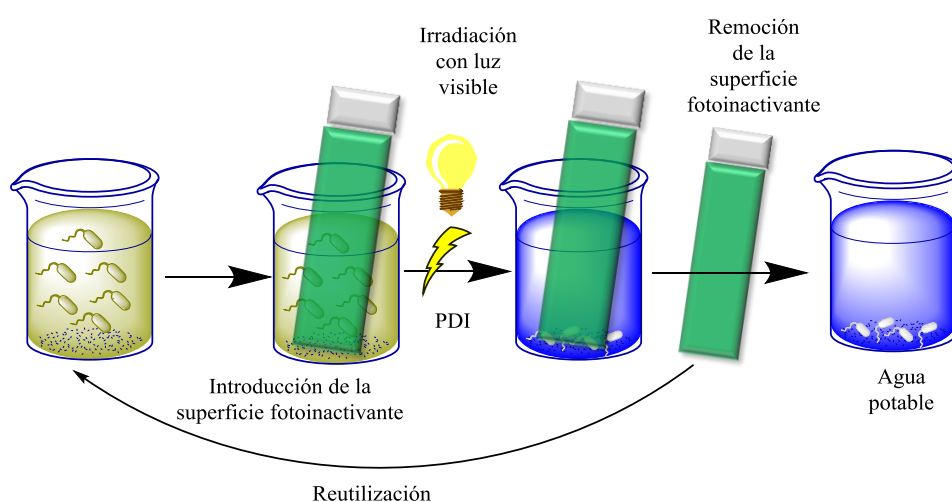
Una gran cantidad de conjugados de poliaminas con fármacos citotóxicos han sido estudiados, debido a que en la mayoría de los casos mejora la selectividad del fármaco y su citotoxicidad [90-91]. La polietilenimina (PA) (Esquema 19) presenta una numerosa cantidad de grupos amino alifáticos libres que pueden adquirir cargas positivas a pH fisiológico. Además, las cadenas alifáticas confieren mayor movilidad y flexibilidad a las cargas, pudiendo mejorar la interacción del fotosensibilizador con las células [91]. Por otra parte, las poliaminas interactúan con el resto fosfato de los ácidos nucleicos por interacción electrostática y por enlaces de hidrógeno [92].



Esquema 19. Estructura química de la polietilenimina.

1.6.2.2. Películas poliméricas fotoactivas para la PDI de microorganismos

En su mayoría, los estudios en PDI son llevados a cabo en suspensiones microbianas mediante la adición de un agente fotodinámico y posterior tratamiento con luz. Una de las principales desventajas ocasionadas por este tipo de procedimientos es que luego del mismo, pequeñas trazas del PS pueden permanecer en el medio conduciendo a efectos fotodinámicos remanentes indeseados [93]. Una alternativa viable para evitar estos inconvenientes, es la utilización de soportes poliméricos como superficies para la inmovilización de PS. Este tipo de materiales evitaría la acumulación del fotosensibilizador en el medio y además permitiría la reutilización del polímero fotodinámico [94] (Esquema 20).



Esquema 20. Ilustración de la utilización de superficies poliméricas dopadas con PS para la descontaminación de aguas mediante PDI.

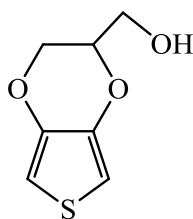
Una opción abarca por ejemplo la utilización de apósitos asépticos. En este sentido, se propusieron parches bioadhesivos con el ácido 5-aminolevulínico (ALA) para el tratamiento de onicomosis y con azul de toluidina (TBO) para candidiasis orofaríngea, los cuales pueden ser removidos luego del tratamiento fotodinámico [95-96]. Se prepararon además, películas fotoactivas de polisilsesquioxano dopadas con un derivado de porfirina [95]. Estudios del mecanismo de acción fotodinámica proporcionan evidencia de que el $O_2(^1\Delta_g)$ producido por las películas produce la inactivación de *C. albicans*. Por otro lado, estudios previos han demostrado que superficies formadas a partir de la electropolimerización de moléculas Pcs pueden emplearse para la fotoinactivación de microorganismos en aguas contaminadas y para el recubrimiento de áreas asépticas activadas por luz visible [97].

Los derivados de ftalocianinas presentan oportunidades propicias para el desarrollo de nuevos materiales entre los que se encuentran los materiales electrocrómicos. Éstos,

presentan variaciones de color cuando son sometidos a procesos de oxidación o reducción, mediante la aplicación de un voltaje externo. Este efecto se manifiesta mediante un cambio en la respuesta óptica de los electro-cromóforos en la región visible del espectro de absorción. Un ejemplo de esta clase de materiales son las MPc, las cuales en general son de color verde [98-100]. Una modificación de estos compuestos con diferentes iones metálicos o sustituyentes varía la coloración de los complejos resultantes [98,101-102].

Además, un cambio en la estructura de los grupos electropolimerizables ubicados en la periferia de los macrociclos, permite la formación de películas con propiedades ópticas de interés (propias de las MPc) sobre diferentes sustratos [73]. La sustitución de ftalocianinas con grupos electroactivos, tales como hidroximetil-EDOT (EDOT), es una opción adecuada para la generación de superficies mediante la electropolimerización sobre una superficie semiconductor transparente a la luz visible [103].

Entre los polímeros generados electroquímicamente, los derivados del poly(3,4-etilenedioxitiofeno) como el hidroximetil-EDOT (EDOT, Esquema 21) han recibido cierto interés científico-tecnológico en los últimos años, debido a la alta conductividad y estabilidad propia que posee para formar películas homogéneas y estables [103-105]. La generación de películas electroconductoras con metaloftalocianinas sustituidas con PEDOT es una prometedora manera de obtención de este tipo de materiales. Aquellas ftalocianinas que poseen EDOT (Esquema 21) en la periferia del macrociclo, presentan rendimientos electrocrómicos en solución y en dispositivos de estado sólido comparables o superiores a los ya informados para ftalocianina que contiene PEDOT [103]. Las metaloftalocianinas que contienen como metal central cinc (ZnPc) y cobre (CuPc) sustituidas con grupos EDOT, tienen una potencial aplicación en el diseño de nuevos dispositivos electrocrómicos como es el caso de ventanas inteligentes, sensores, pantallas y almacenamiento de datos [100,103,105-106]. Estas películas pueden producir ROS cuando son irradiadas con luz visible y ser utilizadas como superficies para la erradicación de microorganismos.



hidroximetil-EDOT

Esquema 21. Estructura química del EDOT.

Capítulo 2- OBJETIVOS

2 Objetivos

2.1. Objetivo general

Desarrollar nuevos agentes fotosensibilizadores derivados de ftalocianinas con aplicaciones en la inactivación fotodinámica (PDI) de microorganismos.

2.2. Objetivos específicos

- a) Sintetizar nuevas ftalocianinas anfífilas sustituidas asimétricamente en la periferia del macrociclo con grupos catiónicos para la inactivación fotodinámica de microorganismos.
- b) Sintetizar nuevos conjugados de ftalocianinas con polímeros precursores catiónicos para la inactivación fotodinámica de microorganismos.
- c) Sintetizar ftalocianinas para la formación de películas poliméricas, sustituidas simétricamente en la periferia del macrociclo por grupos EDOT (EDOT-Pc), a partir de derivados de ftalonitrilos previamente sustituidos.
- d) Preparar películas antimicrobianas con agentes fotosensibilizadores inmovilizados sobre un soporte polimérico mediante electropolimerización.
- e) Caracterizar espectroscópicamente y analizar las propiedades fotodinámicas y producción de $O_2(^1\Delta_g)$ de los agentes fotosensibilizadores sintetizados.
- f) Investigar el mecanismo de acción fotodinámico predominante en la descomposición de sustratos el medio homogéneo.
- g) Evaluar los efectos de PDI producidos por los PS sintetizados en cultivos celulares planctónicos de *C. Albicans*, *S. aureus* y *E. coli*.
- h) Evaluar los efectos de PDI producidos por los PS sintetizados en biopelículas celulares de *C. Albicans* y *S. aureus*.
- i) Determinar la unión de los PS catiónicos sintetizados en células de *C. Albicans*, *S. aureus* y *E. coli* bajo diferentes condiciones experimentales.

Capítulo 3 - METODOLOGÍA

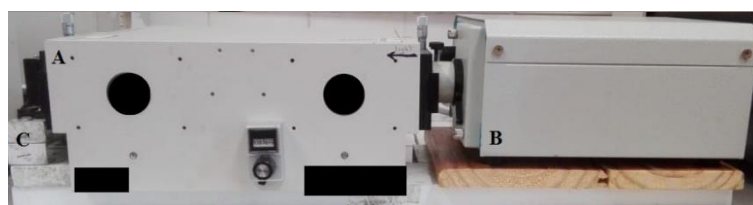
3 Metodología

3.1. Equipamiento general

Las medidas espectroscópicas de absorbancia UV-visible y fluorescencia se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC (Shimadzu Corporation, Tokio, Japón) y en un fluorómetro Spex FluoroMax (Horiba Jobin Yvon Inc, Edison, NJ, E.E.U.U.), respectivamente. Los espectros se midieron utilizando una celda de cuarzo con paso óptico de 1 cm.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H NMR) se obtuvieron en un espectrómetro multinuclear FT-NMR Bruker Avance DPX400 a 400 MHz. Los espectros de masa (MS) se tomaron con un Bruker MicroQTOFII (Bruker Daltonics, MA, E.E.U.U.) equipado con una fuente de ionización a presión atmosférica (APPI). La espectroscopía infrarroja (FT-IR), se midieron con un Bruker Tensor (Ettlingen, Alemania). Los análisis de cromatografía gaseosa acoplada a masa se realizaron en un GC-MS 5890 Series Gas Chromatograph Hewlett Packard equipado con una columna HP-5 Crosslinked 5% PH ME Silicone (30 x 0,32 mm x 0,25 μm Film Thickness, Hewlett Packard), en las cromatografías en capa fina (TLC) se corrieron en Uniplate Silica gel GHLF de 250 μ de Analtech (Newark, DE, E.E.U.U.). Las cromatografías en columna flash se utilizó gel de sílice (70-230 mesh, Merck Darmstadt, Alemania).

El sistema de irradiación utilizado para la fotooxidación de sustratos en medio homogéneo constó de un equipo Cole-Parmer illuminator 41720-series (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, E.E.U.U.) equipado con una lámpara halógena de 150 W (A), acoplado a un monocromador (B) (Photon Technology Instrument, Birmingham, NJ, E.E.U.U.) (Esquema 22). Para este sistema, ocasionalmente, se utilizó una cubeta de agua de 2,5 cm de ancho que actuó como filtro para absorber el calor de la lámpara.

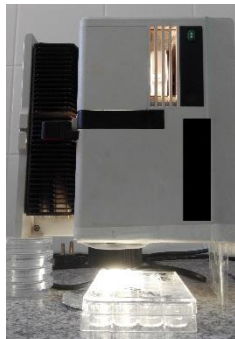


Esquema 22. Sistema de irradiación: monocromador (A), lámpara halógena de 150 W (B) y porta celda de cuarzo (C).

En los sistemas biológicos se utilizó como sistema de irradiación un proyector Novamat 130 AF (Braun Photo Technik, Nürnberg, Alemania) equipado con una lámpara de halógeno

de 150 W, dispuesto en diferentes configuraciones. La intensidad de la luz en el sitio de tratamiento de 30 mWcm^{-2} se determinó con un equipo Radiometer Laser Mate-Q Coherent (Santa Clara, CA, E.E.U.U.,

Esquema 23).



Esquema 23. Sistema de irradiación: lámpara halógena de 150 W, suspensión celular planctónica de microorganismos en policubeta.

3.2. Reactivos y solventes

Los reactivos químicos acetato de cobre (II) dihidratado ($\text{Cu}(\text{Ac})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), acetato de cinc(II) dihidratado ($\text{Zn}(\text{Ac})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), alcohol 4-(trifluorometil)benzílico, 2,2'-(antraceno-9,10-diil)bis (metilmalonato) de tetra sodio (ABMM), azida de sodio (NaN_3), azul de nitrotetrazolio (NBT), bromuro de potasio (KBr), buffer fosfato salino (PBS), carbonato de potasio (K_2CO_3), cloruro de subftalocianina de boro (SubPc), 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 9,10-dimetilantraceno (DMA), D-manitol, dodecil sulfato sódico (SDS), ferroceno, hexafluorofosfato de tetrabutilamonio, hidróxido de potasio (KOH), hidroximetil-EDOT, yoduro de metilo (CH_3I), yoduro de potasio (KI), L-Triptófano (L-Trp), metil 4-hidroxibenzoato, 2,3-naftalendicarbonitrilo, *N*-hidroxisuccinimida (NHS), nicotinamida adenina dinucleótido (β -NADH), 4-nitroftalonitrilo, polietilenimina (PA), quitosano (Q) (85%), sulfuro de sodio ($\text{Na}_2\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$) y tricloruro de boro (BCl_3 , solución 1.0 M en *p*-xileno) provenientes de Aldrich se usaron sin purificación adicional.

Los solventes utilizados fueron *N,N*-dimetilformamida (DMF), diclorometano (DCM), ciclohexano, metanol, tolueno, dimetilsulfósido (DMSO), cloroformo- d_6 (CDCl_3-d_6) dimetilsulfósido- d_6 ($\text{DMSO}-d_6$), agua HPLC, agua, éter etílico, *n*-pentanol, *n*-heptano, ácido clorhídrico (ClH) y tetrahidrofurano (THF) provenientes de Sintorgan, se utilizaron sin purificación adicional.

3.3. Síntesis de ftalocianinas

3.3.1. Síntesis de ftalocianinas catiónicas

3.3.1.1. Cloro [2,9(10),16(17)-trinitrosubftalocianinato] boro(III) (SubNPc)

Una solución de 4-nitroftalonitrilo (1,73 g, 10 mmol) y BCl_3 (3 mL de una solución 1 M en *p*-xileno) se agitó bajo atmósfera de argón en un baño a 120 °C durante 2 h. La reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente. El producto se lo lavó con ciclohexano y se secó a vacío obteniendo 132 mg (70%). La caracterización de SubNPc se encuentra en bibliografía [107].

3.3.1.2. 4-((4'-trifluorometilbezil)oxi)ftalinitrilo ($\text{CF}_3\text{-Pn}$)

Una solución de 4-nitroftalonitrilo (433 mg, 2,5 mmol) y alcohol 4-(trifluorometil)benzílico (500 mg, 2,84 mmol) en 15 mL DMF, en presencia de K_2CO_3 (1,2 g, 8,68 mmol), se agitó bajo atmósfera de argón, a una temperatura de 70 °C durante 3 h. La solución se extrajo con agua/DCM (1:1, 50 mL), repitiendo el procedimiento tres veces con DCM (25 mL). Se separó la fase orgánica y el solvente se evaporó bajo presión reducida. El producto se purificó mediante cromatografía en columna *flash* utilizando DCM como solvente eluyente y se obtuvo 450 mg (60%) de $\text{CF}_3\text{-Pn}$. Los datos espectroscópicos coinciden con los publicados previamente [108].

3.3.1.3. Cinc (II) 2-[(trifluorometilbezil)oxi]-9(10),16(17),23(24)-tris(nitro) ftalocianina ($\text{CF}_3\text{N}_3\text{-ZnPc}$)

Una solución de 4-((4'-trifluorometilbezil)oxi)ftalonitrilo ($\text{CF}_3\text{-Pn}$) (54 mg, 0,18 mmol), 12 μL (0,12 mmol) de DBU y 2 mL DMSO se calentó a 130 °C con agitación constante bajo atmósfera de argón. Se le adicionó durante 20 min, una suspensión de SubNPc (58 mg, 0,10 mmol), $\text{Zn}(\text{Ac})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (26,4 mg, 0,12 mmol) en 2 mL de DMSO. La reacción se llevó a cabo a 130 °C durante 1 h. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se precipitó con agua. El producto se lavó con metanol y ciclohexano, obteniendo 16 mg (18%) de $\text{CF}_3\text{N}_3\text{-ZnPc}$. $^1\text{HNMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm]: 5,40 (s, 2H); 7,52 – 7,58 (dd, 2H); 7,66 – 7,72 (d, 4H); 7,76 – 7,82 (d, 4H), 7,87 – 7,91 (d, 2H), 7,94 – 7,97 (s, 2H), 8,06 – 8,11 (d, 2H). ESI-MS [m/z]: 886,0718 ($\text{M}+\text{H}^+$) (885,0634 calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_{11}\text{O}_7\text{Zn}$).

3.3.1.4. Cinc (II) 2-[(trifluorometilbezil)oxi]-9(10),16(17),23(24)-tris(amino) ftalocianina ($\text{CF}_3(\text{NH}_2)_3\text{-ZnPc}$)

Una solución de $\text{CF}_3\text{N}_3\text{-ZnPc}$ (99 mg, 0,109 mmol) y $\text{Na}_2\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (4 g, $\approx 16,7$ mmol) en 5 mL de DMF, se agitó a 60 °C durante 5 h. La mezcla se precipitó con 150 mL de agua, se

centrifugó y se lavó con agua. El producto se secó a vacío produciendo 60 mg (0,07 mmol, 65%) de $\text{CF}_3(\text{NH}_3)_3\text{-ZnPc}$. $^1\text{HNMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm]: 5,36 (s, 2H); 7,11 – 7,41 (m, 4H); 7,65 – 7,73 (m, 4H); 7,75 – 7,81 (m, 4H); 7,91 – 7,98 (m, 4H). FT-IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}), 3438 (N–H), 2974 – 2918 – 2848 (C–H), 1602 (C=N), 1488, 1253 (Ar–O), 1124, 1068 (Zn–N), 1001, 881, 829, 676, 650, 632. ESI-MS [m/z]: 796,1487 ($\text{M}+\text{H}$)⁺ (795,1409 calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_{11}\text{OZn}$).

3.3.1.5. Cinc (II) 2-[(trifluorometilbezil)oxi]-9(10),16(17),23(24)-tris(N,N,N-trimetilamonio)ftalocianina ($\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$)

Una mezcla de $\text{CF}_3(\text{NH}_2)_3\text{-ZnPc}$ (22,5 mg, 0,028 mmol), ICH_3 (2 mL) y DMF (2 mL) se agitó bajo atmósfera inerte en un baño a 60 °C durante 72 h. Luego se dejó enfriar la reacción hasta que alcanzó temperatura ambiente y el solvente se evaporó a presión reducida. El producto se lavó con ciclohexano y éter etílico, obteniéndose 24 mg (0,026 mmol, 93 %) de $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$. $^1\text{HNMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm]: 3,12 (s, 27H), 5,39 (s, 2H); 7,52 – 8,15 (m, 16H). FT-IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}), 3020 – 2995 – 2775 (C–H), 1662, 1461, 1417, 1257 (Ar–O), 1018 (Zn–N), 856. ESI-MS [m/z]: 925,3130 ($\text{M}+\text{H}$)⁺ (924,3041 calculado para $\text{C}_{49}\text{H}_{45}\text{F}_3\text{N}_{11}\text{OZn}^{3+}$).

3.3.1.6. Cinc (II) 2,3-(1,3-buta-1,3-dienil)-9(10),16(17),23(24)-tris(nitro)ftalocianina ($\text{AN}_3\text{-ZnPc}$)

Una mezcla de 2,3-naftalendicarbonitrilo (32 mg, 0,18 mmol), 12 μL (0,12 mmol) de DBU y 2 mL DMSO se calentó a 130 °C con agitación constante bajo atmósfera de argón. Luego, se adicionó durante 20 min, una suspensión de SubNPc (58 mg, 0,10 mmol), $\text{Zn}(\text{Ac})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (26,4 mg, 0,12 mmol) en 2 mL de DMSO. La reacción se llevó a cabo a 130 °C durante 1 h. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se precipitó con agua (25 mL). El producto se lavó con metanol (25 mL) y ciclohexano (25 mL), obteniendo 15 mg (20 %) del producto puro. $^1\text{HNMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm]: 7,62 – 7,78 (m, 2H); 7,88 – 8,02 (m, 5H); 8,14 – 8,25 (m, 4H), 8,84 – 8,94 (m, 4H). ESI-MS [m/z]: 762,0576 ($\text{M}+\text{H}$)⁺ (761,0498 calculado para $\text{C}_{36}\text{H}_{15}\text{N}_{11}\text{O}_6\text{Zn}$).

3.3.1.7. Cinc (II) 2,3-(1,3-buta-1,3-dienil)-9(10),16(17),23(24)-tris(amino)ftalocianina ($\text{A}(\text{NH}_2)_3\text{-ZnPc}$)

Una mezcla de $\text{AN}_3\text{-ZnPc}$ (127 mg, 0,16 mmol) y $\text{Na}_2\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ en exceso (4 g, $\approx 16,7$ mmol) en 5 mL de DMF se hizo reaccionar durante 5 h a 60 °C. La solución se precipitó con 150 mL de agua, se centrifugó y se lavó con agua. El producto se secó a vacío produciendo

68 mg (0,1 μmol , 61%) de $\text{A}(\text{NH}_2)_3\text{-ZnPc}$. FT-IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}), 3417 (N–H), 2922 – 2227 (C–H), 1608 (C=N), 1494, 1141, 1001, 754. ESI-MS [m/z]: 672,1351 ($\text{M}+\text{H}$)⁺ (671,1273 calculado para $\text{C}_{36}\text{H}_{21}\text{N}_{11}\text{Zn}$). ¹HNMR ($\text{DMSO-}d_6$) no se observan picos definidos debido a que la muestra se encuentra principalmente agregada en este medio.

3.3.1.8. Cinc (II) 2,3-(1,3-buta-1,3-dienil)-9(10),16(17),23(24)-tris(N,N,N-trimetilamonio)ftalocianina ($\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$)

La obtención de $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ se realizó siguiendo el mismo procedimiento de síntesis de $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$. Una solución de $\text{A}(\text{NH}_2)_3\text{-ZnPc}$ (18 mg, 0,027 mmol), ICH_3 (2 mL) y DMF (2 mL) se agitó en atmósfera inerte en un baño a 60 °C durante 72 h. La reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente. El solvente se evaporó a presión reducida y el producto se lavó con ciclohexano y con éter etílico. Se obtuvo 20 mg (0,025 mmol, 95 %) de $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$. ¹HNMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm]: 2,87 (s, 27H), 7,86 – 8,54 (m, 15H). FT-IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}), 3020 – 2989 – 2773 (C–H), 1660, 1460, 1417,1261, 1016 (Zn–N), 856. ESI-MS [m/z]: 801,2994 ($\text{M}+\text{H}$)⁺ (800,2900 calculado para $\text{C}_{45}\text{H}_{42}\text{N}_{11}\text{Zn}^{3+}$).

3.3.1.9. Cinc (II) 2,9(10),16(17),23(23)-tetrakis(nitro)ftalocianina ($\text{N}_4\text{-ZnPc}$)

Una mezcla de 4-nitroftalonitrilo (58,1 mg, 0,33 mmol) y acetato de cinc (II) dihidratado ($\text{Zn}(\text{Ac})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (30 mg, 0,14 mmol) en 5 mL de *n*-pentanol se agitó por 10 min bajo atmósfera de argón. Luego, 86 μL (0,57 mmol) de DBU se añadió a la mezcla y se llevó a reflujo por 24 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se trató con agua (50 mL) y se extrajo con tres porciones de 25 mL de DCM. Se separó la fase orgánica, el solvente se evaporó bajo presión reducida y el producto se precipitó con *n*-heptano. El sólido de color verde-azulado se lavó con *n*-heptano, produciendo 30 mg (48%) de $\text{N}_4\text{-ZnPc}$. La estructura de $\text{N}_4\text{-ZnPc}$ se confirmó mediante estudios espectroscópicos y coinciden con los publicados anteriormente [109].

3.3.1.10. Cinc (II) 2,9(10),16(17),23(24)- tetrakis(amino)ftalocianina ($(\text{NH}_2)_4\text{-ZnPc}$)

Una solución de N_4ZnPc (98 mg, 0,13 mmol) reaccionó con un exceso de $\text{Na}_2\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (4 g, $\approx 16,7$ mmol) en 5 mL de DMF durante 5 h a 60 °C. La mezcla de reacción se precipitó con 150 mL de agua, se centrifugó y se lavó con agua. El producto se secó a vacío produciendo 45 mg (0,07 mmol, 54%) de $(\text{NH}_2)_4\text{-ZnPc}$. La caracterización de $(\text{NH}_2)_4\text{-ZnPc}$ se confirmó mediante estudios espectroscópicos y coincide con lo publicado en bibliografía [102].

3.3.1.11. *Cinc (II) 2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis(N,N,N-tetrametilamonio)ftalocianina ((NM₃)₄-ZnPc⁴⁺)*

Una solución de (NH₂)₄-ZnPc (10 mg, 0,015 mmol), CH₃I (2 mL) y DMF (2 mL) se agitó en atmósfera inerte en un baño a 60 °C durante 72 h. La reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente. El solvente se evaporó a presión reducida y el producto se lavó con ciclo hexano. Se obtuvo 12 mg (0,015 mmol, 98%) de (NM₃)₄-ZnPc⁴⁺. ¹HNMR (DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 3,12 (s, 36H), 7,94 – 8,34 (m, 12 H). FT-IR (KBr) ν_{máx} (cm⁻¹), 3022 – 2989 – 2773 (C–H), 1461, 1404, 1255, 1016 (Zn–N), 856. ESI-MS [m/z]: 809,3495 (M+H)⁺ (808,3394 calculado para C₄₄H₄₈N₁₂Zn⁴⁺).

3.3.2. Síntesis de conjugados de ftalocianinas con polímeros precursores catiónicos

3.3.2.1. 2-[carbometoxifenoxi]ftalonitrilo (Bn-Pn)

Una solución de 4-nitroftalonitrilo (346 mg, 2 mmol) reaccionó con metil 4-hidroxibenzoato (385 mg, 2,5 mmol) y carbonato de potasio (K₂CO₃) (600 mg, 4,3 mmol) en presencia de 10 mL de DMF durante 3 h a 30 °C. La mezcla de reacción se precipitó con 150 mL de agua, se centrifugó, se lavó con agua y posteriormente con metanol. El producto se purificó mediante cromatografía en columna flash (sílica gel, DCM) obteniendo 390 mg (1,4 mmol, 73 %) de Bn-Pn. ¹HNMR (CDCl₃-*d*₆) δ [ppm]: 3,95 (s, 3H), 7,13 (d, 2H, J = 8,7 Hz), 7,30 (dd, 1H, J = 2,5 Hz, 8,5 Hz), 7,35 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 7,77 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 8,15 (d, 2H, J = 8,7 Hz). ESI-MS [m/z]: 279,0725 (M+H)⁺ (278,0691 calculado para C₁₆H₁₀N₂O₃).

3.3.2.2. *Cinc (II) 2-[carbometoxifenoxi]ftalocianina (Bn-ZnPc)*

Una mezcla de 2-[carbometoxifenoxi]ftalonitrilo (Bn-Pn) (100 mg, 0,36 mmol), 12 μL (0,12 mmol) de DBU y 2 mL DMSO se calentó a 130 °C con agitación constante bajo atmósfera de argón. Luego, se le adicionó durante 20 min, una suspensión de SubPc (86 mg, 0,2 mmol), Zn(Ac)₂·2H₂O (43,9 mg, 0,2 mmol) en 2 mL de DMSO. La reacción se llevó a cabo a 130 °C durante 1 h. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se precipitó con agua. El producto se lavó con metanol y ciclohexano, obteniendo 41,8 mg (23 %). ¹HNMR (CDCl₃-*d*₆) δ [ppm]: 3,94 (s, 3H), 7,12 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 7,28-7,44 (m, 2H), 7,74-8,12 (m, 13H), 8,15 (d, 2H, J = 8,8 Hz). ESI-MS [m/z]: 728,0490 (M+H)⁺ (726,1106 calculado para C₄₀H₂₂N₈O₃Zn).

3.3.2.3. *Cinc 2-[carboxifenoxi]ftalocianina (A-ZnPc)*

Una solución de *Bn-ZnPc* (100 mg, 0,14 mmol) en tetrahidrofurano/metanol (THF/metanol, 50 mL, 2:1) e hidróxido de potasio (KOH, 40%, 6 mL) reaccionó durante 20 h a 60 °C. La mezcla de reacción se trató con agua (25 mL) y ácido clorhídrico 50% hasta pH<7. Posteriormente se extrajo con DCM/metanol 20% (25 mL) y luego se llevaron a cabo sucesivas extracciones con DCM y metanol. La fase orgánica se separó y el solvente se evaporó bajo presión reducida, obteniendo 70 mg (70 %) de A-ZnPc. ¹HNMR (DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 7,15 (d, 2H, J= 8,7 Hz), 7,30-7,48 (m, 2H), 7,76-8,25 (m, 15H). ESI-MS [m/z]: 714,022 (M+H)⁺ (712,095 calculado para C₃₉H₂₀N₈O₃Zn).

3.3.2.4. *Conjugado Quitosano – Cinc Ftalocianina (Q -ZnPc)*

Una solución de A-ZnPc (20 mg, 0,03 mmol) y 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 15 mg, 0,07 mmol) en 2 mL de DMF se hizo reaccionar durante 24 h. Posteriormente se adicionó a la mezcla *N*-hidroxisuccinimida (NHS, 7 mg, 0,06 mmol) y quitosano (10 mg/ 2 mL de ácido acético 2%). La reacción se desarrolló durante 24 h a temperatura ambiente. La purificación del producto se llevó a cabo utilizando diálisis (Spectra/Por Membrane MWDO: 12-14000, 32 mm) en agua durante 72 h. La caracterización espectroscópica del producto corresponde a la informada en bibliografía previamente [110]. FT-IR (KBr) λ_{máx}: 3440-3190 cm⁻¹ (OH/NH), 2923 cm⁻¹ (C-H), 1630 cm⁻¹ (C-C), 1550 cm⁻¹ (O=C-NH), 1400 cm⁻¹ (C-N) y 1040 cm⁻¹ (C-O).

3.3.2.5. *Conjugado Polietilenimina – Cinc Ftalocianina (PA -ZnPc)*

Una mezcla de DCC (15 mg, 0,07 mmol) y A-ZnPc (20 mg, 0,03 mmol) en 2 mL de DMF se hizo reaccionar durante 24 h. Posteriormente se adicionó NHS (7 mg, 0,06 mmol) y polietilenimina (10 mg, 0,013 mmol). La mezcla se dejó reaccionar durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente se purificó el producto mediante diálisis (Sigma Aldrich Dialysis tubing, benzoylated MWDO: 2000, 9mm) en agua por 72 h. FT-IR (KBr) λ_{máx} 3440-3190 cm⁻¹ (OH/NH), 2923 cm⁻¹ (C-H), 1630 cm⁻¹ (C-C), 1550 cm⁻¹ (O=C-NH), 1400 cm⁻¹ (C-N) and 1040 cm⁻¹ (C-O).

3.3.3. Síntesis de ftalocianinas para la formación de películas poliméricas

3.3.3.1. *4-((2,3-dihidrotieno[3,4-b]dioxin-2-il)metoxi)ftalonitrilo (EDOT-Pn)*

Una solución de 4-nitroftalonitrilo (200 mg, 1,15 mmol) y hidroximetil-EDOT (250 mg, 1,45 mmol) en 7,5 mL DMF, en presencia de K₂CO₃ (600 mg, 4,34 mmol), se agitó bajo

atmósfera de argón, a una temperatura de 80 °C durante 15 h. La solución se trató con agua (50 mL) y se extrajo con dos porciones de 50 mL de DCM/metanol (5%). Se separó la fase orgánica y el solvente se evaporó bajo presión reducida. El producto se purificó mediante cromatografía en columna flash (sílica gel, DCM) y se obtuvo 98 mg (0,33 mmol) (30%). R_f (DCM) = 0,56. La caracterización espectroscópica coincide con la informada previamente en bibliografía [111].

3.3.3.2. Cinc (II) 2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis(2,3-Dihidrotieno[3,4-*b*]dioxin-2-il)metoxi)ftalocianina (EDOT-ZnPc)

Una solución de EDOT-Pn (98 mg, 0,33 mmol) y acetato de $Zn(Ac)_2 \cdot 2H_2O$ (30 mg, 0,14 mmol) en 5 ml de *n*-pentanol se agitó por 10 min bajo atmósfera de argón. Luego, 86 μ L (0,57 mmol) de DBU se añadió a la mezcla y se llevó a reflujo por 24 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se trató con agua (50 mL) y se extrajo con tres porciones de 25 mL de DCM. La fase orgánica se separó y el solvente se evaporó bajo presión. El producto se precipitó con *n*-heptano y el sólido de color verde-azulado se lavó con *n*-heptano, generando 42 mg (41%) de EDOT-ZnPc. La caracterización de EDOT-ZnPc se confirmó mediante estudios espectroscópicos y coincide con lo publicado en bibliografía [111].

3.3.3.3. Cobre (II) 2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis(2,3-Dihidrotieno[3,4-*b*]dioxin-2-il)metoxi)ftalocianina (EDOT-CuPc)

La obtención de EDOT-CuPc se realizó siguiendo el mismo procedimiento de síntesis de EDOT-ZnPc. Una solución del derivado de ftalonitrilo (EDOT-Pn) (98,34 mg, 0,33 mmol) y acetato de cobre (II) dihidratado ($Cu(Ac)_2 \cdot 2H_2O$) (28,2 mg, 0,14 mmol) en 5 mL de *n*-pentanol se agitó por 10 min bajo atmósfera de argón. Luego se añadió a la mezcla 86 μ L (0,57 mmol) de DBU y se llevó a reflujo por 24 hs. La reacción se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se trató con agua (50 mL) y se extrajo con tres porciones de 25 mL de DCM. La fase orgánica se separó y el solvente se evaporó bajo presión reducida y se realizó una precipitación con *n*-heptano. Se obtuvo 45 mg (43%) de producto. La estructura de EDOT-CuPc se determinó mediante estudios espectroscópicos 1H NMR (DMSO- d_6) δ [ppm] 4,30-4,74 (20H, -CH-, -CH₂-), 6,65-6,77 (8H, H- EDOT- aromáticos), 7,40-7,52 (4H, H- aromáticos), 7,81-7,88 (4 H, H - aromáticos), 8,25-8,38 (4H, H-aromáticos). ESI-MS [m/z] 1256,1023 (M+H) (1255,0945 calculada para C₆₀H₄₀N₈O₁₂S₄Cu) [103].

3.4. Preparación de soluciones stock

Las soluciones stock ~0,5 mM de cada uno de los compuestos sintetizados se prepararon mediante medidas de absorción, utilizando DMF como solvente, a excepción de las soluciones stock para Q-ZnPc y PA-ZnPc que se prepararon utilizando agua como solvente.

3.5. Estudios espectroscópicos

Los estudios espectroscópicos de absorción y fluorescencia se llevaron a cabo mediante la utilización de una celda de cuarzo, de paso óptico de 1 cm a 25,0±0,5 °C usando como solventes DMF, DCM, metanol, tolueno y agua. Las absorbancias a la longitud de onda de excitación correspondiente para cada compuesto se establecieron en todos los casos <0,1 y las áreas de los espectros de emisión se integraron en el intervalo de 650-800 nm.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) se calcularon mediante la Ecuación 1, donde A^{Ref} y A^{Sens} corresponden a las absorbancias medidas a la longitud de onda de excitación del compuesto de referencia y del PS respectivamente, I^{Ref} e I^{Sens} son las áreas debajo del espectro de emisión y η son los índices de refracción de los solventes empleados [108]. Como compuesto de referencia se utilizó la ftalocianina cinc (II) 2,9,16,23-tetrakis(metoxi)ftalocianina (M₄-ZnPc) la cual presenta un $\Phi_F = 0,26$ en DMF [108].

$$\Phi_F^{\text{Sens}} = \Phi_F^{\text{Ref}} \frac{I^{\text{Sens}} A^{\text{Ref}}}{I^{\text{Ref}} A^{\text{Sens}}} \left(\frac{\eta_2}{\eta_1} \right)^2$$

Ecuación 1

El valor de las áreas se determinó utilizando el programa de cálculo (Microcal Origin, Northampton, MA) a partir de los gráficos de intensidad de fluorescencia (I) vs frecuencia.

3.5.1. Generación de especies de yodo

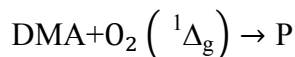
Los espectros de absorción UV-visible de EDOT-Pcs/películas y 0,1 M de KI en PBS se registraron antes y después de la irradiación con luz visible a diferentes períodos de tiempo (0, 30 y 60 min). Las medidas espectroscópicas se realizaron bajo condiciones aeróbicas.

3.6. Fotólisis en estado estacionario

3.6.1. Estudios de fotooxidación de derivados del antraceno

Soluciones de 9,10-dimetilantraceno (DMA, 35 μM) y PS se irradiaron en celdas de cuarzo con un paso óptico de 1 cm utilizando 2 mL de solución e irradiando con luz monocromática ($\lambda_{\text{irr}}=680$ nm, $\text{Abs}^{\text{Sens}} \approx 0,1$) o policromática ($\lambda_{\text{irr}}=530-800$ nm, $\text{Abs}^{\text{Sens}} \approx 0,1$) utilizando como solvente DMF. Por otro lado, soluciones de 2,2'-(antraceno-9,10-diil)bis(metilmalonato) de tetra sodio (ABMM, 35 μM) y PS, en 2 mL de agua, se irradiaron empleando luz policromática de igual rango de longitudes de onda que el mencionado anteriormente ($\text{Abs}^{\text{Sens}} \approx 0,1$).

La disminución de la absorbancia del DMA o ABMM a $\lambda=378$ nm a distintos tiempos de irradiación se estudió mediante el seguimiento cinético de la reacción de fotooxidación del derivado de antraceno correspondiente. Para la reacción de DMA o ABMM con $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ y considerando estado estacionario (Ecuación 2), la velocidad de desaparición del sustrato es expresada mediante la Ecuación 3. En estas condiciones, la concentración de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ se mantiene prácticamente constante dado que la reposición de oxígeno es más rápida que la reacción de fotooxidación [112].



Ecuación 2

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

Ecuación 3

Integrando la Ecuación 3 se obtiene la Ecuación 4:

$$\text{Ln} \frac{[\text{DMA}]_0}{[\text{DMA}]_f} = k_{\text{obs}} t$$

Ecuación 4

A tiempo de reacción cero y en un determinado tiempo de reacción (t), las concentraciones de DMA son $[\text{DMA}]_0$ y $[\text{DMA}]_f$. Sustituyendo dichas concentraciones de DMA en la Ecuación 4, por las correspondientes absorbancias a una longitud de onda de 378 nm se obtiene la Ecuación 5.

$$\text{Ln} \frac{A_0}{A_f} = k_{\text{obs}} t$$

Ecuación 5

Luego del ajuste lineal realizado a los gráficos obtenidos a partir de la Ecuación 5, se determinaron las constantes de velocidad observadas (k_{obs}). Utilizando el método de comparación directa de las pendientes k_{obs} en la región lineal del gráfico entre la molécula referencia utilizada y el PS, para una misma absorbancia de los dos compuestos a la λ_{irr} , se determinaron los valores de rendimiento cuántico de oxígeno singlete (Φ_{Δ}), Ecuación 6.

$$\Phi_{\Delta}^{Sens} = \frac{\Phi_{\Delta}^{Ref} k_{obs}^{Sens}}{k_{obs}^{Ref}}$$

Ecuación 6

Como fotosensibilizadores de referencia se utilizaron las ftalocianinas M₄-ZnPc (Φ_{Δ} = 0,69 en DMF [108]) y cinc (II) tetrametiltetrapiridino[2,3-b:2',3'-g:2'',3''-l:2''',3'''-q] porfirazina (ZnPyPc) (Φ_{Δ} = 0,65 en micelas de *n*-Heptano/AOT(0,1 M)/agua (W₀) 30) en agua [113].

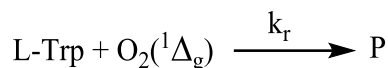
3.6.2. Estudios de fotodescomposición de azul de nitrotetrazolio

Soluciones de azul de nitrotetrazolio (NBT, 0,2 mM), nicotinamida adenina dinucleótido (β -NADH, 0,5 mM) y el PS, disueltos en 2 mL de DMF/agua 1%, se irradiaron con luz monocromática $\lambda_{irr} = 680$ nm. La aparición del producto diformazan (DF) se estudió mediante el seguimiento de las cinéticas de fotooxidación de NBT. El DF tiene una $\lambda_{m\acute{a}x}$ de absorción a 560 nm. Los controles para dicha experiencia se realizaron en ausencia de NBT, β -NADH o el fotosensibilizador.

3.6.3. Estudios de fotooxidación de L-triptófano

Soluciones del aminoácido L-triptófano (L-Trp) (15-30 μ M) y el PS disueltos en 2 mL de DMF se irradiaron a diferentes longitudes de onda ($Abs^{PS} \approx 0,1$). Se utilizaron $\lambda_{irr}=680$ nm para A(NM₃)₃-ZnPc³⁺, Q-ZnPc y PA-ZnPc, y $\lambda_{irr}= 530-800$ nm para CF₃(NM₃)₃-ZnPc³⁺ y (NM₃)₄-ZnPc⁴⁺. Las cinéticas de fotooxidación de L-Trp se estudiaron siguiendo la disminución de la intensidad de fluorescencia a $\lambda_{m\acute{a}x}=340$ nm. Los espectros de fluorescencia se obtuvieron excitando las muestras a $\lambda_{exc}=290$ nm ($[L-Trp] \approx I_F$).

La Ecuación 7 muestra la reacción de L-Trp con O₂(¹ Δ_g), en estado estacionario la Ecuación 8 expresa la velocidad de desaparición del sustrato.

**Ecuación 7**

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

Ecuación 8

Integrando la Ecuación 8 se obtiene

$$\text{Ln} \frac{[\text{L-Trp}]_0}{[\text{L-Trp}]_t} = k_{\text{obs}} t$$

Ecuación 9

Las concentraciones de L-Trp a tiempo de reacción cero y a un determinado tiempo de reacción t son $[\text{L-Trp}]_0$ y $[\text{L-Trp}]_t$. Sustituyendo estas concentraciones de L-Trp por las correspondientes intensidades de fluorescencia a una $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ (Ecuación 10):

$$\text{Ln} \frac{I_0}{I_t} = k_{\text{obs}} t$$

Ecuación 10

Luego de la obtención de los gráficos a partir de la Ecuación 10, se realizó el ajuste lineal de los mismos y mediante el valor de la pendiente de dicho gráfico se determinaron las constantes de velocidad observadas (k_{obs}).

El mecanismo por el cual el PS produce la descomposición de L-Trp se estudió mediante la adición, al medio de reacción, de dos atrapadores de ROS: azida de sodio (NaN_3) y D-manitol. Soluciones de PS ($\text{Abs}^{\text{PS}} \approx 0,1$ a $\lambda = 680 \text{ nm}$) y L-Trp ($15\text{-}30 \mu\text{M}$) en 2 mL de DMF/agua 5% conteniendo los diferentes atrapadores (50 mM de azida de sodio o D-manitol) se irradiaron con luz monocromática a 680 nm. Las soluciones stock de N_3^- y D-manitol se prepararon utilizando agua (HPLC) como solvente.

3.7. Estudios en medios biológicos

3.7.1. Estudios en soluciones celulares planctónicas

3.7.1.1. Cultivos de las cepas microbianas

Como cepa fúngica de estudio, se utilizó una cepa de *C. albicans* (PC31) aislada a partir de una muestra clínica de lesión en piel humana [81]. La levadura se cultivó en condiciones de aerobiosis ON en caldo Sabouraud (CS) (Britania, Buenos Aires, Argentina) a 37 °C hasta que alcanzó la fase estacionaria. Luego el cultivo se centrifugó (15 min, 3000 rpm) y se resuspendió asépticamente en PBS (4 mL, pH= 7) ($Abs^{660\text{ nm}} = 0,4$). Las células se diluyeron para obtener $\sim 10^6$ UFC/mL en PBS.

Las cepas bacterianas utilizadas fueron cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) y *E. coli* (EC7) previamente caracterizadas e identificadas [114]. Las células microbianas se cultivaron en 4 mL de caldo Trypticase Soya (CTS, Britania, Buenos Aires, Argentina) durante 24 h, en un agitador rotatorio (100 rpm) a 37 °C. Una alícuota (100 μ L) del cultivo bacterial se transfirió asépticamente a 4 mL de medio fresco y se incubaron a 37 °C bajo agitación constante, hasta llegar a la fase exponencial de crecimiento de las bacterias ($Abs^{650\text{ nm}} = 0,5$). Las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min y se re-suspendieron en igual cantidad de buffer fosfato salino (PBS, pH = 7) para obtener $\sim 10^8$ (CFU)/mL.

Posteriormente, cada suspensión celular se diluyó 10 veces en PBS y a partir de cada dilución, se sembraron alícuotas de 20 μ L en agar Trypticase Soya (ATS, Britania, Buenos Aires, Argentina), para *S. aureus* y *E. coli*, y en agar Sabouraud (AS, Britania, Buenos Aires, Argentina) para *C. albicans*. Todas las experiencias de realizaron por sextuplicado. El recuento de células viables de *S. aureus* y *E. coli* se realizó en superficie mediante la formación de colonias en placas de Petri conteniendo ATS y las células de *C. albicans*, en placas de Petri conteniendo AS, luego de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad.

3.7.1.2. Estudios de la localización intracelular del fotosensibilizador

La distribución intracelular de $A(NM_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ se analizó mediante microscopía confocal de fluorescencia, evaluando la emisión roja de la ftalocianina. Las suspensiones celulares de *C. albicans* ($\sim 1 \times 10^6$ UFC/mL), *S. aureus* ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/mL) y *E. coli* ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/mL) en PBS se incubaron con 5 μ M del sensibilizador a 37 °C durante 10 min en la oscuridad. Todas las muestras se excitaron a una $\lambda_{exc} = 405$ nm y 633 nm y la emisión se analizó en el canal azul de 430 - 470 nm y en el rojo de 575 - 638 nm.

3.7.1.3. Unión del fotosensibilizador a las células microbianas

Se incubaron suspensiones celulares de *C. albicans* (3 mL, $\sim 10^6$ UFC/mL), *S. aureus* y *E. coli* (3 mL, $\sim 10^8$ UFC/mL) en PBS con concentraciones 1 μ M, 2.5 μ M y 5 μ M de PS, por diferentes tiempos (2, 5 y 15 min) en tubos tipo Pyrex (13x100 mm). El PS se añadió desde una solución stock ~ 5 mM en DMF. Cada cultivo se centrifugó (14000 rpm por 1 min), se resuspendió en 1 mL de solución acuosa de SDS (2 %), se incubó durante toda la noche a 4 °C y se sonicó por 30 min. La concentración de PS en el sobrenadante se determinó mediante medidas de fluorescencia ($\lambda_{exc}= 660\text{nm}$, $\lambda_{emi}= 672$ nm). Las intensidades de fluorescencia se refirieron al número total de células contadas en cada suspensión. La concentración del PS en la muestra se calculó por comparación con una curva de calibración obtenida con soluciones estándar del sensibilizador en SDS al 2 % (Figura 13).

Conjuntamente se determinó la unión del fotosensibilizador $A(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ a cultivos que se sometieron a una y dos etapas de lavados. Cada lavado consistió en la centrifugación (3000 rpm por 15 min) del cultivo y la resuspensión del pellet en 2 mL de PBS, se sonicó durante 30 min y se determinó la concentración del sensibilizador mediante medidas de fluorescencia ($\lambda_{exc}= 660\text{nm}$, $\lambda_{m\acute{a}x}= 672\text{nm}$).

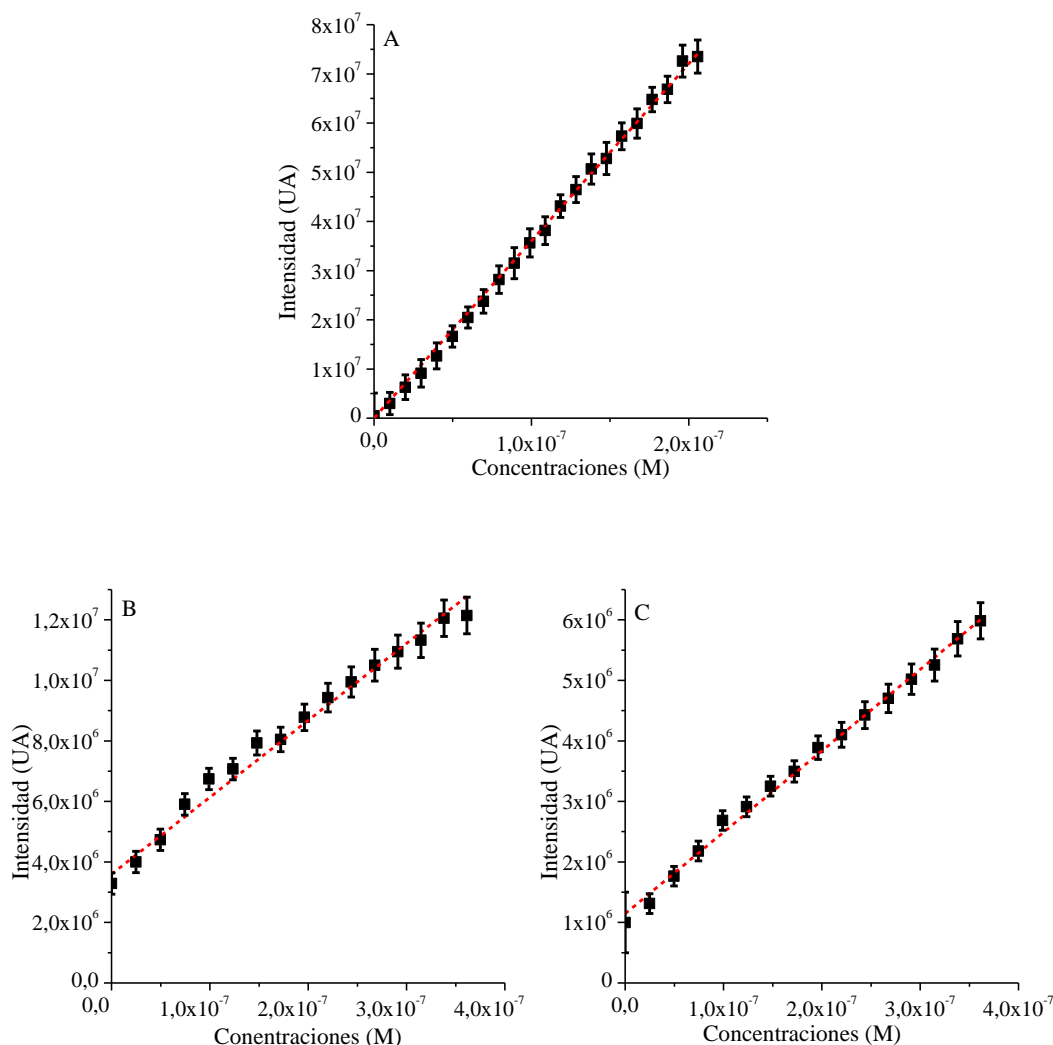


Figura 13. Curva de calibración de (A) $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$, (B) $Q-ZnPc$ Y (C) $PA-ZnPc$ en SDS al 2 % ($\lambda_{exc}=660$ nm, $\lambda_{m\acute{a}x}=672$ nm).

3.7.1.4. Inactivación fotodinámica de las cepas microbianas

Suspensiones celulares de *C. albicans* (2 mL, $\sim 10^6$ UFC/mL), *S. aureus* y *E. coli* (2 mL, $\sim 10^8$ UFC/mL) en PBS se incubaron con diferentes concentraciones (1 μ M, 2.5 μ M y 5 μ M) del fotosensibilizador en tubos tipo Pyrex (13x100 mm) por 30 min a 37 °C en oscuridad. Luego, 200 μ L de cada suspensión se transfirieron a policubetas (multiwell, Deltalab constituidas por 96 pocillos estériles) y se expusieron a irradiación con luz visible (30 $mWcm^{-2}$, Esquema 23

Esquema 23) por diferentes intervalos de tiempo (2, 5 y 15 min para *S. aureus* y 5, 15 y 30 min para *C. albicans* y *E. coli*). Cada experimento se repitió tres veces de manera separada. Los experimentos controles se llevaron a cabo en presencia de PS sin iluminación,

sin PS e irradiados y un doble control sin PS ni irradiación. Las suspensiones celulares de control y las tratadas se diluyeron en forma consecutiva con PBS y cada dilución se sembró en placas de ATS, para *S. aureus* y *E. coli* y AS, para *C. albicans*. Se incubó a 37 °C por 24 h para luego llevar a cabo el recuento de supervivencia celular.

Por otra parte, el efecto del PS sobre la PDI se evaluó luego de realizar una y dos etapas de lavado, para eliminar todo el fotosensibilizador que no se une eficazmente a las células de *C. albicans*. Las suspensiones celulares se incubaron con A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ (2,5 μM), se irradió a diferentes tiempos (5, 15, 30 min), se centrifugaron y re-suspendieron en PBS (2 mL). Este procedimiento que se repitió dos veces, para posteriormente ser sembradas en placas con AS.

3.7.2. Inactivación fotodinámica de *C. albicans* creciendo en colonias sobre agar

Se sembraron suspensiones de *C. albicans* (~ 10² UFC/mL) en PBS en placas de 10 cm de diámetro conteniendo AS y se incubaron a 37 °C por 24 h hasta obtener colonias de diámetro reducido (~ 1 mm de diámetro). Diferentes cantidades de A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ (1 nmol, 5 nmol y 10 nmol), de una solución stock 6,8 x 10⁻⁴ M en DMF, se adicionó sobre las colonias. Los cultivos se mantuvieron en oscuridad por 30 min a 37 °C, para permitir la unión del fotosensibilizador a las células de *C. albicans*. Posteriormente se irradiaron 3 h con luz visible (Esquema 23). Las placas se incubaron en oscuridad a 37 °C y los tamaños de las colonias de *C. albicans* se evaluaron luego de distintos tiempos (24 h, 48 h y 72 h). Los experimentos de control en oscuridad se realizaron en ausencia y en presencia de PS, mientras que el control iluminado, sin PS. Los experimentos se llevaron a cabo separadamente por triplicado.

3.7.3. Inactivación fotodinámica de *S. aureus* empleando superficies electropolimerizadas

Suspensiones celulares de *S. aureus* se inactivaron empleando las superficies obtenidas mediante voltametría cíclica (área= 2,1 cm²) en PBS. Sobre cada superficie electropolimerizada, se depositó 250 μL de la suspensión bacteriana (~10⁴ UFC/mL) y se colocó dentro de una placa de Petri estéril. Posteriormente, se irradió con luz visible durante diferentes intervalos de tiempo (30 min y 60 min). A partir de las suspensiones celulares

(control de irradiación, oscuridad y las tratadas) se prepararon diluciones seriadas en PBS. Alícuotas de 20 μL de cada dilución, se sembró por triplicado en placas de ATS.

Por otra parte, se estudió la PDI de *S. aureus* empleando superficies electropolimerizadas, potenciando el tratamiento con yoduro de potasio. Para ello, se trabajó con suspensiones celulares incubadas durante 30 min con KI (0,1 M). La metodología del tratamiento posterior a la incubación se llevó a cabo como se mencionó anteriormente.

3.7.4. Inactivación fotodinámica de biopelículas microbianas

3.7.4.1. PDI de biopelículas de *C. albicans*

Diferentes cepas de *C. albicans* se cultivaron durante toda la noche (overnight, ON) en CS a 37 °C. Posteriormente el cultivo se centrifugó (15 min, 3000 rpm) y se resuspendió asépticamente en PBS (4 mL, pH= 7). Las células se diluyeron para obtener $\sim 10^7$ UFC/mL en PBS. Alícuotas de 200 μL se transfirieron a policubetas (multiwell, Deltalab constituidas por 96 pocillos estériles) y se incubaron durante 2 h a 37 °C con agitación (75 rpm) para facilitar la adhesión inicial de las células a las paredes del pocillo. Luego, mediante aspiración, se retiró el sobrenadante y se lavó cuidadosamente con PBS para remover las células fúngicas no adheridas. Los pocillos de las policubetas se llenaron con CS suplementado con suero y se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Finalmente, el sobrenadante con células que no se adhirieron a los pocillos de la policubeta, se removió mediante aspiración y cada pocillo se lavó con PBS de manera cuidadosa con el objetivo de evitar el desprendimiento de las biopelículas. A continuación se incubó a la biopelícula de *C. albicans* en PBS con diferentes concentraciones (5 μM y 10 μM) de los PS por 30 min a 37 °C en oscuridad. Posteriormente se expusieron a irradiación con luz visible (30 mWcm^{-2} , Esquema 23) a diferentes intervalos de tiempo a luz visible (30 min y 60 min). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, aquellos experimentos control se realizaron en presencia de PS sin iluminación, sin PS e irradiados y un doble control sin PS ni irradiación. Luego del tratamiento, a cada pocillo con la biopelícula formada, se lo raspó con un hisopo estéril el cual se depositó en un tubo con PBS, para re-suspender las células adheridas al mismo. El nivel de formación de la biopelícula se determinó luego de la realización de diluciones de las suspensiones celulares y se sembraron alícuotas de 20 μL en placas de AS, incubadas durante 48 h a 37 °C para luego realizar el recuento de unidades

formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). El protocolo previamente descrito ha sido ya reportado [115].

3.7.4.2. PDI de biopelículas de *S. aureus*

Se cultivó a la bacteria *S. aureus* en CTS, en agitador rotatorio (100 rpm) a 37 °C ON. Una alícuota (100 µL) del cultivo bacterial se transfirió asépticamente a 4 mL de medio fresco y se incubaron a 37 °C bajo agitación constante, hasta llegar a la fase exponencial de crecimiento de las bacterias. Las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min y se resuspendieron en igual cantidad de PBS para obtener una concentración celular de $\sim 10^7$ (CFU)/mL. Alícuotas de 100 µL del cultivo de *S. aureus*, 900 µL de CTS y 1 mL de PBS se transfirieron a policubetas (multiwell, Deltalab constituidas por 24 pocillos estériles). Posteriormente, fragmentos de electrodos transparentes de óxido de indio dopado con estaño (ITO) o superficies electropolimerizadas con el EDOT-Pcs se incorporaron a los diferentes pocillos (área: 0,7 cm²) y se los incubó ON. La biopelícula se formó sobre las superficies de ITO (con y sin PS) luego de 24h de incubación en agitador rotatorio (100 rpm) a 37 °C. Seguidamente, cada superficie se lavó dos veces con PBS limpiando, en cada lavado, el lado no electropolimerizado con hisopo estéril quedando así la biopelícula bacteriana sólo del lado de interés del ITO. Las superficies con las biopelículas se transfirieron a un pocillo con 500 mL de PBS e irradiaron con luz visible por 30 min y 60 min. A continuación, se las trasladó a un tubo de ensayos con 1 mL de PBS y se sonicaron durante 30 s. Finalmente, se realizaron las diluciones correspondientes y se sembró por sextuplicado alícuotas de 20 µL en ATS. Esta metodología se encuentra descrita en previamente [116].

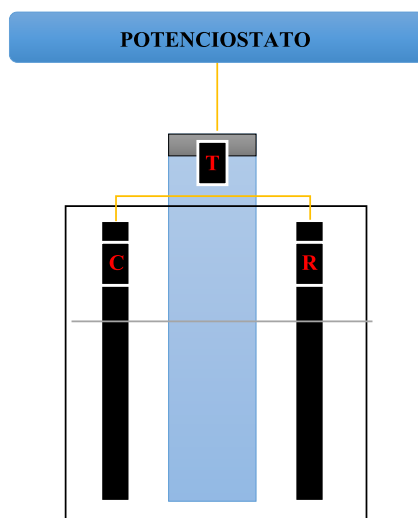
Además, la PDI de biopelículas *S. aureus* se llevó a cabo en presencia de yoduro de potasio (KI) 0,1 M. Para ello, antes de la irradiación las superficies se transfirieron a un pocillo con 500 mL de KI 0,1 M en PBS e incubaron por 30 min. Subsiguientemente se irradió utilizando el procedimiento descrito con anterioridad.

3.8. Formación de películas poliméricas

3.8.1. Caracterización y generación electroquímica de las películas poliméricas

Se midió voltimetría cíclica (VC) y electropolimerización de las Pc en una celda con una configuración de tres electrodos. Se utilizó un electrodo de cuasireferencia de plata, un contra-electrodo de platino y como electrodo de trabajo un alambre de platino (Pt) o ITO (Indium tin oxide) (Esquema 24). Debido a que se usó un electrodo de cuasireferencia, al

final de cada medida se agregó ferroceno como estándar interno y se ajustó el potencial en función del potencial formal de un SCE.



Esquema 24. Potencióstato: Electrodo de trabajo (T), Electrodo de referencia (R) y Contra-electrodo (C).

Los estudios electroquímicos se llevaron a cabo en una solución de DCM con hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (0,1 M) como electrolito soporte. La electropolimerización se llevó a cabo a partir de sucesivas VC, de una solución de monómero (EDOT-ZnPc o EDOT-CuPc) en DCM con electrolito soporte en una ventana de potencial adecuado. De este modo se forma la película de polímero sobre el electrodo de trabajo, luego se retira el electrodo y se enjuaga con DCM para remover restos de monómero y electrolito [97,103].

3.8.2. Espectroelectroquímica

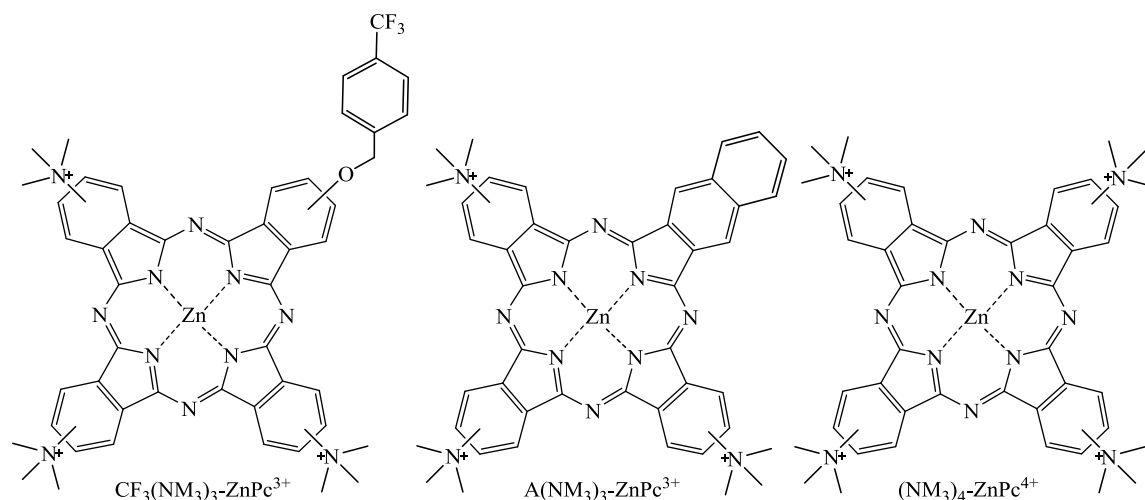
Los monómeros de PS y sus respectivos polímeros (películas depositadas sobre los electrodos de trabajo) se caracterizaron por espectroelectroquímica en una celda de espectroscopía de absorción UV-Visible. En la celda se colocó un ITO con polímero depositado como electrodo de trabajo, un alambre de Pt como contra-electrodo y un alambre de Ag como electrodo de referencia en una solución de DCM con electrolito soporte (hexafluorofosfato de tetrabutilamonio, 0,1 M). La celda se coloca en el espectrofotómetro donde el haz atraviesa el polímero depositado sobre el ITO (antes de realizar las medidas se toma un blanco de un ITO sin polímero) [97,103,117].

Capítulo 4 - Fotosensibilizadores catiónicos para la inactivación fotodinámica de microorganismo

4. Resultados y discusiones

La estructura molecular del fotosensibilizador posee una participación primordial en la inactivación fotodinámica de microorganismos. Como se mencionó anteriormente, en general, los fotosensibilizadores catiónicos generan una PDI importante de células microbianas. Este efecto es principalmente debido a las interacciones entre la molécula fotosensibilizante y las paredes celulares de los microorganismos a tratar [27,38].

La envoltura celular de bacterias Gram negativas actúa como una barrera de permeabilidad, sin embargo es relativamente impermeable a drogas neutras y aniónicas. La eficiencia de la fotosensibilización puede aumentarse utilizando PS con cargas positivas intrínsecas. Estos agentes catiónicos interactúan fuertemente con la superficie externa incrementando la eficiencia de los procesos fotodinámicos [27,38]. En este sentido, se sintetizaron tres PS catiónicos para su aplicación en PDI (Esquema 25).



Esquema 25. Estructura de los derivados de Pcs: $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$, $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ y $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$.

4.1. Síntesis de ftalocianinas catiónicas

Para la obtención de fotosensibilizadores catiónicos aplicables para la PDI de microorganismos se sintetizaron ftalocianinas sustituidas en la periferia del macrociclo con grupos NO_2 [77,81,109]. La elección del grupo NO_2 como sustituyente en los PSs, se debe a que puede reducirse a grupo amino, el cual es un excelente precursor de cargas positivas. Como se mencionó previamente, las ftalocianinas son reconocidas como PSs para la PDI de microorganismos. Aquellas que posean carga positiva en la periferia del macrociclo tetrapirrólico son más eficientes en la inactivación fotodinámica debido a que le permite una interacción más efectiva con la membrana de las células microbianas (bacterias y hongos)

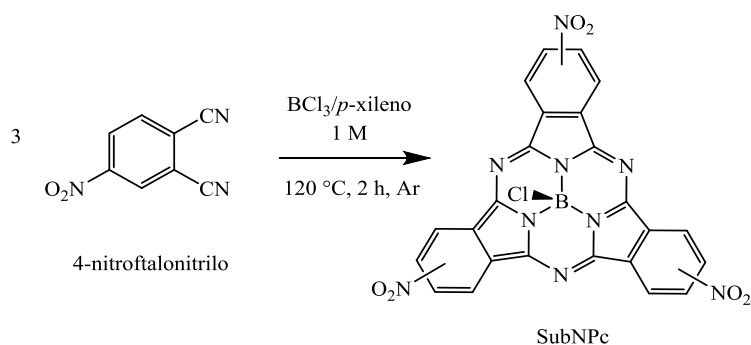
[77,81,118-121]. Además, los grupos nitro poseen importantes efectos electrónicos, incluyendo el efecto inductivo y de conjugación [109].

Por lo tanto, se sintetizaron inicialmente tres ftalocianinas neutras sustituidas con grupos NO₂ en la periferia del macrociclo, dos de ellas poseen simetría A₃B (CF₃N₃-ZnPc y AN₃-ZnPc) y la restante A₄ (N₄ZnPc). Aquellas ftalocianinas asimétricas se sintetizaron mediante la reacción de expansión del anillo de la SubNPc con el ftalonitrilo correspondiente, mientras que el PS simétrico se obtuvo a partir de la reacción de ciclótetramerización de 4-nitroftalonitrilo [32,73]. La expansión del anillo de una subftalocianina es una estrategia selectiva que permite obtener como único producto la ftalocianina con simetría A₃B deseada [32,73].

Para la obtención de ftalocianinas catiónicas a partir de las ftalocianinas precursoras con sustituyentes NO₂ se procedió a la reducción de dichos grupos, convirtiéndolos en grupos NH₂, y posteriormente se realizó la metilación exhaustiva de los mismos [77,109].

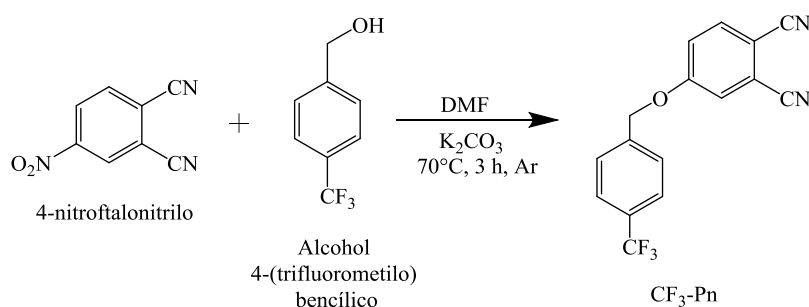
Las ftalocianinas asimétricas se pueden obtener siguiendo diferentes rutas de síntesis. La reacción de expansión del anillo de subftalocianinas, es una ruta de síntesis selectiva obteniéndose un sólo producto, mejorando así los rendimientos y evitando el uso de técnicas cromatográficas para la separación de la mezcla de distintas ftalocianinas [32,73]. Es por ello que esta metodología es la más adecuada para la síntesis de ftalocianinas con simetría A₃B.

En primer lugar, se realizó la síntesis de SubNPc mediante la ciclótetramerización de 4-nitroftalonitrilo inducida por el BCl₃, en atmósfera inerte (Esquema 26), obteniendo un rendimiento de 70%. La utilización del ácido de Lewis (BCl₃), se debió a su alta reactividad frente a diferentes grupos funcionales, tales como los sustituyentes del 4-nitroftalonitrilo, permitiendo así una alta estabilidad en las condiciones de reacción requeridas [122].



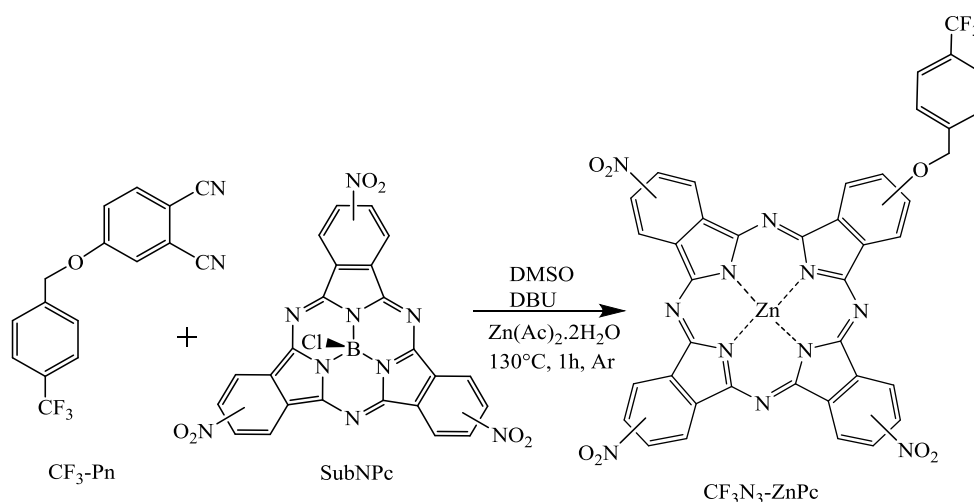
Esquema 26. Síntesis de SubNPc.

El derivado de ftalonitrilo $\text{CF}_3\text{-Pn}$ se sintetizó mediante la reacción de sustitución nucleofílica aromática *ipso*-nitro entre el 4-nitroftalonitrilo y el alcohol 4-(trifluorometil)benílico en presencia de K_2CO_3 anhidro, bajo atmósfera inerte en DMF (Esquema 27). La mezcla de reacción se mantuvo durante 3 h a 70°C y posteriormente se extrajo con DCM y agua. Se separó la fase acuosa y se extrajo nuevamente con DCM. La fracción orgánica se evaporó a presión reducida. La purificación del producto se llevó a cabo mediante cromatografía en columna flash utilizando como solvente eluyente DCM obteniendo un rendimiento de 60% del producto puro [108].



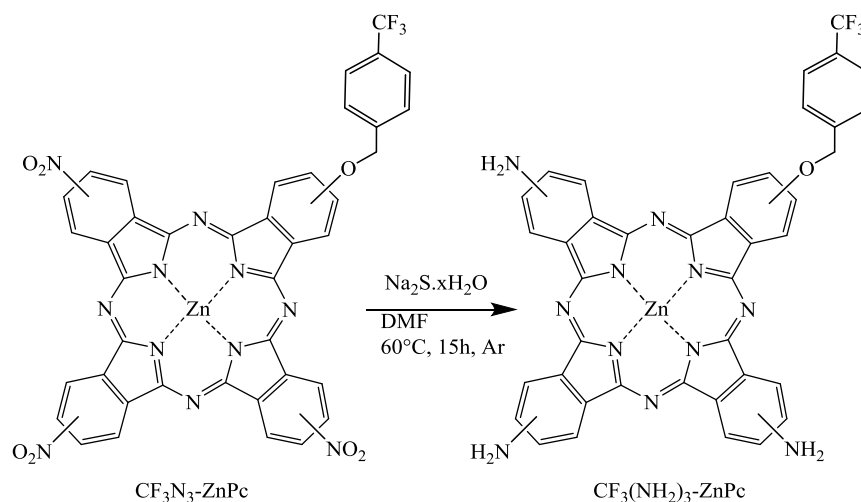
Esquema 27. Síntesis del $\text{CF}_3\text{-Pn}$.

La ftalocianina $\text{CF}_3\text{N}_3\text{-ZnPc}$ se obtuvo haciendo reaccionar una solución del ftalonitrilo $\text{CF}_3\text{-Pn}$ y DBU en DMSO, a 130°C y agitación constante, con una mezcla de SubNPc con acetato de cinc dihidratado en DMSO durante 1 h en atmósfera de argón (Esquema 28). Luego el producto se precipitó con agua y se lavó con metanol. Posteriormente, se centrifugó con ciclohexano y se secó a vacío obteniéndose un rendimiento de 18% de $\text{CF}_3\text{N}_3\text{-ZnPc}$.



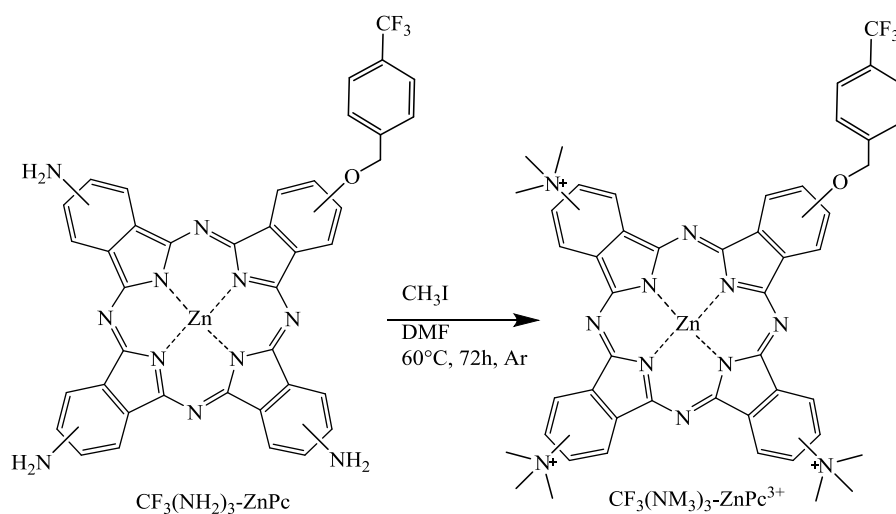
Esquema 28. Síntesis de $\text{CF}_3\text{N}_3\text{-ZnPc}$.

Posteriormente, para la obtención de los grupos amino precursores catiónicos, se sintetizó la ftalocianina $\text{CF}_3(\text{NH}_2)_3\text{-ZnPc}$ haciendo reaccionar $\text{CF}_3\text{N}_3\text{-ZnPc}$ con $\text{Na}_2\text{S}\cdot x\text{H}_2\text{O}$ en exceso en DMF durante 5 h a 60°C en atmósfera inerte (Esquema 29). La mezcla de reacción se precipitó, lavó y centrifugó con agua obteniendo 65% del producto puro $\text{CF}_3(\text{NH}_2)_3\text{-ZnPc}$.



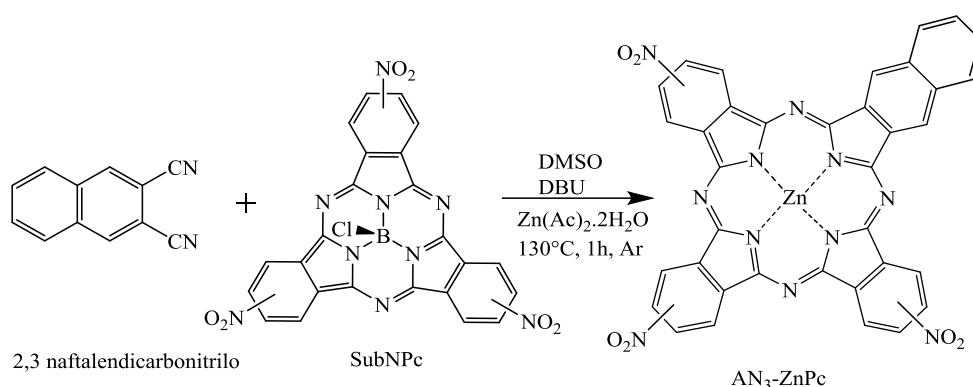
Esquema 29. Obtención de $\text{CF}_3(\text{NH}_2)_3\text{-ZnPc}$.

Para la obtención de la ftalocianina tricatiónica $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$, se llevó a cabo la reacción entre $\text{CF}_3(\text{NH}_2)_3\text{-ZnPc}$ y CH_3I en atmósfera inerte a 60°C durante 72 h utilizando DMF como solvente (Esquema 30). Posteriormente se evaporó el solvente a presión reducida y el producto se lavó con ciclohexano y con éter etílico obteniendo 93% de $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$.



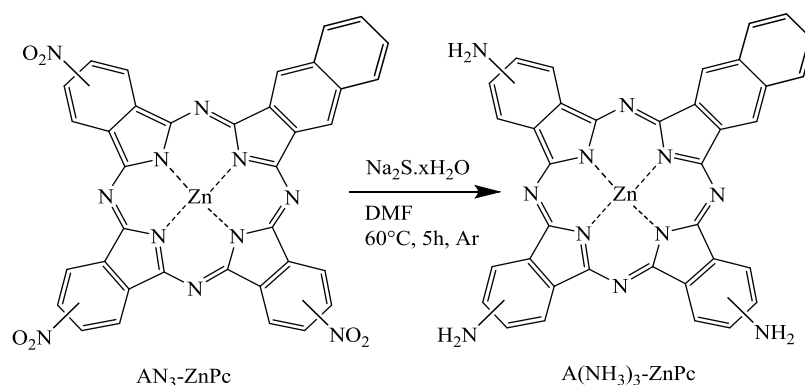
Esquema 30. Obtención de $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$.

La síntesis de la ftalocianina AN₃-ZnPc (Esquema 31) se llevó a cabo mediante una reacción de dos etapas. En la primera etapa se hizo reaccionar al 2,3-naftalendicarbonitrilo con DBU en DMSO. Bajo atmósfera de argón, se agitó y calentó a 130 °C y una vez alcanzada dicha temperatura se le adicionó lentamente durante 20 min, en una segunda etapa, una mezcla de SubNPc con acetato de cinc (II) dihidratado en DMSO (Esquema 31). La reacción se llevó a cabo durante 1 h a 130 °C, el producto se precipitó con agua y posteriormente se lo lavó con metanol. Se centrifugó con ciclohexano y se secó a vacío, dando un rendimiento de 20% de AN₃-ZnPc.



Esquema 31. Síntesis de AN₃-ZnPc.

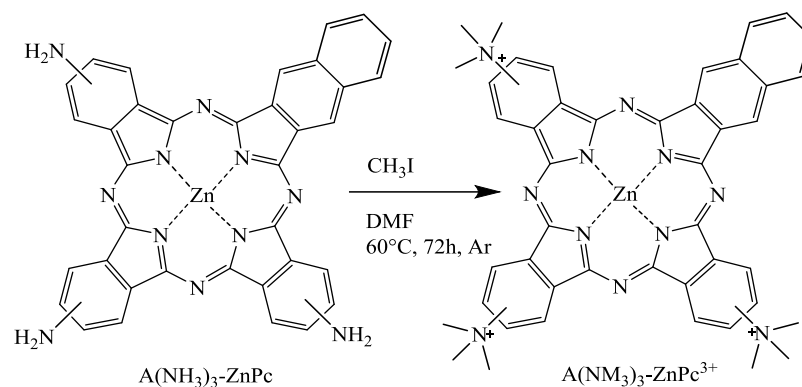
La ftalocianina A(NH₂)₃-ZnPc se sintetizó utilizando la misma metodología descrita anteriormente para CF₃(NH₂)₃-ZnPc. Se hizo reaccionar AN₃-ZnPc con Na₂S·xH₂O en exceso en DMF durante 5 h a 60 °C en atmósfera inerte (Esquema 32). La mezcla de reacción se precipitó, lavó y centrifugó con agua obteniendo 61% del producto puro A(NH₂)₃-ZnPc.



Esquema 32. Obtención de A(NH₂)₃-ZnPc.

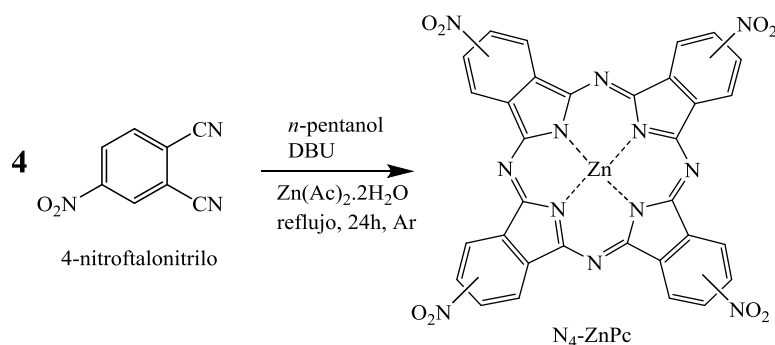
A continuación, la ftalocianina catiónica A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ se obtuvo mediante la reacción entre A(NH₂)₃-ZnPc y CH₃I (2 mL) en DMF. La mezcla se calentó a 60 °C durante

72 h (Esquema 33), se evaporó el solvente bajo presión reducida y se lavó sucesivamente el producto con ciclo hexano y éter etílico. Se obtuvo un 95 % de $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$.



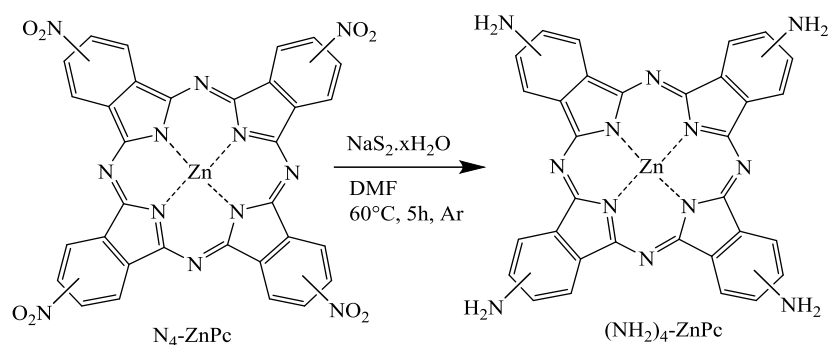
Esquema 33. Obtención de $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$.

La síntesis del macrociclo N_4-ZnPc se realizó mediante la reacción de ciclometamerización en *n*-pentanol utilizando el 4-nitroftalonnitrilo, acetato de cinc dihidratado, bajo atmósfera de argón, en presencia del catalizador DBU. La reacción se llevó a cabo a reflujo por 24 h (Esquema 34). Posteriormente, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se extrajo con porciones de agua/DCM, lavando el producto finalmente con *n*-heptano. La reacción ocurrió con un rendimiento de 40 % de la ftalocianina N_4-ZnPc .



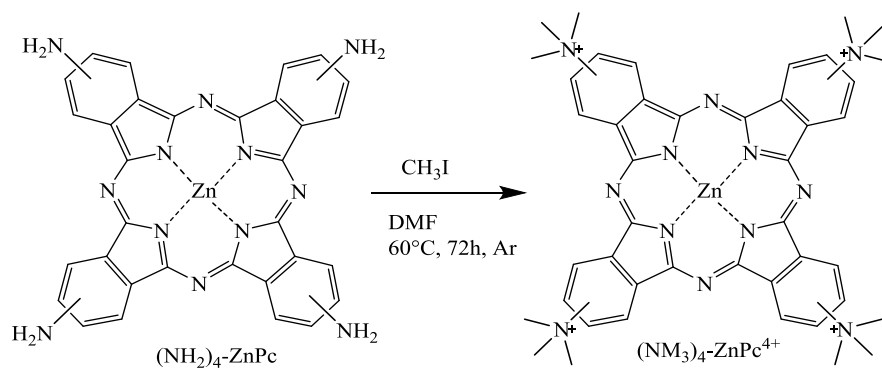
Esquema 34. Síntesis de N_4-ZnPc .

La síntesis de la amino-ftalocianina con simetría A_4 se logró mediante la reducción de los grupos NO_2 , haciendo reaccionar N_4ZnPc con exceso de $Na_2S \cdot xH_2O$ en DMF. La reacción se llevó a cabo bajo atmósfera inerte durante 5 h a 60 °C (Esquema 35). Posteriormente la mezcla se precipitó, se centrifugó y lavó con agua obteniendo un 54% de rendimiento de $(NH_2)_4-ZnPc$ [109].



Esquema 35. Obtención de $(\text{NH}_2)_4\text{-ZnPc}$.

Posteriormente se hizo reaccionar a $(\text{NH}_2)_4\text{-ZnPc}$ con CH_3I en DMF bajo atmósfera de argón a 60°C durante 72 h (Esquema 36). La mezcla se dejó enfriar, se evaporó el solvente a presión reducida y el producto se lavó con ciclo hexano obteniendo 98% de $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$.



Esquema 36. Obtención de $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$.

4.2. Estudios espectroscópicos

Los espectros de absorción de las ftalocianinas neutras ($\text{CF}_3\text{N}_3\text{-ZnPc}$, $\text{AN}_3\text{-ZnPc}$, $\text{N}_4\text{-ZnPc}$) y catiónicas ($\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$, $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ y $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$) se estudiaron en DMF con el objetivo de observar los cambios espectrales ocasionados por la diferencia estructural de los PSs. Las Figura 14. A y B muestran los espectros de las ftalocianinas en DMF, se distinguen las bandas características de las ftalocianinas, la banda Q a $\lambda \approx 645\text{-}705$ nm (Figura 14.) y las bandas Soret a $\lambda \approx 340$ nm (no mostradas en la Figura 14.) [32,73,89]. Además, se observan notorias variaciones en los espectros de absorción de las moléculas, de aquellas neutras a las catiónicas. Además,

Los estudios espectroscópicos se centraron solamente en aquellas ftalocianinas con sustituyentes catiónicos ($\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$, $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ y $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$) debido a que se sintetizaron con la finalidad de utilizarlos como agentes fototerapéuticos para la

inactivación de microorganismos [77]. Los espectros de absorción en DMF de $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ y $(NM_3)_4-ZnPc^{4+}$ presentaron bandas de absorción Q agudas indicando que en dicho solvente los PSs se encuentran principalmente en estado monomérico. Sin embargo, $CF_3(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ muestra un ensanchamiento de la banda Q dejando en evidencia el posible estado de agregación en el que se encuentra el PS en DMF (Figura 14.). Los valores de $\lambda_{m\acute{a}x}$ de absorción se observan en la Tabla 1.

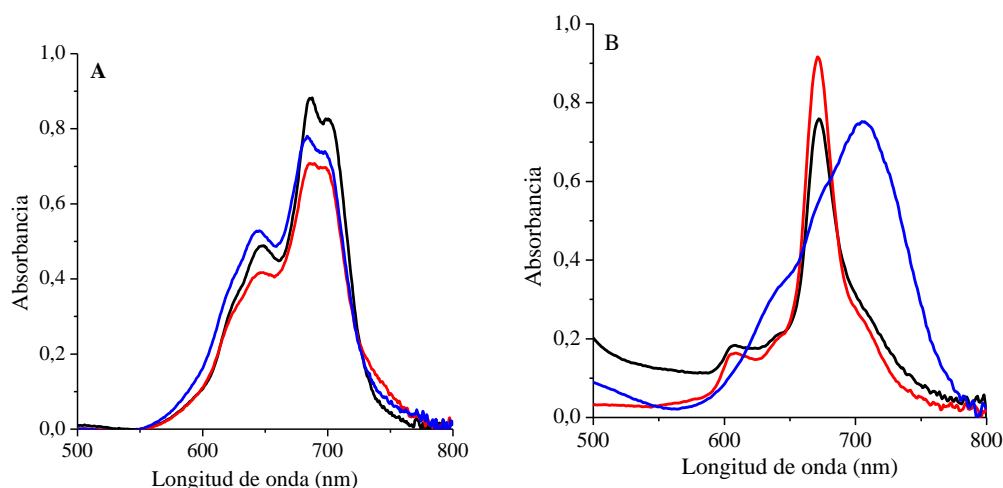


Figura 14. Espectros de absorción de (A) CF_3N_3-ZnPc (azul), AN_3-ZnPc (rojo) y N_4-ZnPc (negro) y (B) $CF_3(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ (azul), $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ (rojo) y $(NM_3)_4-ZnPc^{4+}$ (negro) en DMF.

Los espectros de absorción de $CF_3(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$, $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ y $(NM_3)_4-ZnPc^{4+}$ se analizaron en solventes con polaridades diferentes, tales como DMF, DCM y metanol a igual concentración de PS (Figura 15.). La molécula $(NM_3)_4-ZnPc^{4+}$ muestra un corrimiento hipsocrómico, una disminución de la intensidad de la banda Q y un ensanchamiento de la misma, tanto en DCM como metanol. Este comportamiento estaría indicando un posible estado de agregación del PS en dichos solventes. Al igual que $(NM_3)_4-ZnPc^{4+}$, la ftalocianina que posee el sustituyente trifluorado, $CF_3(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$, manifiesta agregación en todos los solventes utilizados, siendo más pronunciada en DCM y metanol. En cambio, la Pc $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ muestra sólo una disminución en la intensidad de la banda Q en DCM manteniendo la definición de la misma indicando así el estado monomérico del PS en dicho solvente. Sin embargo, cuando se utilizó metanol como solvente, se observa un ensanchamiento de la banda Q y una disminución en su intensidad indicando la pérdida de la monomerización del PS en dicho solvente. En todos los casos se observa que DMF es el solvente más adecuado para la disolución de los PS ya que la agregación en dicho solvente disminuye en comparación con DCM y metanol. Es sabido que la formación de agregados generan un camino de relajación desde el estado excitado hacia la pérdida de energía no

radiactiva, disminuyendo la formación de estado triplete ($^3\text{PS}^*$) y consecuentemente la producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, repercutiendo negativamente en la actividad fotodinámica [32,73,79,80].

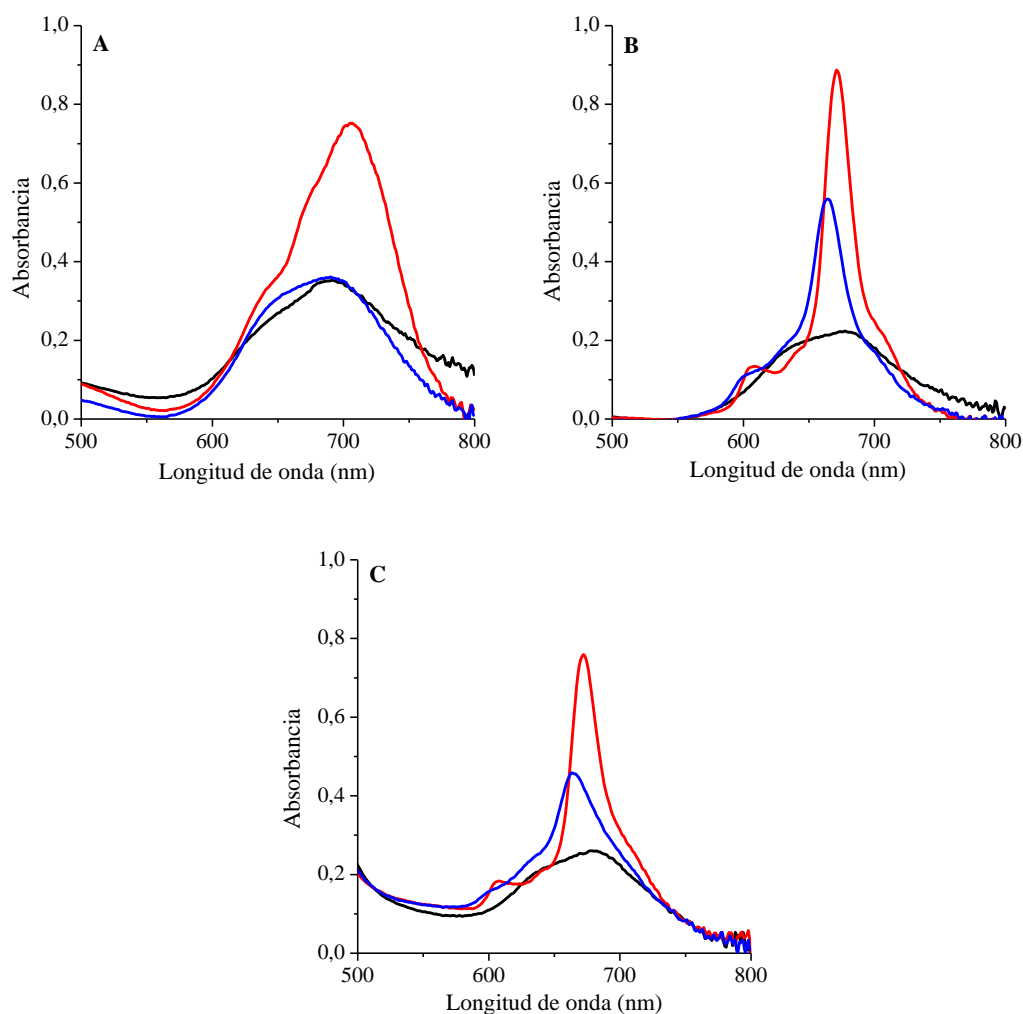


Figura 15. Espectros de absorción de $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ (A), $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ (B) $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$ (C) en DMF (rojo), DCM (azul) y metanol (negro).

En la Figura 16. se observan los espectros de emisión de $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$, $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ y $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$ en DMF. Éstos presentan las bandas características de la familia de ftalocianinas, pertenecientes a las transiciones energéticas $0 \rightarrow 0$. Las condiciones de trabajo se unificaron para todas las moléculas analizadas ($\lambda_{\text{máx}}=680$ nm, $\text{Abs}^{\text{PS}} \approx 0,1$, $\lambda_{\text{exc}}=610$ nm). La emisión de fluorescencia en DMF de la ftalocianina $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ es considerablemente mayor que las obtenidas para $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$ y $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$. En todos los casos, los PS sintetizados presentaron una emisión de fluorescencia menor a la ftalocianina de referencia $\text{M}_4\text{-ZnPc}$.

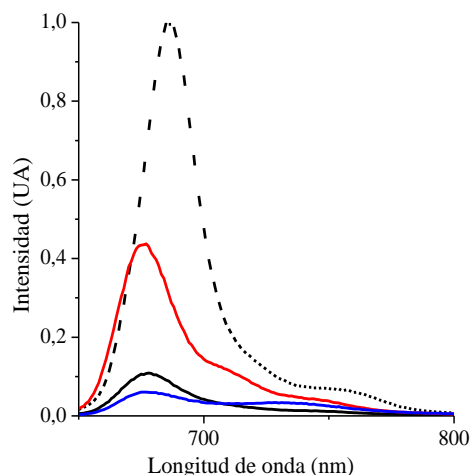


Figura 16. Espectros de emisión de $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ (azul), $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ (rojo), $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$ (negro) y $\text{M}_4\text{-ZnPc}$ (línea discontinua negra) en DMF ($\lambda_{\text{exc}} = 610 \text{ nm}$)

La Figura 17. muestra los espectros de emisión de los PS sintetizados en solventes de distinta polaridad (DMF, DCM y metanol). Teniendo en cuenta los resultados visualizado en los espectros de absorción de las moléculas (Figura 15.) y como era predecible, tanto en DCM como en metanol, la emisión de fluorescencia fue menor que en DMF. Los resultados obtenidos confirman la existencia de posibles estados de agregación de las ftalocianinas $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$ y $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ en todos los medios estudiados, y del PS $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ en DCM y metanol. Las ftalocianinas $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$ y $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ mostraron una escasa fluorescencia a la λ de excitación seleccionada, efecto que se manifiesta en el valor de Φ_F (Tabla 1).

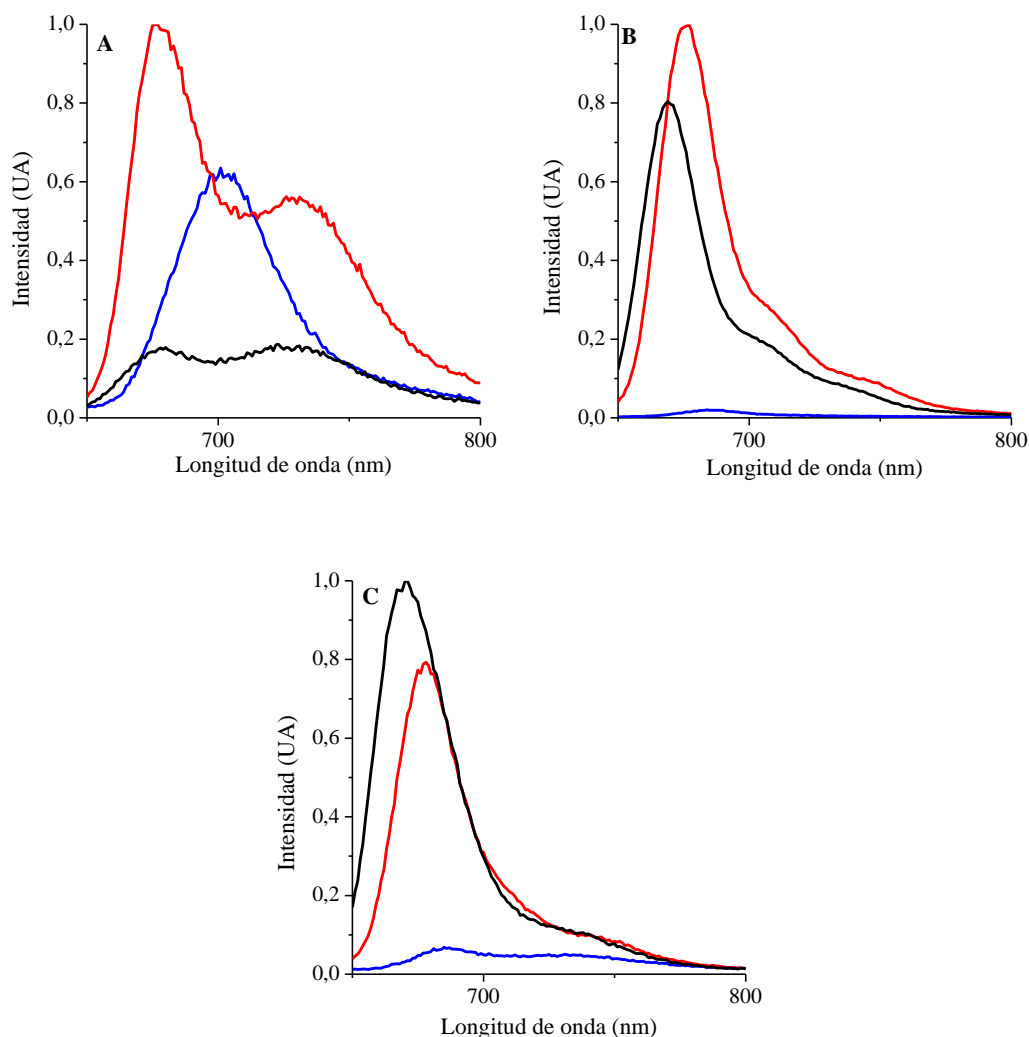


Figura 17. Espectros de emisión de fluorescencia de $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ (A), $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ (B) $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$ (C) en DMF (rojo), DCM (azul) y metanol (negro).

Los rendimientos cuánticos de emisión de fluorescencia (Φ_F) se calcularon en DMF utilizando como referencia $\text{M}_4\text{-ZnPc}$ (Tabla 1) [81]. Todos los PSs catiónicos sintetizados presentan rendimientos de fluorescencia menores que la ftalocianina de referencia ($\Phi_F = 0,26$ [81]), siendo la ftalocianina $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ la más cercana a dicho valor. Los valores de Φ_F para $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$ y $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ concordaron con la escasa emisión de fluorescencia que presentaron a $\lambda_{\text{exc}} = 610$ nm (Tabla 1). Se calcularon además los corrimientos de Stokes para los diferentes PSs catiónicos obteniendo valores similares de ~ 6 nm para $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$ y $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$. Aquellos valores de corrimientos de Stokes < 10 nm indican que las energías espectroscópicas de las moléculas son similares a las energías estado excitado singlete relajado, de acuerdo con la estructura plana y rígida de los macrociclo. Eso sugiere que sólo una relajación geométrica menor se presenta en el primer

estado excitado [83]. Debido a que $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ no se encontró en estado monomérico en DMF, no se calculó el correspondiente corrimiento de Stokes.

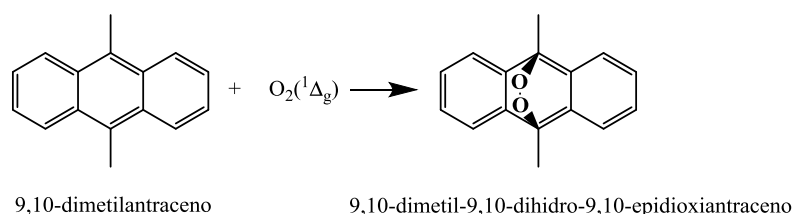
Tabla 1. Características espectroscópicas de las ftalocianinas y rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) en DMF.

Ftalocianinas	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{Abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{Emi}}$ (nm)	Φ_F
$\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$	705	676	0,02±0,01
$\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$	671	677	0,14±0,01
$(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$	672	678	0,04±0,01
$\text{M}_4\text{-ZnPc}$	676	687	0,26±0,02

4.3. Fotólisis en estado estacionario

4.3.1. Estudios de fotooxidación de derivados del antraceno

La producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ para $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$, $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ y $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$ se determinó mediante un método indirecto, utilizando como atrapador 9,10-dimetilantraceno (DMA). Ante la presencia de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ se produce la oxidación de los dobles enlaces del anillo central del sustrato formando un endoperóxido (9,10-dimetil-9,10-dihidro-9,10-epidioxiantraceno) Esquema 37 [123].



Esquema 37. Reacción del DMA con $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.

La reacción de descomposición del sustrato sensibilizada por los diferentes PSs, se estudió espectroscópicamente observando la desaparición de la banda de absorción de DMA ($\lambda_{\text{máx}} = 378$ nm), en condiciones aeróbicas (Figura 18.) [123]. No se observó ninguna variación de los espectros de absorción de los PSs luego de la irradiación de las soluciones, indicando así la fotoestabilidad de las ftalocianinas en las condiciones experimentales utilizadas.

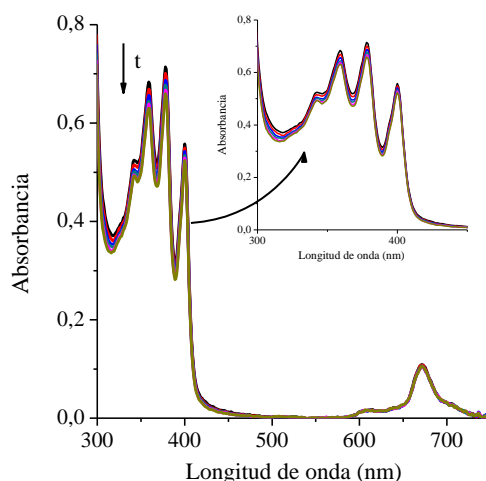


Figura 18. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación ($\Delta t = 60$ s) para la fotooxidación de DMA sensibilizada por $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ en DMF ($\lambda_{irr} = 680$ nm).

A partir del estudio de la cinética de descomposición de DMA a diferentes tiempos de irradiación ($\lambda_{irr} = 680$ nm) en DMF, se obtuvieron datos utilizados para la determinación de los rendimientos cuánticos de $O_2(^1\Delta_g)$ (Φ_Δ). En la Figura 19. se observa el ajuste lineal de los gráficos obtenidos aplicando la Ecuación 5. A partir de la pendiente de los gráficos se determinaron las constantes de velocidad observadas (k_{obs}) $CF_3(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$, $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ y $(NM_3)_4-ZnPc^{4+}$, los resultados se muestran en la Tabla 2. Los rendimientos cuánticos para los PS se calcularon utilizando como compuesto de referencia M_4-ZnPc [108], obteniendo un valor de $\Phi_\Delta = 0,48 \pm 0,05$ para $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ mientras que tanto $(NM_3)_4-ZnPc^{4+}$ como $CF_3(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ no generaron Φ_Δ en las condiciones de trabajo utilizadas.

En estudios previos, un valor similar de Φ_Δ se observó para la ftalocianina di-catiónica $ZnPc$ 5 (cinc (II) tribenzo[b:g:l]-*N,N*-dimetilpirazino[2,3-q]porfirazinium). Por otra parte, las Pc $ZnPc$ 4 (Cinc(II) tribenzo[b:g:l]-*N*-metilpiridino [3,4-q]porfirazinium) y $ZnPc$ 6 (cinc (II) tribenzo[b:g:l]-*N,N*-dimetilen17,18-dimetilpirazino[2,3-q]porfirazinium) mostraron rendimientos cuánticos de generación de $O_2(^1\Delta_g)$ cercanos a 0,2 [83]. Además, valores de Φ_Δ de 0,5 se han reportado para la ftalocianina Cinc (II) tetramiltetrapiridina [3,4-*b*:3', 4'-*g*,3'', 4''-*l*,3''', 4'''-*q*] porfirazina tetraioduro ($ZnPc2$) [124] y para Cinc (II) 2,9,16,23 - tetrakis [4-(*N*-metilpiridiloxy)] ftalocianina ($ZnPc2$) [77], siendo estos similares a los hallados en el presente estudio.

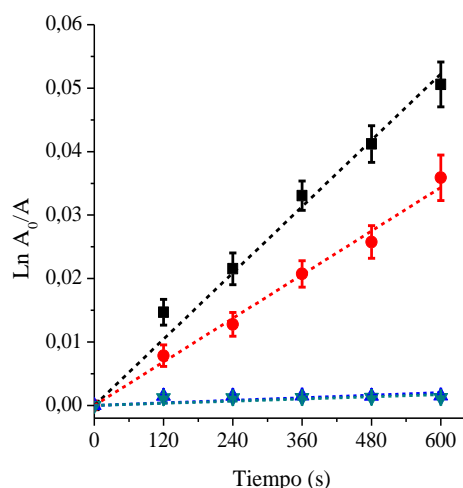


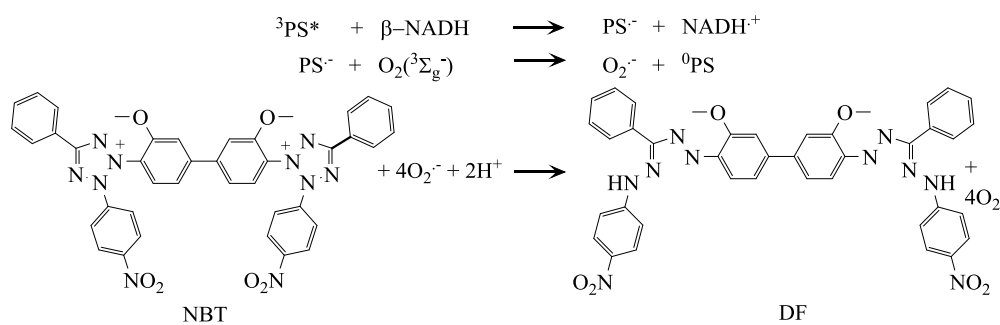
Figura 19. Gráfico de primer orden de la cinética de fotooxidación de DMA (35 μM) sensibilizado por $\text{M}_4\text{-ZnPc}$ (■), $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ (▲), $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ (●) y $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$ (▼) ($\lambda_{\text{irr}} = 680 \text{ nm}$) en DMF.

Tabla 2. Parámetros cinéticos (k_{obs}) para la descomposición de DMA sensibilizada por ftalocianinas y rendimientos cuánticos de $\text{O}_2(^1\Delta_{\text{g}})$ (Φ_{Δ}) en DMF.

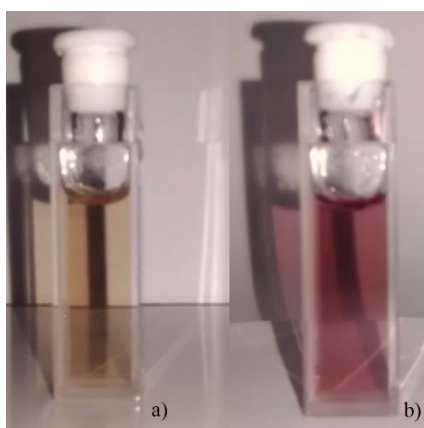
Ftalocianinas	k_{obs} (s^{-1})	Φ_{Δ}
$\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$	$(5,7 \pm 0,6) \times 10^{-5}$	$0,48 \pm 0,05$
$\text{M}_4\text{-ZnPc}$	$(8,7 \pm 0,9) \times 10^{-5}$	$0,69 \pm 0,07$

4.3.2. Estudios de fotodescomposición de azul de nitrotetrazolio

Mediante el estudio de la reacción de NBT en presencia de $\beta\text{-NADH}$ sensibilizada por $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$, se estudió la generación del radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) observando la formación de diformazan como producto (Esquema 38) [125]. La reacción se evidencia mediante un cambio colorimétrico de las soluciones de trabajo (Esquema 39). Luego de irradiar una solución NBT, $\beta\text{-NADH}$ y el PS a diferentes tiempos ($\lambda_{\text{irr}} = 680 \text{ nm}$) se observó el incremento en la banda de absorción de DF (Figura 20.).



Esquema 38. Formación del DF a partir de la reacción entre ${}^3\text{PS}^*$ y $\beta\text{-NADH}$, y entre el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y NBT.



Esquema 39. Solución de NBT + $\beta\text{-NADH}$ + $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ en 2 mL de DMF/agua 1%. a) Sin irradiar y b) después de 5 min de irradiación con luz monocromática ($\lambda_{\text{irr}} = 680 \text{ nm}$).

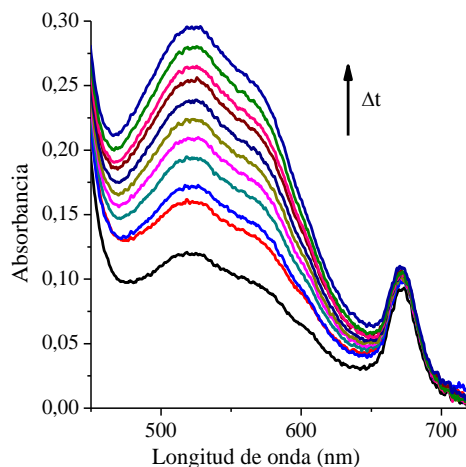


Figura 20. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación para la fotooxidación de NBT + $\beta\text{-NADH}$ sensibilizada por $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ en DMF/ H_2O 1% ($\lambda_{\text{irr}} = 680 \text{ nm}$).

Las cinéticas de fotooxidación de NBT en presencia de PS se estudiaron en DMF/agua 1% bajo condiciones aeróbicas y se muestran en la Figura 21. Tanto la ftalocianina $\text{M}_4\text{-ZnPc}$ (compuesto de referencia) como $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ generan radical anión superóxido de

manera similar, siendo la referencia la que presenta mayor eficiencia en la generación de esta especie ROS [81].

Por otro lado, se realizaron experimentos control en ausencia de PS, de NBT y de β -NADH. En los dos últimos casos no se evidenció la generación de $O_2^{\cdot-}$ mientras que, solo en ausencia de PS se produce una leve generación de este anión radical. Estas experiencias demuestran que la presencia de β -NADH en la solución es indispensable para la formación de DF. Cabe mencionar, que la técnica estudiada permite determinar si se genera o no el radical de manera cualitativa, sin embargo, no es posible cuantificarlo debido a la inexistencia de un compuesto para poder referir su valor.

Resultados similares se encontraron previamente para compuestos con estructuras análogas como lo son 5,10,15,20-tetrakis(4-metoxifenil)porfirin (TMPP) y 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N*-dimetilaminopropoxi)fenil]clorina (TAPC), los cuales generaron eficientemente $O_2^{\cdot-}$ en presencia de β -NADH irradiando con luz visible [114]. Además, se han realizado estudios en sistemas micelares de BHDC utilizando como PS el fullereno catiónico *N,N*-dimetil-2-(4-*N,N,N*-trimetilaminofenil)fulleropirrolidino ioduro (DTC60⁺²) los cuales demostraron una contribución importante en la producción de DF [126].

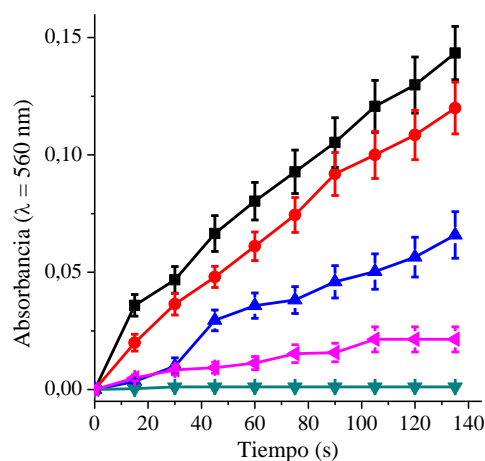
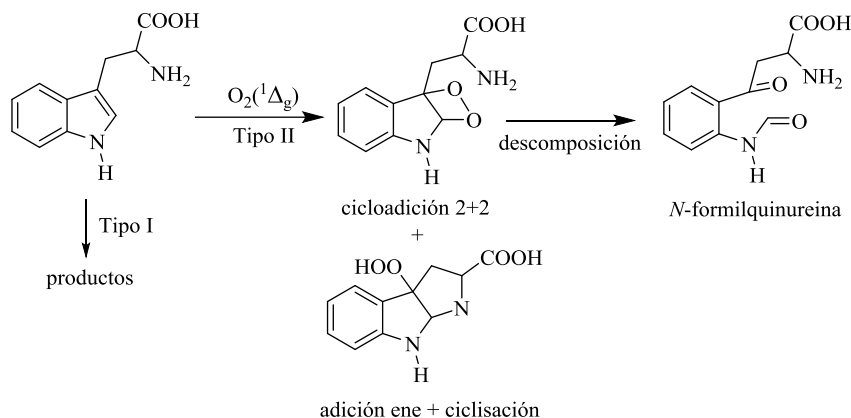


Figura 21. Detección de $O_2^{\cdot-}$ mediante la reacción con NBT a diferentes tiempos de irradiación ($\lambda_{irr} = 680$ nm). NBT + β -NADH + M_4 -ZnPc (■), NBT + β -NADH + $A(NM_3)_3$ -ZnPc³⁺ (●), NBT + β -NADH (▲), NBT + $A(NM_3)_3$ -ZnPc³⁺ (▼) y β -NADH + $A(NM_3)_3$ -ZnPc³⁺ (◄).

4.3.3. Estudios de fotooxidación de L-triptófano

La fotooxidación del aminoácido L-Trp sensibilizado por $CF_3(NM_3)_3$ -ZnPc³⁺, $A(NM_3)_3$ -ZnPc³⁺ y $(NM_3)_4$ -ZnPc⁴⁺ se estudió en DMF/agua 1%, en condiciones aeróbicas con

el objetivo de conocer el mecanismo de acción fotodinámica mediante el cual el aminoácido se descompone. La descomposición del L-Trp puede ser llevada a cabo mediante los dos tipos de mecanismos tipo I y tipo II (Esquema 40) [127].



Esquema 40. Reacciones de descomposición para L-Trp.

Las soluciones de L-Trp y PS se irradiaron con luz policromática ($\lambda_{irr} = 530-800 \text{ nm}$) a diferentes tiempos siguiendo la fotoreacción mediante espectroscopia de emisión de fluorescencia ($\lambda_{m\acute{a}x} = 340 \text{ nm}$) (Figura 22.).

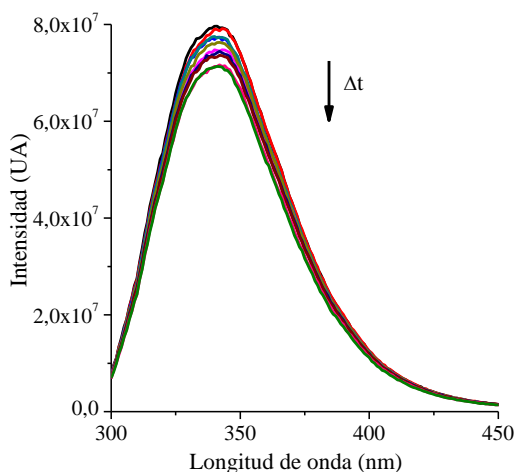


Figura 22. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación para la fotooxidación de L-Trp sensibilizada por $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ en DMF/agua 1% ($\lambda_{irr} = 530-800 \text{ nm}$).

La Figura 23. muestra la gráfica lineal de la cinética de reacción del aminoácido en presencia de los PS correspondiente. Como se observa, en presencia de $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ la velocidad de reacción de fotooxidación de L-Trp es mayor que cuando se utilizan $(NM_3)_4-$

ZnPc⁴⁺ y CF₃(NM₃)₃-ZnPc³⁺. Por otra parte, M₄-ZnPc presenta una mayor cinética de fotodescomposición del sustrato. Los resultados obtenidos eran esperados debido a que, tanto (NM₃)₄-ZnPc⁴⁺ y CF₃(NM₃)₃-ZnPc³⁺ no presentan estado monomérico cuando están disueltos en DMF, lo cual provoca una disminución en la generación de ROS [32,73,79-80].

Los valores de k_{obs} para la descomposición de L-Trp se calcularon obteniendo resultados similares para M₄-ZnPc y A(NM₃)₃-ZnPc³⁺. Dichos Ps mostraron una cinética de reacción mayor que (NM₃)₄-ZnPc⁴⁺ y CF₃(NM₃)₃-ZnPc³⁺. La molécula tetracatiónica exhibió una constante de descomposición del aminoácido 50 % menor al de M₄-ZnPc y A(NM₃)₃-ZnPc³⁺, mientras que, CF₃(NM₃)₃-ZnPc³⁺ tuvo una mayor notoriedad en la diferencia de k_{obs} (Tabla 3).

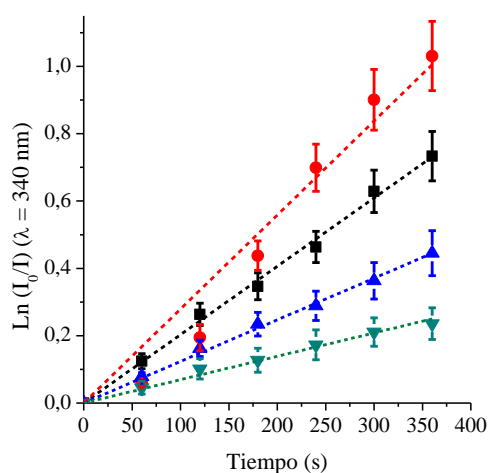


Figura 23. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de L-Trp (20 μM) sensibilizada por M₄-ZnPc (●), A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ (■), (NM₃)₄-ZnPc⁴⁺ (▲), CF₃(NM₃)₃-ZnPc³⁺ (▼) (λ_{irr} = 530-800 nm) en DMF/agua 1%.

Tabla 3. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de L-Trp (k_{obs}) en DMF/agua 1% (λ_{irr} = 530-800 nm)

Ftalocianinas	k_{obs} (s ⁻¹)
CF ₃ (NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺	(6,94±0,07)x 10 ⁻⁴
A(NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺	(2,03±0,02)x 10 ⁻³
(NM ₃) ₄ -ZnPc ⁴⁺	(1,24±0,01)x 10 ⁻³
M ₄ -ZnPc	(2,79±0,03)x 10 ⁻³

Posteriormente, se estudió el efecto fotodinámico analizando la descomposición del aminoácido en presencia de A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ y M₄-ZnPc, irradiando en intervalos de 6 min,

con luz monocromática ($\lambda_{irr}= 680 \text{ nm}$) por un período de 1 h. A partir del ajuste lineal de la Ecuación 10 se calculó el valor de k_{obs} para la descomposición de L-Trp sensibilizada por $A(NM_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ y $M_4\text{-ZnPc}$ (Figura 24.). A partir de los valores de k_{obs} se pudo observar que el resultado perteneciente al compuesto de referencia es mayor que para $A(NM_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ (Tabla 4). Estos resultados concuerdan a los obtenidos para la fotooxidación de DMA en iguales condiciones experimentales, donde $k_{obs}^{Ref} > k_{obs}^{PS}$. El aminoácido L-Trp puede ser fotodescompuesto eficientemente mediante mecanismo tipo I y II, sin embargo, en este caso la principal especie responsable de la descomposición del sustrato es $O_2(^1\Delta_g)$.

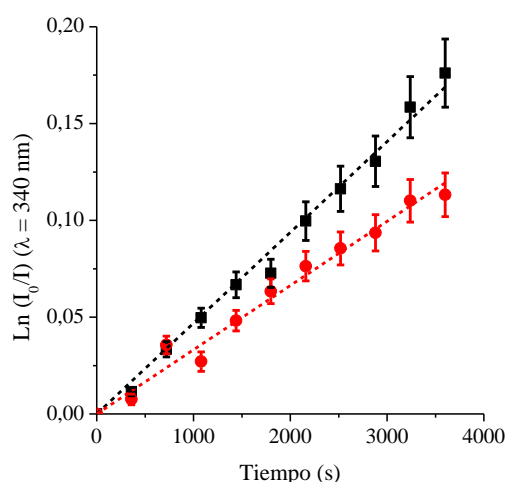


Figura 24. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de L-Trp (20 μM) sensibilizada por $M_4\text{-ZnPc}$ (■) y $A(NM_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ (●) ($\lambda_{irr}=680 \text{ nm}$) en DMF.

Tabla 4. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de L-Trp (k_{obs}) en DMF ($\lambda_{irr}= 680 \text{ nm}$)

Ftalocianinas	$k_{obs} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
$A(NM_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$	$(3,31\pm 0,03)\times 10^{-5}$
$M_4\text{-ZnPc}$	$(4,69\pm 0,05)\times 10^{-5}$

Los estudios de fotooxidación de DMA y L-Trp se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones experimentales (solvente: DMF, $\lambda_{irr}=680 \text{ nm}$). Por tal motivo, es posible determinar el valor de la constante de velocidad de reacción para el L-Trp. A partir de la Ecuación 3 y la Ecuación 8, se obtiene Ecuación 11:

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

Ecuación 11

Debido a que la reposición de oxígeno es más rápida que la reacción de fotooxidación llevada a cabo, en las condiciones de trabajo las concentraciones de $O_2(^1\Delta_g)$ se mantienen constantes [112], por lo que mediante la Ecuación 12 es posible expresar:

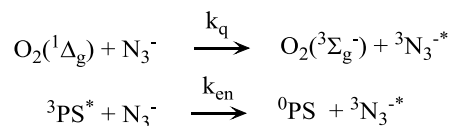
$$k_r^{L-Trp} = \frac{k_{obs}^{L-Trp} k_r^{DMA}}{k_{obs}^{DMA}}$$

Ecuación 12

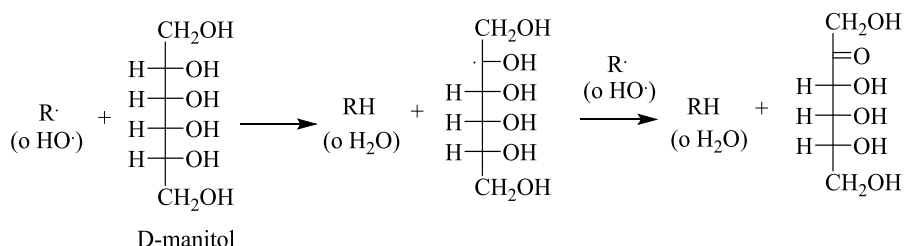
El valor de la constante de reacción para DMA en DMF es conocido ($k_r^{DMA} = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [128]) y a partir del mismo se obtuvo valores de k_r^{Trp} de $(2,9 \pm 0,3) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $(2,7 \pm 0,3) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para $A(NM_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ y $M_4\text{-ZnPc}$ respectivamente [126]. Éstos valores concuerdan con los informados en bibliografía en donde se reportan k_r^{Trp} del orden de 10^7 [129] lo que sugiere que el principal mecanismo que actúa en la fotodescomposición de sustratos es el tipo II.

4.3.4. Estudios de fotooxidación de L-Trp en presencia desactivantes de ROS

Con el objetivo de dilucidar el mecanismo de acción fotodinámica por el cual se descompone el L-Trp, se estudió la fotooxidación de dicho aminoácido en la presencia de atrapadores químicos de ROS, como los son el ion azida (N_3^-) y de D-manitol en DMF/agua 5% [130-131]. El ion azida (N_3^-) es soluble en agua y puede desactivar al $O_2(^1\Delta_g)$ (Esquema 41) por quenching físico ($k_q = 5 \times 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$), indicando la intervención del mecanismo de fotorreacción tipo II [130-131]. Por otra parte, D-manitol actúa como un atrapador de especies radicalarias, tales como O_2^- y OH^\cdot , razón por la cual se utilizó para analizar la participación del mecanismo tipo I (Esquema 42) [132].



Esquema 41. Desactivación del $O_2(^1\Delta_g)$ y del $^3PS^*$ por el ion azida.



Esquema 42. Desactivación de radicales libres por D-manitol.

Mediante el ajuste lineal de la Ecuación 10, se realizó la gráfica y a partir de las pendientes se determinaron las k_{obs}^{Trp} para la descomposición del sustrato, en presencia y en ausencia de atrapadores químicos, sensibilizada por $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ (Figura 25.) (Tabla 5). El agregado del ion azida provoca un efecto protector en la fotodescomposición de L-Trp, lo que se ve reflejado en una disminución del valor de la constante cinética (Tabla 5). Por otro lado, la k_{obs} del aminoácido también disminuye en presencia de D-manitol. Estos resultados indican que la principal especie responsable en el mecanismo de fotoreacción del L-Trp es el $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, sin embargo también existe un contribución de las especies radicalarias del oxígeno lo que conlleva a un aporte del mecanismo tipo I.

Resultados similares se observaron para $\text{Zn}(\text{II})$ 2-[2-(1-adamantil)etoxi]ftalocianina (AZnPc) propuesta como agente fotosensibilizador en células de glóbulos rojos en donde se sugiere que la participación de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ es el principal ROS implicada en el fotohemólisis celular [133]. Además, para el PS catiónico cinc(II) 2,9,16,23-tetrakis[4-(*N*-metilpiridiloxi)]ftalocianina (ZnPpc^{4+}) estudiado para PDI en células de *C. albicans* se observó que el mecanismo tipo II era el principal causante de la PDI [69].

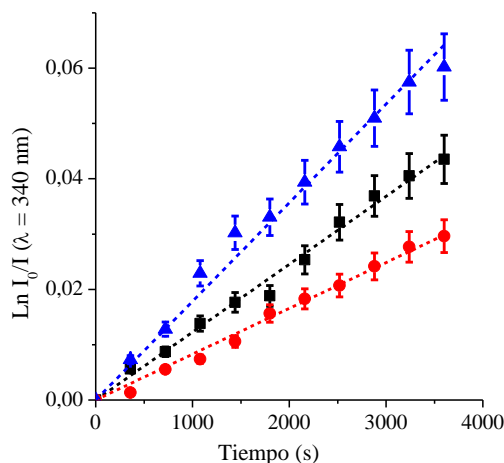


Figura 25. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de L-Trp (20 μM) sensibilizada por A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ (▲), A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ + D-manitol (■) y A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ + azida de sodio (●) (λ_{irr} = 680 nm) en DMF/agua 5%.

Tabla 5. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de L-Trp (k_{obs}) en DMF/agua 5%.

Ftalocianinas	k_{obs}^{L-Trp} (s ⁻¹)	$k_{obs}^{L-Trp+azida}$ (s ⁻¹)	$k_{obs}^{L-Trp+manitol}$ (s ⁻¹)
A(NM ₃) ₃ -ZnPc ³⁺	(1,78±0,02)x 10 ⁻⁵	(8,28±0,08)x 10 ⁻⁶	(1,22±0,01)x 10 ⁻⁵
M ₄ -ZnPc	(9,99±0,09)x 10 ⁻⁵	(8,13±0,08)x 10 ⁻⁶	(1,92±0,02)x 10 ⁻⁵

4.4. Estudios en medios biológicos

4.4.1. Estudios en suspensiones celulares planctónicas

4.4.1.1. PDI de las cepas microbianas

Durante una primera etapa, en PDI de microorganismos se estudió la fotoinactivación de suspensiones celulares de *C. albicans* en PBS, tratadas con CF₃(NM₃)₃-ZnPc³⁺, A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ y (NM₃)₄-ZnPc⁴⁺ (5 μM) por 30 min a 37 °C en oscuridad e irradiadas 5, 15 y 30 min con luz visible. Los experimentos control permiten observar que la viabilidad de *C. albicans* no fue afectada con iluminación sin el PS ni por incubación en la oscuridad con la concentración utilizada de cada PS. Esto indica que la mortalidad celular obtenida luego de la irradiación de los cultivos tratados con las ftalocianinas es debido al efecto fotosensibilizador del agente, producto de la luz visible.

La Figura 26. muestra que la molécula A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ generó una PDI de ~5 log con el menor tiempo de irradiación (5 min), valor que se mantuvo constante al aumentar el tiempo de irradiación. Sin embargo, la viabilidad de *C. albicans* no se vió afectada, luego de

la irradiación de 30 min en presencia de $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ ($5 \mu\text{M}$), observándose valores de PDI de $\sim 0,5 \log$. Por otra parte, el fotosensibilizador $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$ generó una disminución de la viabilidad celular de $\sim 2 \log$ con el mayor tiempo de irradiación. La escasa efectividad de los PS $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ y $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$ se debe a que estas moléculas no generan ROS por lo cual no presentan efecto en PDI de *C. albicans*.

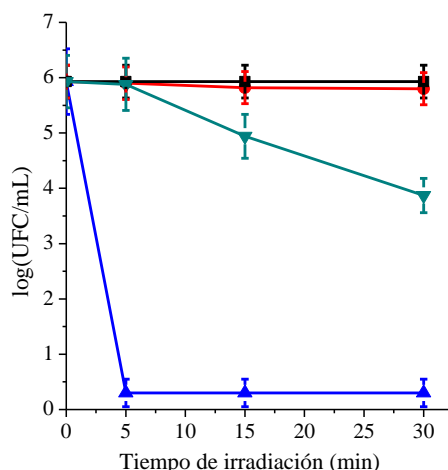


Figura 26. PDI de *C. albicans* sensibilizada con $5 \mu\text{M}$ de sensibilizadores $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ (●), $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ (▲) y $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$ (▼) a distintos tiempos de irradiación (5, 15 y 30 min). Control irradiación (■).

A partir de los resultados mostrados en la Figura 26. , se evaluó la inactivación fotodinámica de células de *C. albicans*, *S. aureus* y *E. coli* generada por la molécula tricatiónica $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ en diferentes condiciones experimentales. La elección de dicho PS corresponde a la eficiencia en PDI y a sus prominentes propiedades fisicoquímicas presentadas en comparación con las moléculas $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ y $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{4+}$. Además, los estudios para la determinación de la localización y unión del PS a células microbianas se realizaron también sólo con la molécula $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$.

Los experimentos de PDI se llevaron a cabo variando la concentración de PS ($1,0$; $2,5$ y $5,0 \mu\text{M}$) y los tiempos de irradiación (5 , 15 y 30 min para *C. albicans* y *E. coli* y 2 , 5 y $15 \mu\text{M}$ para *S. aureus*). Los ensayos control muestran que la viabilidad de las células microbianas no se vio afectada solo con iluminación sin presencia del PS o por incubación en oscuridad en presencia de PS. Esta característica indica que la disminución de la viabilidad obtenida sólo se debe a la presencia del PS en conjunto con el tratamiento de irradiación.

En estas condiciones de trabajo se logró observar que la PDI de *C. albicans* y *E. coli* son dependientes de la concentración de PS y de los tiempos de irradiación utilizados. Sin embargo, para células de *S. aureus* los resultados indican que el PS $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ presenta una alta efectividad frente a bacterias Gram positivas provocando la erradicación total de las mismas en todas las condiciones experimentales estudiadas (Figura 27.).

La Figura 27. A muestra que $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ a la máxima concentración analizada (5 μM), generó una PDI de *C. albicans* de ~ 5 log con el menor tiempo de irradiación (5 min). Al aumentar el tiempo de irradiación hasta 30 min, se logró obtener una inactivación de 4,5 log con la menor concentración utilizada (1 μM). Un comportamiento similar fue observado para $ZnPc^{4+}$ utilizando distintas concentraciones y tiempos de irradiación. Las células tratadas con 1 μM disminuyeron la supervivencia celular en ~ 4 log luego de 30 min de irradiación [134].

El efecto de PDI células de *S. aureus* utilizando el PS mostró una eficiencia mayor al 99,999 %, la cual resultó independiente de las concentraciones de fotosensibilizador y los tiempos de irradiación utilizadas en los tratamientos (Figura 27. B).

La inactivación fotodinámica de *E. coli* utilizando a $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ presentó una leve dependencia en relación con la concentración de PS y el tiempo de irradiación utilizado. La Figura 27. C permite observar una disminución de la viabilidad celular de ~ 6 log para concentraciones de 2,5 μM y 5,0 μM de PS. Sin embargo, para la concentración 1 μM a 5 min de irradiación, la disminución observada es de $\sim 3,5$ log incrementándose a ~ 6 log a tiempos de irradiación mayores.

Los resultados obtenidos concordaron con lo esperado, debido a la gran diferencia existente en la composición de las membranas celulares de *S. aureus* y *E. coli*. Por otro lado, la bacteria Gram negativa presentó un comportamiento similar al de las células fúngicas en todas las condiciones de tratamiento utilizadas (concentración y tiempo de irradiación). El PS utilizado para PDI logró una disminución de ~ 3 log para *E. coli* y *C. albicans* para la menor concentración y el menor tiempo de irradiación (1 μM y 5 min de irradiación), mientras que para la bacteria Gram positiva el efecto fue mayor. Esto se debe a que *S. aureus* permite, por su estructura celular, una mejor interacción del fotosensibilizador con la membrana (mayor permeabilidad). Es por ello, que se observó una eficiencia de PDI de $\sim 99,999\%$ con las condiciones más leves de tratamiento (1 μM y 5 min de irradiación).

El comportamiento exhibido por $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ en PDI frente a *S. aureus* y *E. coli* resultó ser más eficiente que el reportado para otros PSs tetra catiónicos cinc(II) tetrametiltetrapiridino[3,4-b:3',4'-g:3'',4'''-l:3''',4''''-q]porfirazina ($ZnAPc^{4+}$), $ZnPPc^{4+}$ y cinc(II) 2,9,16,23-tetrakis[2-(N,N,N-trimetilamino)etoxi] ftalocianina ($ZnEPc^{4+}$) [72]. En estos casos, luego de 10 min de irradiación presentaron una disminución de la viabilidad celular de *E. coli* de ~ 1,5 log, 2,5 log y 3,5 log para $ZnAPc^{4+}$, $ZnPPc^{4+}$ y $ZnEPc^{4+}$ respectivamente, con una concentración de PS de 2 μM . Resultados similares mostraron las ftalocianinas tetra-catiónicas frente a células de *Streptococcus mitis* [72].

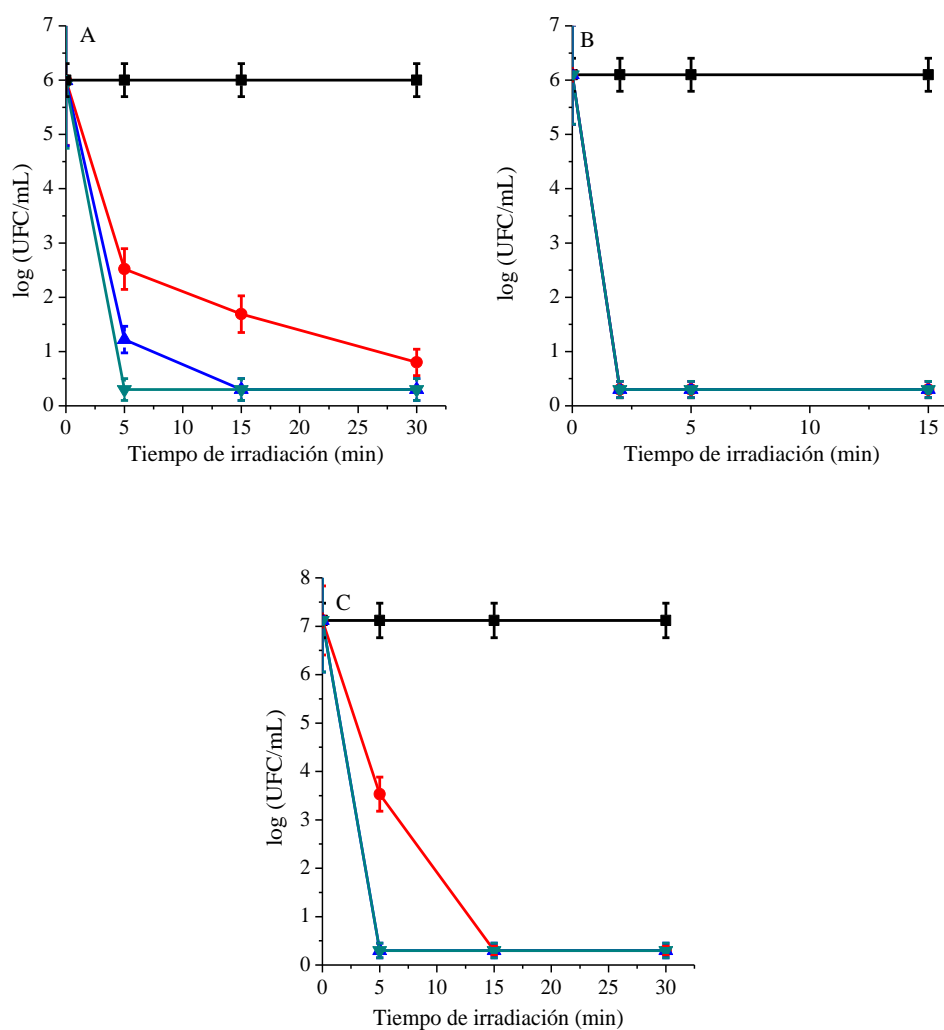


Figura 27. PDI de (A) *C. albicans*, (B) *S. aureus* y (C) *E. coli* sensibilizadas por $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ a diferentes concentraciones 1,0 μM (●), 2,5 μM (▲) y 5,0 μM (▼) a distintos tiempos de irradiación (2, 5 y 15 min para *S. aureus* y 5, 15 y 30 min para *C. albicans* y *E. coli*). Control irradiación (■).

Por otro lado, se evaluó la eficiencia en PDI con una concentración de 2,5 μM de $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ y un tiempo de irradiación de 5 min en células de *C. albicans* luego de una y dos etapas de lavados. Como se observa en la Figura 28. se genera una PDI de ~1,5 log en

ausencia de lavados. Luego de los distintos tratamientos con lavados, se obtuvieron valores de supervivencia celular similares al valor anteriormente mencionado. Estos resultados indican que $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ se encuentra fuertemente unido o incorporado a las células y es difícil removerlo incluso luego de dos etapas de lavado.

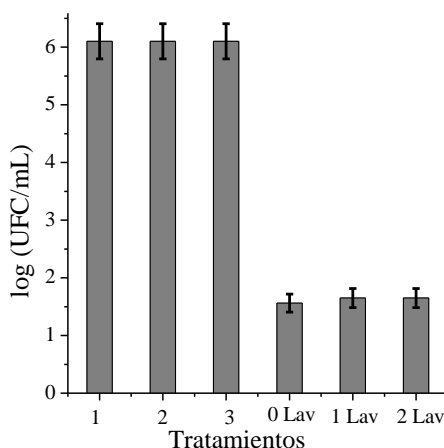


Figura 28. PDI de *C. albicans* sensibilizada por $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ 2,5 μ M, expuesta a diferentes etapas de lavados y a 5 min de irradiación con luz visible, luego de 30 min de incubación previa. 1) Control de células; 2) células en ausencia de $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ e irradiadas; 3) células tratadas con $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ y mantenidas en la oscuridad.

Una respuesta similar fue generada con la ftalocianina con $ZnPPc^{4+}$ la cual se encuentra fuertemente unida a las células ya que, a una concentración de 5 μ M y distintas etapas de lavados, el efecto fotodinámico solo disminuyó en ~ 1 log con respecto a las células en ausencia de lavados [135].

4.4.1.2. Estudios de la localización intracelular del fotosensibilizador

El análisis de las suspensiones de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL), *S. aureus* y *E. coli* ($\sim 10^8$ UFC/mL), tratadas con $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ por 10 min de incubación se realizó mediante microscopia confocal de fluorescencia. Ésta técnica permitió determinar la distribución intracelular del PS. En la Figura 29. es posible observar la fluorescencia roja del fotosensibilizador $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ en las células microbianas.

Estos estudios permitieron comprobar que el agente $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ se localizó preferentemente en la membrana celular de *C. albicans* (Figura 29. A). Resultados similares se reportaron para la porfirinas catiónica 5-fenil-10,15,20-Tris(*N*-metil-4-piridil) porfirina (TriP), donde es posible observar la fluorescencia roja del PS en la periferia de las células de *C. albicans* sin detectarse ninguna fluorescencia en el interior de las mismas [134]. Las Figura 29. B y C muestran la distribución de la molécula de PS en células bacterianas.

Debido al tamaño de las bacterias, sólo se visualizan esferas rojas para las células de *S. aureus* y bastones rojos para *E. coli*, lo que no permite identificar el lugar exacto de localización del PS.

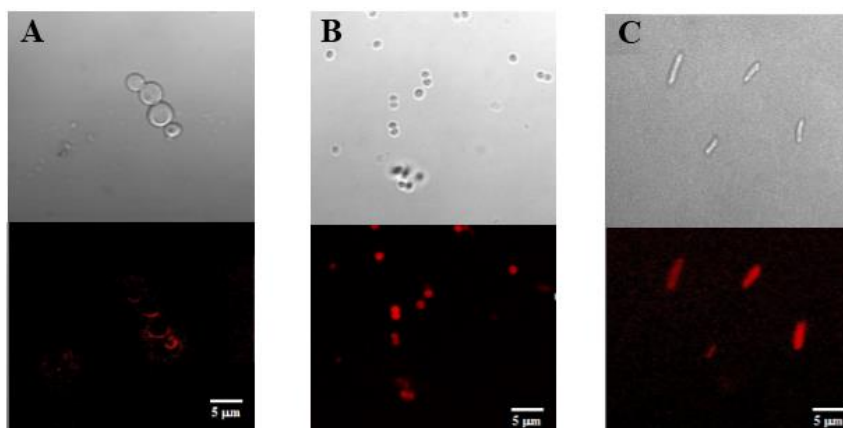


Figura 29. Localización de $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ 5 μM en células de (A) *C. albicans*, (B) *S. aureus* y (C) *E. coli*: controles en campo claro (imagen superior) y fluorescencia de $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ (roja) (imagen inferior).

4.4.1.3. Unión del fotosensibilizador a las células microbianas

La capacidad de unión de $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ a células de *C. albicans*, *S. aureus* y *E. coli* se analizó en suspensiones celulares de $\sim 10^6$ UFC/mL para las células fúngicas y $\sim 10^8$ UFC/mL para células bacterianas, en PBS. Los cultivos microbianos se incubaron con diferentes concentraciones del PS (1,0, 2,5 y 5,0 μM) a diferentes tiempos de incubación (2, 5 y 15 min) a 37 °C en la oscuridad. La concentración intracelular del PS se determinó por espectroscopia de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 660$ nm). La Figura 30. muestra una cinética de unión rápida a tiempos cortos de incubación (2 min) del PS a las células microbianas para las diferentes concentraciones analizadas con valores máximos de 0,28, 0,49 y 0,76 nmol/ 10^6 células de *C. albicans*, 0,36, 1,20 y 1,48 nmol/ 10^8 células para *S. aureus* y 0,35, 1,36 y 2,04 nmol/ 10^8 células para *E. coli*, para 1,0, 2,5 y 5,0 μM de PS, respectivamente.

Un efecto similar se observó para la ftalocianina $ZnPPc^{4+}$ (5 μM) en suspensiones celulares de *C. albicans*, la cual presenta una cinética de unión muy rápida a las células a cortos tiempos de incubación, alcanzando un valor máximo de unión a las células de $\sim 1,77$ nmoles/ 10^6 células para 5 μM y un valor de $\sim 4,46$ nmoles/ 10^6 células para 10 μM a los 15 min [135].

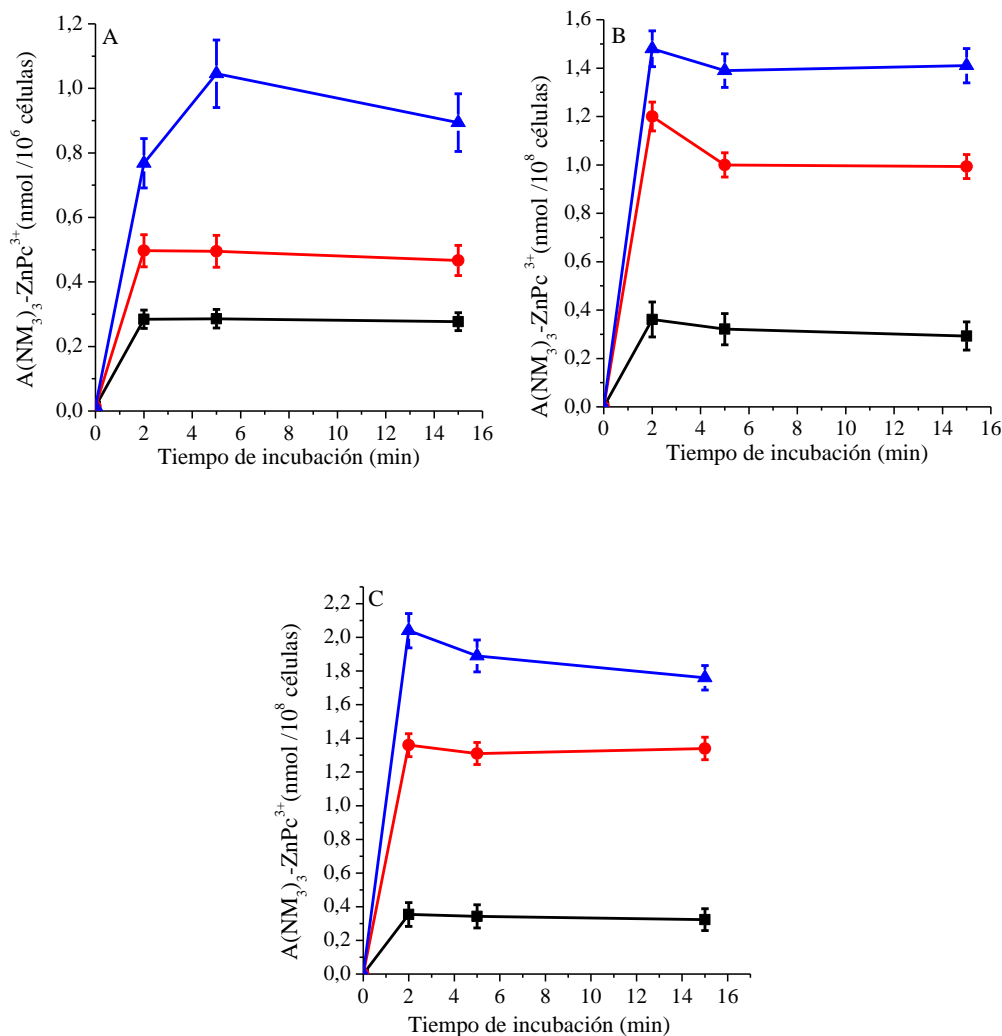


Figura 30. Cantidad de $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ recuperada de células de (A) *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL), (B) *S. aureus* y (C) *E. coli* ($\sim 10^8$ UFC/mL) tratadas con 1,0 μM (■), 2,5 μM (●) y 5,0 μM (▲) del sensibilizador a diferentes tiempos de incubación a 37°C.

Posteriormente, se evaluó la unión celular después de diferentes etapas de lavados para eliminar el exceso de fotosensibilizador que no se une eficazmente a las células, a una concentración de 2,5 μM de $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ y 30 min de incubación a 37 °C. Luego de los distintos tratamientos, se observó que la cinética de unión a células de *C. albicans* no se ve afectada (Figura 31. A), indicando así que el PS se encuentra fuertemente unido a las células fúngicas o incorporado dentro de ellas, resultados que concuerdan con los obtenidos en la Figura 29.

Las Figura 31. B y C permiten observar que la unión o incorporación entre el PS y las células bacterianas es muy eficiente, estos datos coinciden con los obtenidos en la Figura 29. El comportamiento observado para células bacterianas se mostró similar a aquel obtenido en

los estudios de unión o incorpora con células de *C. albicans*. La molécula tricatiónica $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ presenta una adecuada estructura anfifílica que le permite una eficiente interacción con las membranas tanto de las células bacterianas como de células fúngicas. En los tres casos estudiados se obtuvo un incremento en la interacción de PS con las células a medida que la concentración aumentaba (de 1 μM a 5 μM). La incorporación de la molécula fue muy efectiva a tiempos cortos de incubación con las células microbianas y además la presencia de tratamientos de lavados sucesivos afectaron levemente la unión de $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ a las células. Luego del tratamiento con una y dos etapas de lavado, en suspensiones celulares de *E. coli* sólo el 13 % del PS se pierde. Sin embargo, en células de *S. aureus* el porcentaje de molécula de $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ perdido aumenta de un 11% a 22% a medida que los tratamientos con lavado se incrementan, posiblemente debido a que la membrana de las bacterias Gram positivas presenta una mayor permeabilidad que las bacterias Gram negativas. Estos resultados indican que la molécula $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ se une eficientemente a las células microbianas y que es un interesante agente fotosensibilizante para ser utilizado en PDI.

Estos resultados concuerdan con los reportados para $ZnPPc^{4+}$ en células de *C. albicans* donde bajo dos etapas de lavados sólo se pierde el 12 % del PS [135]. La cantidad de ftalocianina $ZnPPc^{4+}$ expresada en $nmol/10^6$ células disminuyó levemente cuando las células fueron lavadas con PBS. Luego de 15 min de incubación y de las etapas de lavado los valores disminuyeron de 1,7 y 4,4 $nmol/10^6$ células a 1,4 y 3,8 $nmol/10^6$ células, con 5 y 10 μM de PS respectivamente [135]. Estos resultados pueden ser comparados, a su vez con los obtenidos utilizando una porfirina tetracatiónica TMAP⁴⁺ (5,10,15,20-tetra(4-trimetilamoniofenil)porfirina *p*-tosilato) con la cual se obtuvieron valores de unión de 1,35 $nmol/10^6$ células cuando fueron incubadas con 5 μM de la porfirina durante 30 min. Del mismo modo se obtuvo una unión de 1,70 $nmol/10^6$ células utilizando la porfirina 5,10,15,20-tetra(4-*N*-metilpiridil)porfirina (TMPyP) [136].

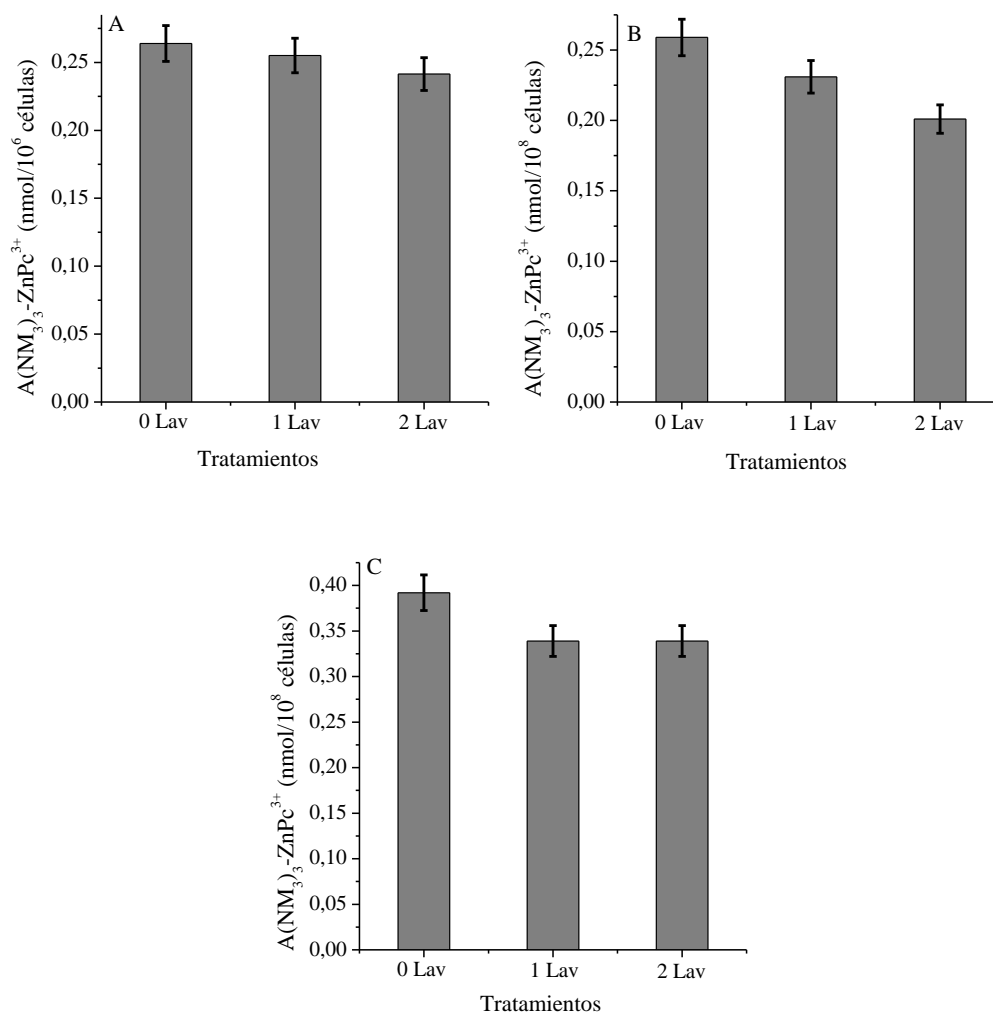
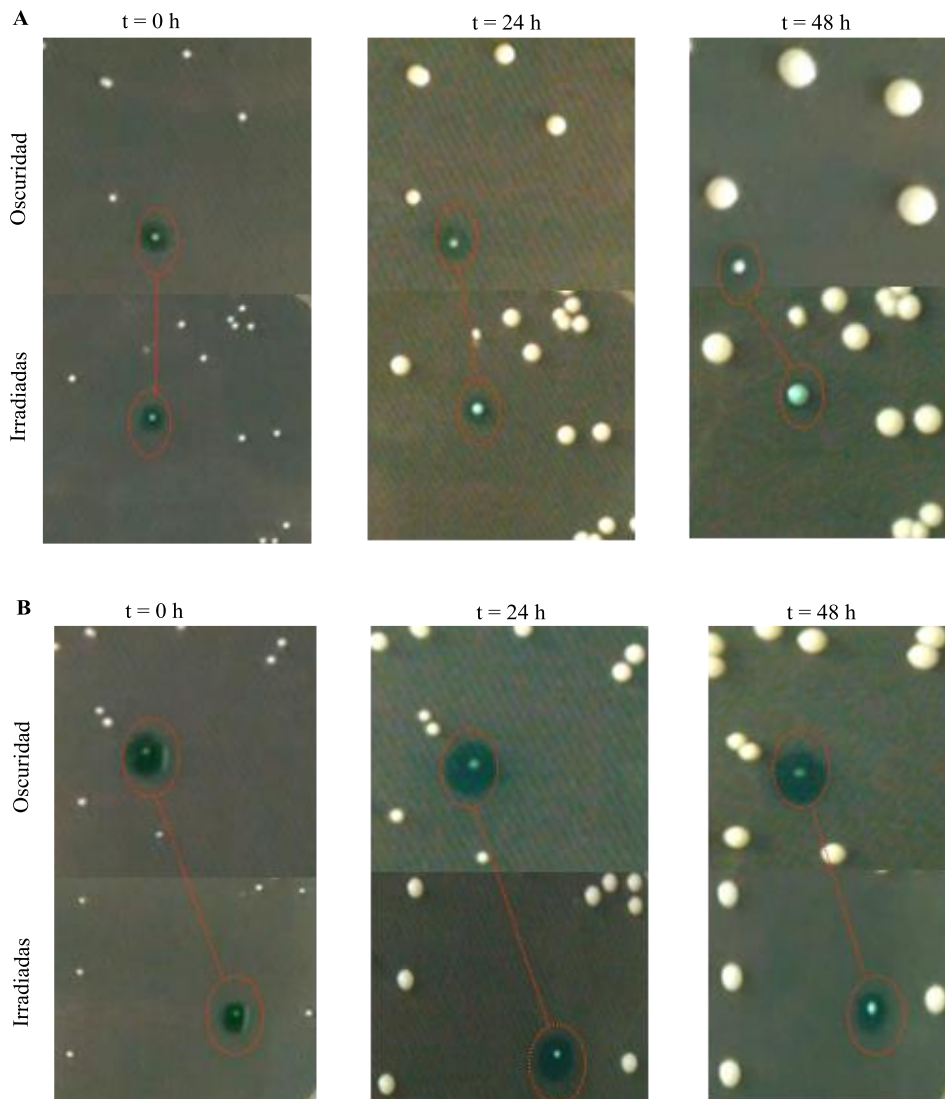


Figura 31. Cantidad de A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ recuperada de células de (A) *C. albicans* (~ 10⁶ UFC/mL), (B) *S. aureus* y (C) *E. coli* (~ 10⁸ UFC/mL) tratadas con 2,5 μM incubadas 15 min a 37 °C y expuesta a diferentes etapas de lavados (0 Lav, 1 Lav y 2 Lav).

4.4.2. Inactivación fotodinámica de *C. albicans* creciendo en colonias sobre agar

Como estudio complementario, la actividad fotodinámica de A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ se evaluó en colonias de *C. albicans* sobre AS. Así, una dilución apropiada de una suspensión celular de *C. albicans* en PBS se sembró en placas de AS para obtener colonias pequeñas (~1 mm de diámetro) separadas entre sí. Los cultivos se incubaron toda la noche a 37°C y fueron tratados con 1, 5 y 10 nmol de A(NM₃)₃-ZnPc³⁺. Las distintas cantidades del PS se distribuyeron homogéneamente sobre las colonias. Luego, las placas fueron irradiadas con luz visible por 3 h y se incubaron a 37°C en oscuridad. El retardo en el crecimiento de las colonias de *C. albicans* sobre AS fue evidenciado claramente para las colonias tratadas con las diferentes concentraciones de A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ con respecto al control en oscuridad o al control sin sensibilizador. Un incremento comparable en el tamaño de la colonia se obtuvo

para los tres experimentos controles. Por otro lado, se generó un retardo en el crecimiento de las colonias tratadas, luego de 24 y 48 h posteriores a la irradiación (Figura 32.). Los tratamientos con 1 y 5 nmol de $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ no resultaron tóxicos en la oscuridad, sin embargo un resultado opuesto se obtuvo con 10 nmol de PS en iguales condiciones. No se observó un crecimiento en las colonias tratadas aún después de 48 h de incubación. Por lo tanto, el retardo del crecimiento observado después de la irradiación de los cultivos conteniendo $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ es debido al efecto de fotosensibilización del agente.



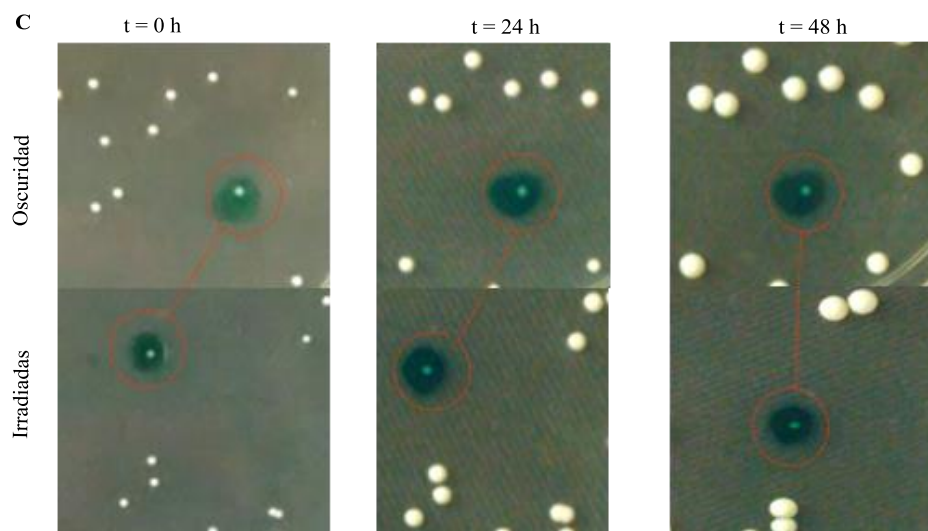


Figura 32. Crecimiento de colonias de *C. albicans* en AS tratadas con (A) 1 nmol, (B) 5 nmol y (C) 10 nmol de $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ e irradiadas con luz visible (30 mW/cm^2) por 3 h.

Un efecto similar se observó con las porfirinas catiónicas TFAP³⁺ (yoduro de 5-(4-trifluorfenil)-10,5,20-tris(4-trimetilamoniofenil)porfirina) y TMAP⁴⁺ al tratar las colonias con diferentes cantidades (2,2 – 8,8 nmol) [137] y con TMPyP 9,0 nmol [136] en *C. albicans*. En dichos estudios, no se evidenció un incremento en el tamaño de las colonias tratadas, indicando que el retardo de crecimiento obtenido luego de la irradiación de los cultivos se debió al efecto fotosensibilizador del agente producido por la luz visible.

Los principales resultados presentados indican que el PS $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ es efectivo para ser aplicado en el tratamiento de *C. albicans*, generando una PDI adecuada a cortos tiempos de incubación e irradiación y a bajas concentraciones. Además, posee una cinética de unión muy rápida a tiempos cortos de incubación. La presencia de lavados durante el tratamiento no afecta la efectividad de unión del PS a la células, lo cual indica que $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ se mantiene fuertemente unida o incorporada dentro de la célula y es difícil eliminarla. Debido a esto, tampoco se ve afectada la eficiencia del tratamiento de PDI. Estos resultados indican que $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$, bajo las condiciones analizadas, podría ser un potencial fotosensibilizador para inactivar *C. albicans*, entre otros microorganismos.

4.4.3. Inactivación fotodinámica de biopelículas microbianas

4.4.3.1. PDI de biopelículas de *C. albicans*

Los microorganismos que se encuentran en una comunidad organizados por la formación de biopelículas, adheridos a una superficie biótica o abiótica, e incrustados en una

matriz polimérica extracelular, han sido los causantes de innumerables problemas para la salud humana [45,49,138]. La formación de las biopelículas genera numerosas enfermedades, ya que estos actúan de tal modo que las interacciones intercelulares aumentan como también la presencia de grupos celulares individuales [138]. Una problemática importante que se presenta ante la presencia de biopelículas, es que estas exhiben defensa contra la acción del sistema inmune y resistencia aún 1000 veces mayor que aquellas infecciones microbianas causadas por células planctónicas [45,49,138].

En este sentido, *C. albicans* se encuentra entre los hongos predominantes que causan las infecciones humanas. Cerca del 80 % de las infecciones causadas por *C. albicans* se encuentran en el tracto intestinal de adultos y un 20 % en las regiones genitourinaria de mujeres [138]. Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos, este hongo al encontrarse viviendo en la cavidad oral y el tracto gastrointestinal genera candidiasis debido a sus numerosos factores de virulencia [139]. En particular, la transición de la levadura a la hifa hace que sea fácil invadir la mucosa oral y escapar de la acción inmune, razón por la cual la cavidad oral es un sitio propicio para la formación de biopelículas de *C. albicans* [138].

Como se mencionó anteriormente, la formación de biopelículas microbianas ocasiona que la resistencia a antibióticos aumente, es por ello que es necesario el desarrollo de terapias alternativas para el control de estos patógenos. Por lo tanto, la inactivación fotodinámica (PDI) aparece como una posible estrategia para el control de infecciones causadas por biopelículas [138].

La PDI de biopelículas formados por *C. albicans* se evaluó utilizando dos fotosensibilizadores derivados de ftalocianinas, $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ y $ZnPPc^{4+}$ [77]. Las células fúngicas ($\sim 10^7$ UFC/mL) se incubaron en policubetas durante 36 horas para lograr la eficiente formación de la biopelícula sobre las paredes de los pocillos. Posteriormente, los PS a distintas concentraciones (5 μM y 10 μM) se incubaron durante 30 min en oscuridad a 37°C y se irradiaron por diferentes períodos de tiempo (30 min y 60 min). La viabilidad de *C. albicans* no se vio afectada por la iluminación sin el fotosensibilizador o por incubación en la oscuridad con las concentraciones analizadas de cada PS. Estos resultados se observaron en los experimentos control. Por tal motivo, el efecto ocasionado en las biopelículas post tratamiento de PDI se debe a la combinación del PS y la luz visible.

La Figura 33. muestra el efecto de la PDI de biopelículas de *C. albicans* tratados con $A(NM_3)_3-ZnPc^{3+}$ y $ZnPPc^{4+}$ a diferentes concentraciones y tiempos de iluminación. El PS

tricatiónico generó una disminución en la viabilidad celular de $\sim 2,6$ log a la concentración más alta utilizada para el tratamiento ($10 \mu\text{M}$) y a 60 min de irradiación. Por su parte, la molécula ZnPPc^{4+} mostró una disminución en la viabilidad celular de $\sim 3,3$ log en iguales condiciones. Además, ambos PS manifestaron una dependencia con respecto al resultado de PDI con el aumento en la concentración y del tiempo de irradiación.

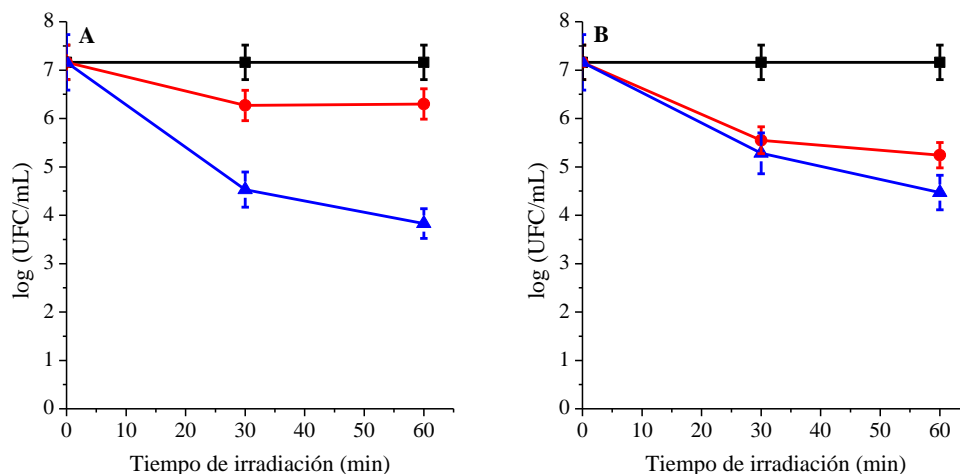


Figura 33. PDI de biopelículas de *C. albicans* sensibilizada por (A) ZnPPc^{4+} y (B) $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ a distintas concentraciones y tiempos de irradiación (30 y 60 min). $5 \mu\text{M}$ de los PS (●), $10 \mu\text{M}$ (▲). Control irradiación (■).

En comparación con los valores obtenidos en el tratamiento de PDI de *C. albicans* en suspensiones celulares planctónicas, la eficiencia del tratamiento de biopelículas de dicho microorganismo resultó menor. Se observó una disminución de la viabilidad celular del hongo mayor al $\sim 99,99$ % para $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ y ZnPPc^{4+} utilizando $5 \mu\text{M}$ e irradiando suspensiones celulares planctónicas, durante 30 min [135]. Mientras que para el tratamiento de biopelículas se obtuvo una disminución de ~ 38 % y ~ 47 %, para $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ y ZnPPc^{4+} respectivamente, manifestando una menor fotoinactivación del hongo en las biopelículas. Estos resultados, posiblemente, se deben a la heterogeneidad de la biopelícula, a su compleja estructura (blastoconidias, pseudohifas y hifas), en comparación con las células planctónicas [46,53,138].

La estructura celular de las biopelículas limita la penetración de los PS en el material de la matriz extracelular, reduciendo así la tasa de crecimiento de las células dentro de la biopelícula [138,140]. Además, debido a las características de *C. albicans*, quienes poseen una constitución morfológica particular exhibiendo una pared celular densa debido a la presencia de peptidoglicanos, se genera una interferencia en la penetración y difusión del PS o bien de la luz provenientes del tratamiento. Por este motivo, conduce a una ineficiencia en

el tratamiento de PDI debido a que, tanto la luz como el PS son fundamentales para la generación de ROS, especies causantes del daño celular durante el tratamiento [138].

**Capítulo 5 - Fotosensibilizadores conjugados de ftalocianinas
con polímeros precursores catiónicos para la inactivación
fotodinámica de microorganismos**

5. Resultados y discusiones

Las ftalocianinas son reconocidas como PSs para la inactivación fotodinámica de microorganismos. Aquellas que poseen carga positiva en la periferia del macrociclo tetrapirrólico son más eficientes en PDI debido a la interacción con las membranas de las células microbianas [77,81,108]. La variación de las propiedades anfífilas de las moléculas mediante la incorporación de grupos sustituyentes tales como quitosano y poliaminas es una opción propicia para tal fin, debido a que estos sustituyentes poseen grupos amino alifáticos libres capaces de adquirir cargas positivas a pH fisiológico lo cual mejora la interacción del fotosensibilizador con las células [78,84,91].

Resulta pertinente la elección de los sustituyentes Q y PA para ftalocianinas de simetría A₃B, ya que mejora el carácter anfífilo del PS y además le otorga características promisorias para su utilización en PDI.

5.1. Síntesis de conjugados de ftalocianinas con polímeros precursores catiónicos

Los polímeros utilizados como sustituyentes en ftalocianinas ofrecen la posibilidad de mejorar la solubilidad del PS en medios biológicos [85-86]. Como se mencionó con anterioridad, para los tratamientos de PDI es conveniente utilizar compuestos capaces de adquirir cargas positivas en el medio, en este sentido el Q y PA resultan apropiados para dicha utilización debido al gran número de grupos amino libres que contienen [84]. En numerosas ocasiones, el polímero (Q y PA) puede actuar como vehículo del PS hacia la célula objetivo mejorando la solubilización y la unión a los microorganismos [84-85].

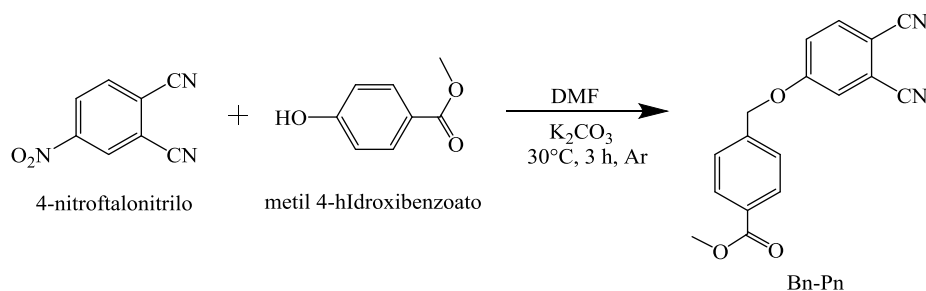
El Q presenta una amplia gama de aplicaciones en los campos de la biomedicina, exhibe actividad antibacteriana y antifúngica, además es biocompatible y biodegradable [84,87-88]. Es un biopolímero hidrófilo con un gran número de grupos hidroxilo y amino libres, éstos últimos pueden protonarse en medios biológicos [87]. Esta propiedad importante del quitosano permite que en medio acuoso pueda interactuar con las membranas celulares incrementando su permeabilidad debido a la interacción de los grupos carbonilos y fosforilos de los fosfolípidos que componen las membranas celulares y los grupos NH₃⁺ del Q [84,87,89].

Por otra parte, la PA posee en su estructura una importante cantidad de grupos amino alifáticos libres que pueden adquirir cargas positivas a pH fisiológico y además, cadenas

alifáticas que le confieren movilidad y flexibilidad a las cargas, mejorando la interacción del fotosensibilizador con las células [91]. Además, las poliaminas interactúan con el resto fosfato de los ácidos nucleicos por la interacción electrostática y por enlaces de hidrógeno [92].

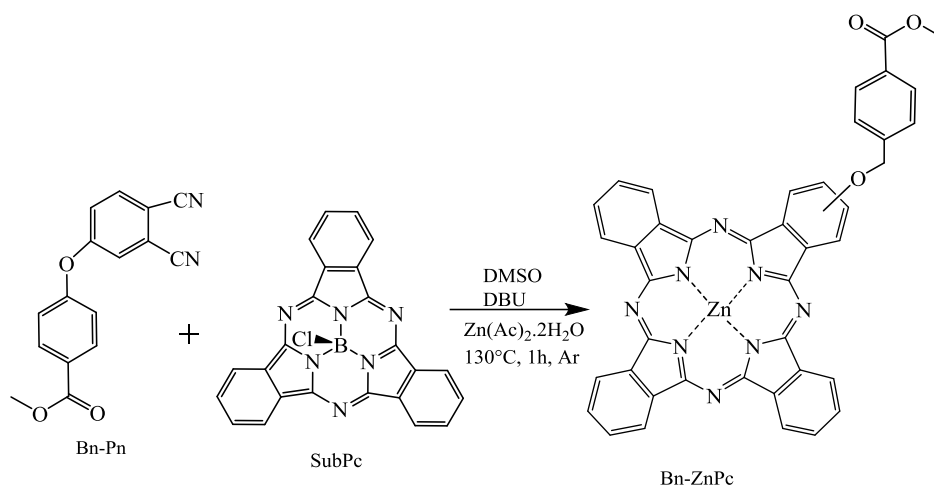
La síntesis ftalocianinas con características anfifílicas de simetría A₃B se llevó a cabo mediante la reacción de expansión del anillo de la subftalocianina sin sustituir. En primera instancia se sintetizó el derivado de ftalonitrilo Bn-Pn a partir de la reacción de sustitución nucleofílica aromática *ipso-nitro* entre el 4-nitroftalonitrilo y metil 4-hidroxibenzoato en medio básico. La presencia del medio básico permite activar las propiedades nucleofílicas del alcohol. La reacción se realizó a temperatura ambiente durante 3 h en DMF (Esquema 43). Posteriormente el producto se precipitó en agua y metanol, se secó a vacío y se obtuvo Bn-Pn con un rendimiento del 73 %.

El sustituyente se eligió estratégicamente debido a que el grupo éster se hidroliza en medio acuoso, bajo catálisis básica o ácida, transformándose en ácido carboxílico y alcohol. La transformación a ácido carboxílico del sustituyente del PS permite la posterior unión de la ftalocianina a los grupos aminos del Q y PA mediante enlaces amida [89,110].



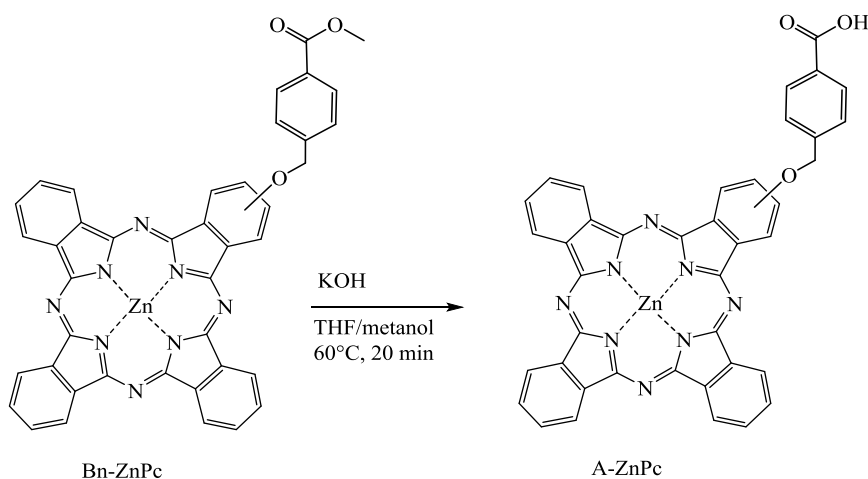
Esquema 43. Síntesis de Bn-Pn

En primera instancia, una mezcla del ftalonitrilo Bn-Pn y DBU en DMSO se llevó a 130 °C bajo agitación constante. Luego de 20 min, se añadió una mezcla de acetato de cinc y SubPc. La reacción se llevó a cabo a 130 °C durante 1 h (Esquema 44). La solución se enfrió a temperatura ambiente y el producto se precipitó con agua, obteniendo un rendimiento de 23 % de Bn-ZnPc.



Esquema 44. Síntesis de Bn-ZnPc.

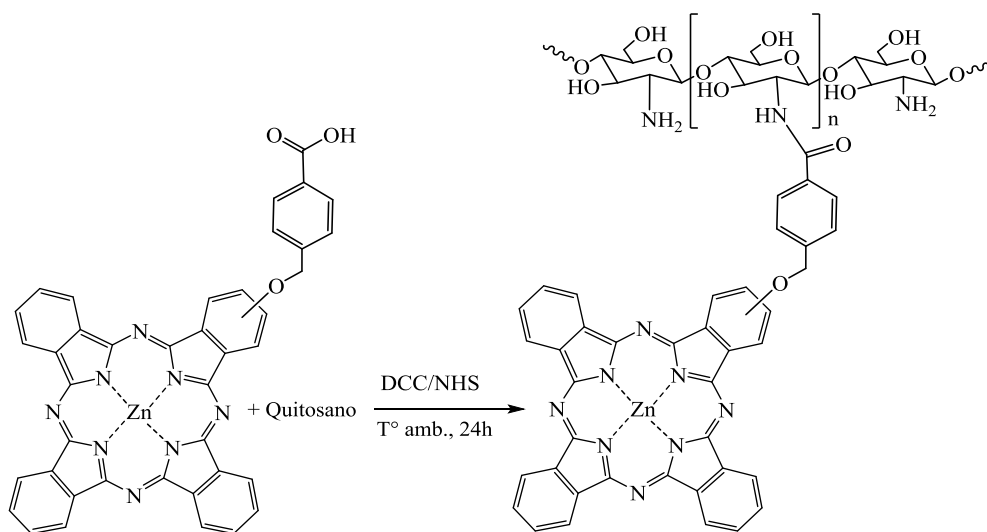
A partir de la ftalocianina Bn-ZnPc se realizó la hidrólisis del grupo éster utilizando medio básico (KOH) en THF/metanol durante 20 min a 60 °C (Esquema 45). Una vez finalizada la reacción, se acidificó hasta un pH ~ 5-6 para lograr la formación del grupo ácido y posteriormente se extrajo con DCM/metanol. El producto A-ZnPc se secó bajo presión reducida obteniendo un rendimiento del 70 % de A-ZnPc.



Esquema 45. Síntesis de A-ZnPc

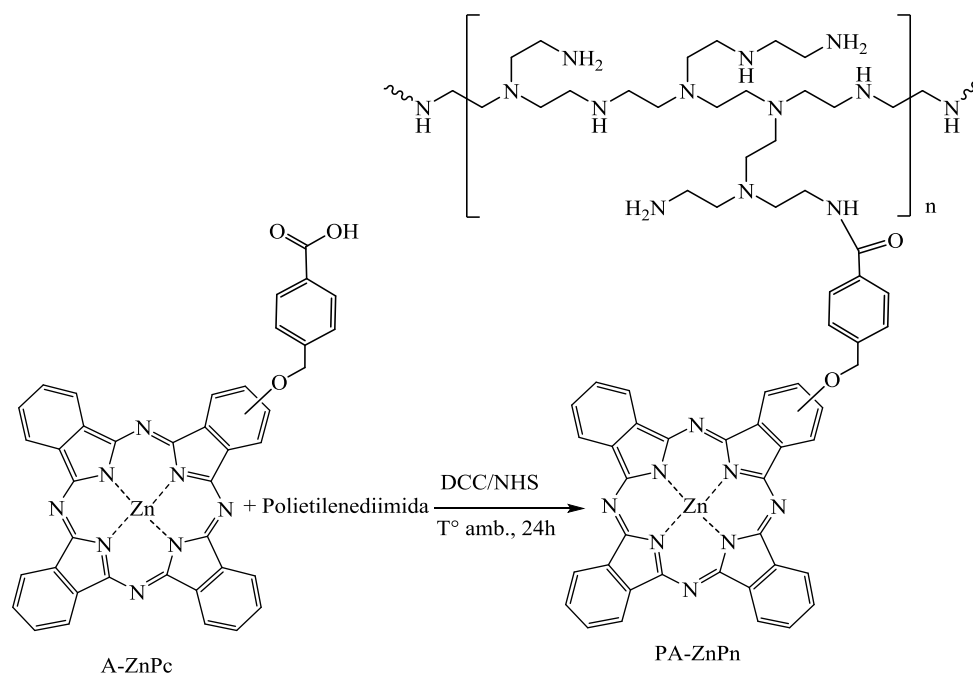
Para la obtención del conjugado de ftalocianina con Q, se disolvió A-ZnPc en DMF y se le añadió DCC con el objetivo de activar el grupo ácido carboxílico que posee la molécula en presencia de catalizador (NHS). La solución se agitó constantemente durante 24 h a temperatura ambiente, y posteriormente se le adicionó el Q disuelto en medio ácido y NHS (Esquema 46). La mezcla se dejó reaccionar durante 24 h a temperatura ambiente y el

producto se purificó mediante la técnica de exclusión por tamaño utilizando una membrana de diálisis en agua durante 72 h.



Esquema 46. Síntesis de Q-ZnPc

La obtención de la ftalocianina PA-ZnPc, sustituida con polietilenimina, se llevó a cabo utilizando la misma metodología de síntesis que para Q-ZnPc. Así, A-ZnPc se disolvió en DMF, se le añadió DCC y se agitó a temperatura ambiente. Luego de 24 se adicionó PA y NHS y se llevó a agitación constante durante 24 h a temperatura ambiente (Esquema 47). La purificación de PA-ZnPc se realizó durante 72 h, mediante la utilización de una membrana de diálisis en agua.



Esquema 47. Síntesis de PA-ZnPc

5.2. Estudios espectroscópicos

Los estudios espectroscópicos se centraron en aquella ftalocianina anfífilica sustituida por el grupo éster (Bn-ZnPc) y en los PS conjugados de ftalocianinas con polímeros (Q-ZnPc y PA-ZnPc). La Figura 34. muestra los espectros de absorción de Bn-ZnPc, Q-ZnPc y PA-ZnPc. Se observan bandas características de la familia de ftalocianinas, las bandas Q a ~ 670 nm para Bn-ZnPc, Q-ZnPc y PA-ZnPc (Tabla 6). Además las bandas Soret se encontraron en la región de ~ 345 nm [89,110]. Las bandas Q obtenidas para los PS son bien definidas y agudas, lo cual indica que las moléculas se encuentran principalmente como monómeros cuando se utiliza DMF como solvente.

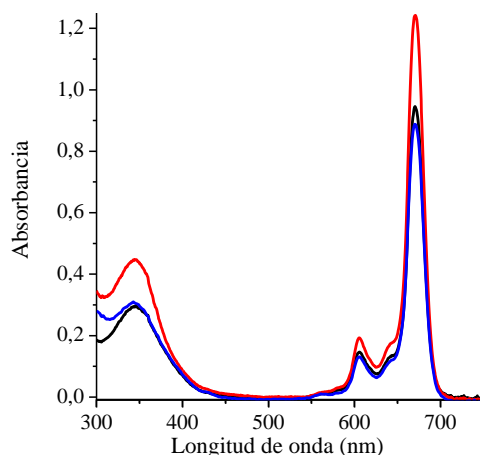


Figura 34. Espectros de absorción de Bn-ZnPc (azul), Q-ZnPc (rojo) y PA-ZnPc (negro) en DMF.

Además, los espectros de absorción de los PS se obtuvieron en solventes con polaridades diferentes, utilizando DMF, DCM, metanol y tolueno para Bn-ZnPc, y DMF, metanol y agua para Q-ZnPc y PA-ZnPc debido a que en DCM y tolueno los conjugados de ftalocianina con polímeros no se solubilizaron. En la Figura 35. A se puede observar el comportamiento de la molécula Bn-ZnPc en los distintos medios. Debido a que las bandas Q y Soret del PS no se ven afectadas por la polaridad de los solventes utilizados, es posible afirmar que el PS no presenta agregación aparente al variar las características del medio. Resultados similares se obtuvieron para Q-ZnPc y PA-ZnPc en DMF y metanol (Figura 35. B y C). Cuando se utilizó metanol como solvente sólo se observó un corrimiento hipsocrómico pequeño del máximo de absorción de la banda Q, para todos los PS estudiados. Los resultados obtenidos de los espectros de absorción para Bn-ZnPc, Q-ZnPc y PA-ZnPc en DMF y metanol, indican que la presencia de los sustituyentes Q y PA no generan modificaciones espectroscópicas observables en los PS.

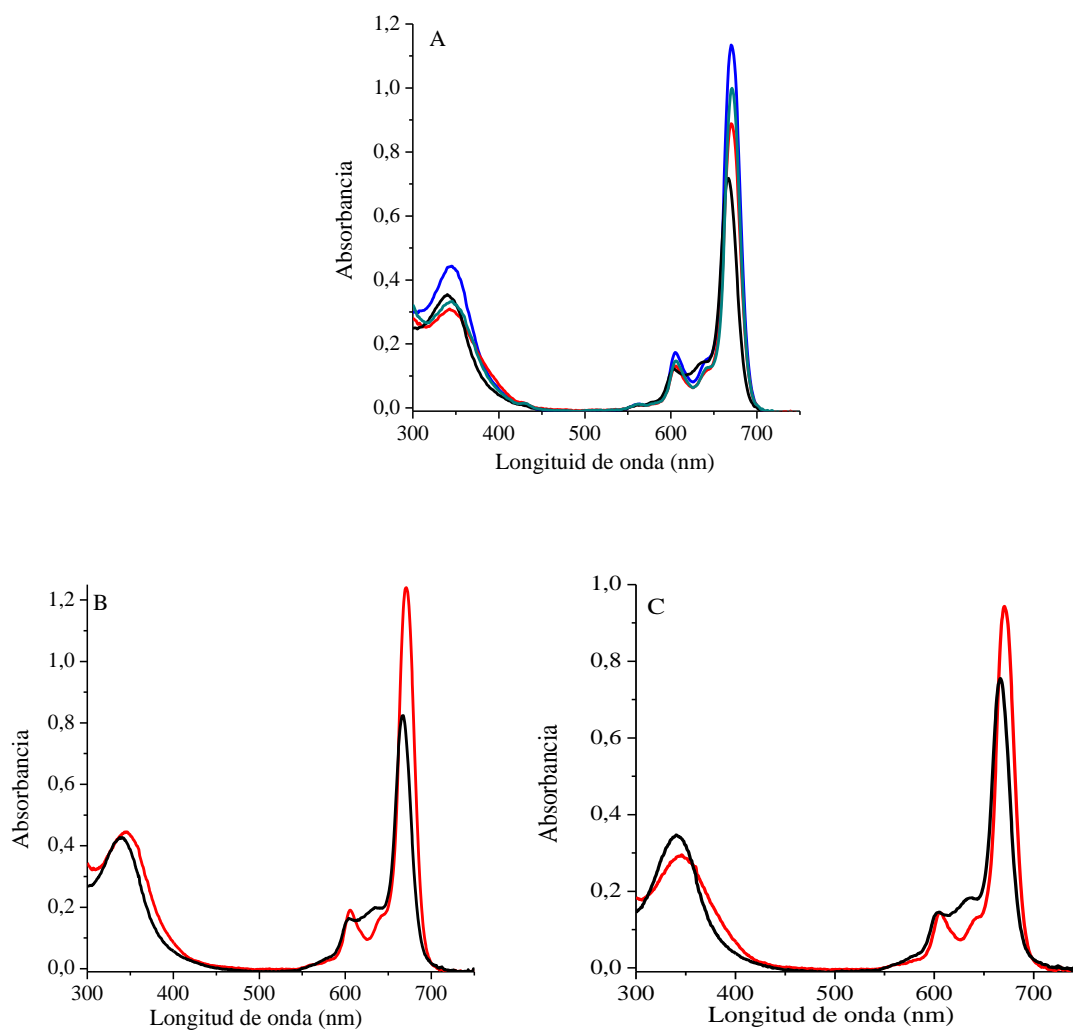


Figura 35. Espectros de absorción de (A) Bn-ZnPc, (B) Q-ZnPc y (C) PA-ZnPc en DMF (rojo), DCM (azul), metanol (negro), tolueno (verde).

Por otra parte, cuando se estudió el comportamiento espectroscópico de Q-ZnPc y PA-ZnPc en agua, se observó la desaparición completa de la banda Q para la ftalocianina con sustituyente PA y un ensanchamiento, en dicha banda, correspondiente a Q-ZnPc (Figura 36.). Estos resultados ponen en manifiesto que ambas moléculas no se encuentran en estado monomérico cuando se utiliza agua como solvente.

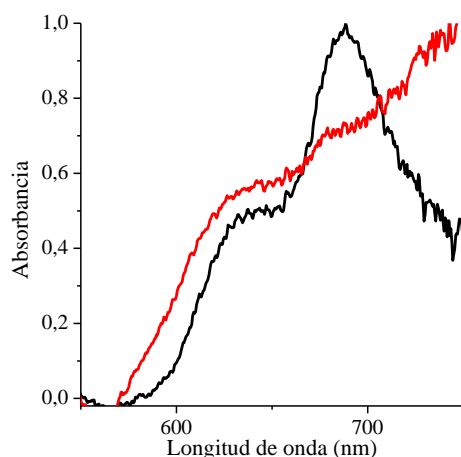


Figura 36. Espectros de absorción de Q-ZnPc (negro) y PA-ZnPc (rojo) en agua.

Los espectros de emisión de los PSs en DMF se observan en la Figura 37. Éstos presentan las bandas características de la familia de ftalocianinas, pertenecientes a las transiciones energéticas $0 \rightarrow 0$. Las condiciones de trabajo se unificaron para todas las moléculas analizadas ($\lambda_{exc} = 610$ nm). En su totalidad, los PSs sintetizados presentaron una emisión de fluorescencia similar a la ftalocianina de referencia M₄-ZnPc.

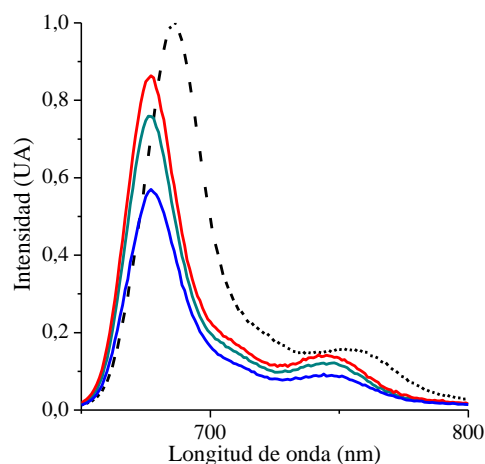


Figura 37. Espectros de emisión de Bn-ZnPc (azul), Q-ZnPc (rojo), PA-ZnPc (verde) y M₄-ZnPc (línea discontinua negra) en DMF ($\lambda_{exc} = 610$ nm).

La Figura 38. muestra los espectros de emisión de los PS en diferentes solventes tales como DMF, DCM, metanol y tolueno para Bn-ZnPc, y DMF y metanol para Q-ZnPc y PA-ZnPc. En la Figura 38. A se observa la emisión de Bn-ZnPc en los solventes anteriormente mencionados, estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos en los estudios de

absorción, lo cual indica que este PS se encuentra principalmente en estado monomérico en los solventes utilizados.

En las Figura 38. B y C se observan los espectros de emisión de Q-ZnPc y PA-ZnPc respectivamente, mostrando un pequeño corrimiento batocrómico de la longitud de onda en el máximo de emisión cuando se utilizó metanol como solvente para ambos PS. Estos resultados confirman que los PS se encuentran en estado monomérico en los solventes utilizados (DMF y metanol).

A partir de los datos recopilados en los espectros de emisión y en comparación con la ftalocianina de referencia utilizada (M_4 -ZnPc), se calcularon los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) en DMF [81]. Estos valores de Φ_F son propicios para la utilización de los PS como moléculas pruebas para estudios de localización en células y para la cuantificación de los mismos en medio biológico. Los valores de los corrimientos de Stokes (Δ Stockes) oscilaron entre 6 y 11 nm los cuales ponen en manifiesto la estructura rígida y además la similitud existente entre las energías espectroscópicas y las energías del estado excitado singlete relajado de los PS. Los resultados obtenidos concuerdan con aquellos reportados para cinc monocarboxifenoxi ftalocianina (ZnMCPC), conjugado de ZnMCPPc y quitosano (ZnMCPC-quitosano) y conjugado de ZnMCPPc con albumina de suero humano (ZnMCPC-HSA), utilizando DMSO como solvente. Estos PS exhibieron Δ Stockes ~ 10 nm y $\Phi_F = 0,16$, $0,20$ y $0,22$ para ZnMCPC, ZnMCPC-quitosano y ZnMCPC-HSA, respectivamente [110].

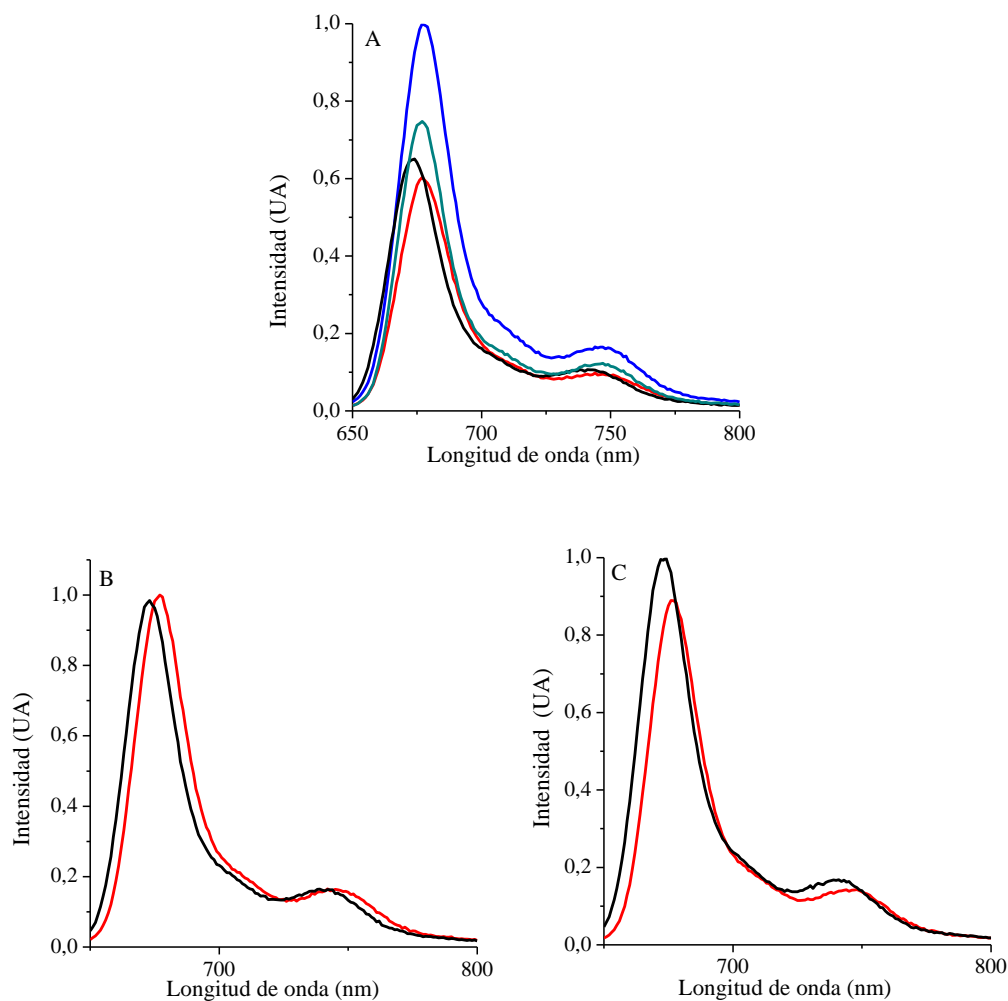


Figura 38. Espectros de emisión de (A) Bn-ZnPc, (B) Q-ZnPc y (C) PA-ZnPc en DMF (rojo), DCM (azul), metanol (negro) y tolueno (verde).

Tabla 6. Características espectroscópicas de las ftalocianinas y rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) en DMF.

Ftalocianinas	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{Abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{Emi}}$ (nm)	Φ_F
Bn-ZnPc	671	677	0,29±0,03
Q-ZnPc	671	677	0,26±0,02
PA-ZnPc	670	677	0,30±0,03
M ₄ -ZnPc	676	687	0,26±0,02

Con el objetivo de confirmar la formación de los conjugados, se realizaron estudios de espectroscopía FT-IR para Bn-ZnPc, Q-ZnPc y Pa-ZnPc. La Figura 39. A muestra el

espectro infrarrojo de Bn-ZnPc con bandas a 3437 cm^{-1} (OH), 2922 cm^{-1} (C-H), 1718 cm^{-1} (C=O), 1598 cm^{-1} (C-C), 1236 cm^{-1} (C-O-C), 1100 cm^{-1} (C-O) and 1056 cm^{-1} (C-O). El espectro IR de la PA mostró bandas a 3275 cm^{-1} (NH₂ - NH), 2940 cm^{-1} (C-H), 2830 cm^{-1} (C-H), 1575 cm^{-1} (NH₂), 1470 cm^{-1} (C-N), 1305 cm^{-1} , 1118 cm^{-1} (Figura 39. B). En la Figura 39. C se pueden observar las bandas correspondientes a los enlaces amida característicos a $3440\text{--}3120\text{ cm}^{-1}$ (N-H), 1646 cm^{-1} (O=C-NH) del conjugado PA-ZnPc. La banda a 1646 cm^{-1} perteneciente al enlace amida, no se encuentra presente en los espectros IR de Bn-ZnPc y PA, lo cual indica la formación del conjugado PA-ZnPc. El espectro IR del quitosano muestra bandas vibracionales a $3420\text{--}3180\text{ cm}^{-1}$ (OH/NH), 2923 cm^{-1} (C-H), 1645 cm^{-1} (C-C), 1400 cm^{-1} (C-N) y 1049 cm^{-1} (C-O) (Figura 39. D). Por otro lado, Q-ZnPc muestra bandas a $3440\text{--}3190\text{ cm}^{-1}$ (OH/NH), 2923 cm^{-1} (C-H), 1630 cm^{-1} (C-C), 1550 cm^{-1} (O=C-NH), 1400 cm^{-1} (C-N) y 1040 cm^{-1} (C-O) (Figura 39. E). El pico a 1550 cm^{-1} es atribuido a la formación del enlace amida. A partir de los corrimientos en las bandas observados en los espectros FT-IR es posible confirmar el cambio estructural obtenido luego de la formación de los conuugados Q-ZnPc y PA-ZnPc [110,141].

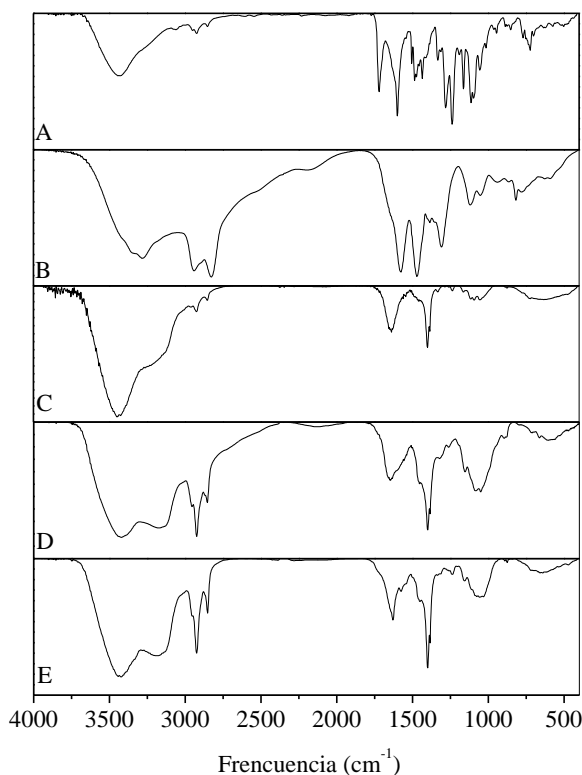
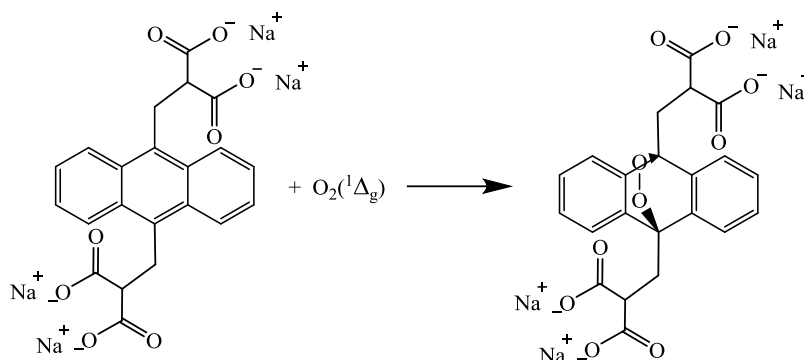


Figura 39. Espectro FT-IR. Bn-ZnPc (A), polietilenimina (B), PA-ZnPc (C), quitosano (D) y CH-ZnPc (E).

5.3. Fotólisis en estado estacionario

5.3.1. Estudios de fotooxidación de derivados del antraceno

Mediante la utilización de estudios de fotólisis de DMA en estado estacionario, se analizó la generación de $O_2(^1\Delta_g)$ en DMF a través de la reacción de formación del 9,10-dimetil-9,10-dihidro-9,10-epidioxiantraceno (Esquema 37) [123]. Además, para conocer la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ en medio acuoso se utilizó un derivado de antraceno soluble en agua 2,2'-(antraceno-9,10-diil)bis(metilmalonato) de tetra sodio (ABMM), que forma como producto el 9,10-endoperóxido (Esquema 48).



Esquema 48. Reacción del ABMM con $O_2(^1\Delta_g)$.

La reacción de descomposición del sustrato DMA sensibilizada por Bn-ZnPc, Q-ZnPc y PA-ZnPc, se siguió espectroscópicamente mediante el decaimiento de la banda del DMA a $\lambda_{\text{máx}} = 378$ nm, en condiciones aeróbicas [123]. La Figura 40. muestra los espectros de absorción del Bn-ZnPc en presencia de DMA luego de irradiaciones sucesivas y se observa que, en las condiciones de trabajo utilizadas, la ftalocianina es estable. Las moléculas de Q-ZnPc y PA-ZnPc presentan resultados similares.

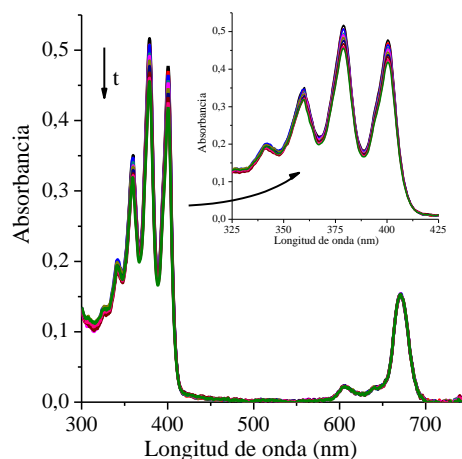


Figura 40. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación ($\Delta t = 60$ s) para la fotooxidación de DMA sensibilizada por Bn-ZnPc en DMF ($\lambda_{\text{irr}} = 680$ nm).

A partir de los estudios de la cinética de descomposición de DMA a diferentes tiempos de irradiación a 680 nm en DMF, se determinaron los rendimientos cuántico de producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (Φ_{Δ}). La Figura 41. muestra la relación lineal planteada en la Ecuación 5, donde a partir de la pendiente de dicha gráfica se obtuvieron las constantes de velocidad observadas (k_{obs}), resultados que se muestran en la Tabla 7. Los Φ_{Δ} se calcularon utilizando como PS de referencia a $\text{M}_4\text{-ZnPc}$ [108], obteniéndose valores de $\Phi_{\Delta} = 0,49$ para Bn-ZnPc y $\Phi_{\Delta} = 0,44$ y $0,43$ para Q-ZnPc y PA-ZnPc, respectivamente. Todos los Φ_{Δ} calculados fueron menores al reportado para la molécula de referencia $\Phi_{\Delta} = 0,69$ [108], lo cual queda evidenciado además, en los valores de k_{obs} . Los valores de Φ_{Δ} para los PS sintetizados ponen en manifiesto que la presencia de los sustituyentes Q y PA en la periferia del macrociclo de las ftalocianinas, no afectan las propiedades fotodinámicas del PS.

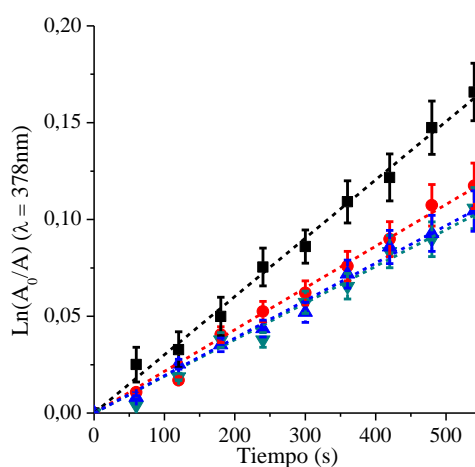


Figura 41. Gráfico de primer orden de la cinética de fotooxidación de DMA (35 μM) sensibilizado por $\text{M}_4\text{-ZnPc}$ (■), Bn-ZnPc (●), Q-ZnPc (▲) y PA-ZnPc (▼) ($\lambda_{\text{irr}} = 680$ nm) en DMF.

Posteriormente se estudió la reacción de descomposición de ABMM sensibilizada por Q-ZnPc y PA-ZnPc en medio acuoso, espectroscópicamente se siguió el decaimiento en la absorbancia de la banda de dicho derivado de antraceno a $\lambda_{\text{máx}} = 378$ nm, en condiciones aeróbicas. En la Figura 42. se observan los espectros de absorción del Q-ZnPc en presencia de ABMM luego de irradiaciones sucesivas, resultados similares se encontraron para PA-ZnPc. Se utilizó como molécula de referencia la ftalocianina ZnPyPc debido a que presenta una alta solubilidad en medio acuoso y un Φ_{Δ} ya conocido.

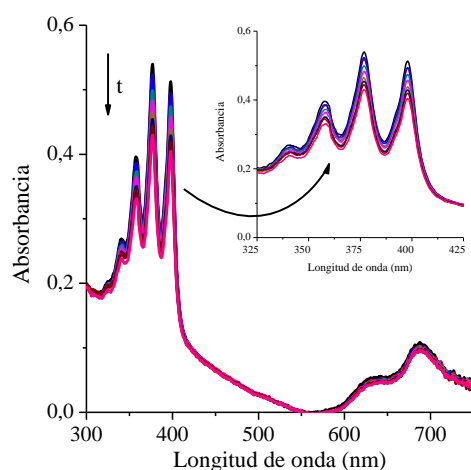


Figura 42. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación ($\Delta t = 120$ s) para la fotooxidación de ABMM sensibilizada por Q-ZnPc en agua ($\lambda_{\text{irr}} = 530\text{-}800$ nm).

Los Φ_{Δ} se determinaron a partir de estudios de la cinética de descomposición de ABMM a diferentes tiempos de irradiación ($\lambda_{\text{irr}} = 530\text{-}800$ nm) en agua. En la Figura 43. se observa la relación lineal planteada en la Ecuación 5. A partir de la pendiente de dicha gráfica se obtuvieron las constantes de velocidad observadas (k_{obs}), resultados que se muestran en la Tabla 7. Los rendimientos cuánticos de generación de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ se calcularon utilizando como referencia a ZnPyPc [113], dando valores de $\Phi_{\Delta} = 0,35$ para Q-ZnPc y 0,31 para PA-ZnPc.

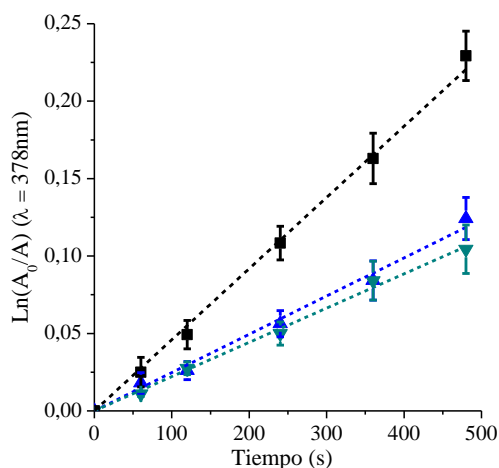


Figura 43. Gráfico de primer orden de la cinética de fotooxidación de ABMM (35 μM) sensibilizado por ZnPyPc (■), Q-ZnPc (▲) y PA-ZnPc (▼) ($\lambda_{\text{irr}} = 530\text{-}800\text{ nm}$) en agua.

Tabla 7. Parámetros cinéticos (k_{obs}) para la descomposición de ADM y ABMM sensibilizada por ftalocianinas y rendimientos cuánticos de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (Φ_{Δ}).

Ftalocianinas	$k_{\text{obs}}^{\text{DMA}} (\text{s}^{-1})^{\text{a}}$	Φ_{Δ}^{a}	$k_{\text{obs}}^{\text{ABMM}} (\text{s}^{-1})^{\text{b}}$	Φ_{Δ}^{b}
Bn-ZnPc	$(2,1 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$0,49 \pm 0,05$		
Q-ZnPc	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$0,44 \pm 0,04$	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$0,35 \pm 0,03$
PA-ZnPc	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$0,43 \pm 0,04$	$(2,2 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$0,31 \pm 0,03$
M ₄ -ZnPc	$(3,0 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	$0,69 \pm 0,07$		
ZnPyPc			$(4,6 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	$0,65 \pm 0,06$

^a DMF

^b agua

Los valores de Φ_{Δ} obtenidos para Bn-ZnPc, Q-ZnPc y PA-ZnPc son adecuados tanto en DMF como en agua, lo cual indica que posiblemente estos PS sean eficientes para su aplicación en PDI de microorganismos. Además, presentan una mayor eficiencia de generación de la especie $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ que los reportados para ZnMCPc, ZnMCPc-quitosano y ZnMCPc-HSA. En este caso, los estudios se realizaron mediante la determinación directa de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ a partir de medidas de fosforescencia a 1270 nm y se obtuvieron valores de Φ_{Δ} menores a 0,3 en DMSO [110].

5.3.2. Estudios de fotodescomposición de azul de nitrotetrazolio

La generación del $O_2^{\cdot -}$ se estudió mediante la reacción de NBT en presencia de β -NADH sensibilizada por Bn-ZnPc, Q-ZnPc y PA-ZnPc. La descomposición de NBT se observó mediante medidas espectroscópicas a $\lambda = 560$ nm (Figura 44.) y por un cambio colorimétrico irradiando a $\lambda = 680$ nm observando la aparición de DF como producto (Esquema 38).

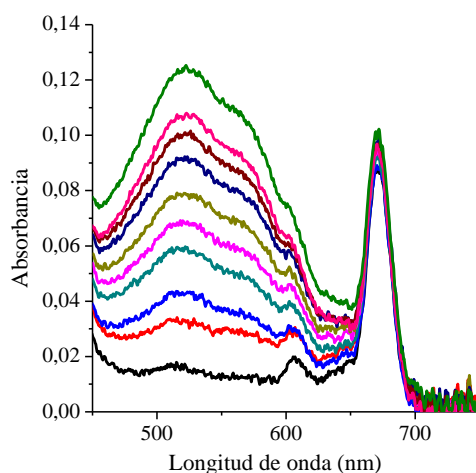


Figura 44. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación para la fotooxidación de NBT + β -NADH sensibilizada por PA-ZnPc en DMF/agua 1% ($\lambda_{ir} = 680$ nm).

La cinética de fotooxidación de NBT se estudió en DMF/agua 1% en condiciones aeróbicas. El estudio mostró resultados similares de generación de $O_2^{\cdot -}$ para los tres fotosensibilizadores sintetizados (Bn-ZnPc, Q-ZnPc y PA-ZnPc) siendo estos mayores que los hallados para M_4 -ZnPc (Figura 45.). Nuevamente quedó manifestado que la presencia de β -NADH en la solución es indispensable para la formación de DF.

Resultados similares se encontraron para macrociclos tetrapirrólicos como lo son las porfirinas y las clorinas [114,142]. La diada porfirina-fulereno neutra TCP- C_{60} y la diada porfirina-fulereno tetra catiónica TCP- C_{60}^{4+} [142] mostraron una importante generación de $O_2^{\cdot -}$ al igual que la clorina TAPC [114].

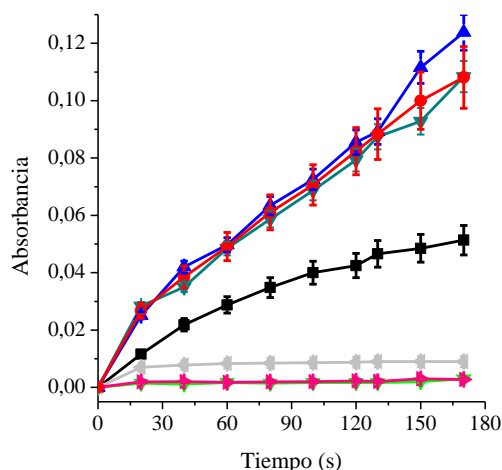


Figura 45. Detección de $O_2^{\cdot -}$ mediante la reacción con NBT a diferentes tiempos de irradiación ($\lambda_{irr}= 680$ nm). NBT + β -NADH + M_4 -ZnPc (■), NBT + β -NADH + Bn-ZnPc (●), NBT + β -NADH + Q-ZnPc (▲), NBT + β -NADH + PA-ZnPc (▼), NBT + β -NADH (◄), NBT + PS (▼) y β -NADH+ PS (►).

5.3.3. Estudios de fotooxidación de L-triptófano

La fotooxidación del aminoácido L-Trp sensibilizada por Bn-ZnPc, Q-ZnPc y PA-ZnPc se estudió en DMF, en condiciones aeróbicas. La utilización de dicho sustrato se debió a que su descomposición puede llevarse a cabo mediante los dos mecanismos de acción fotodinámica, tipo I y tipo II (Esquema 40) [127]. Las soluciones del aminoácido y los PS se irradiaron ($\lambda_{irr}= 680$ nm) a diferentes tiempos, el estudio se observó mediante medidas de espectroscopia de emisión ($\lambda_{m\acute{a}x}= 340$ nm) (Figura 46.).

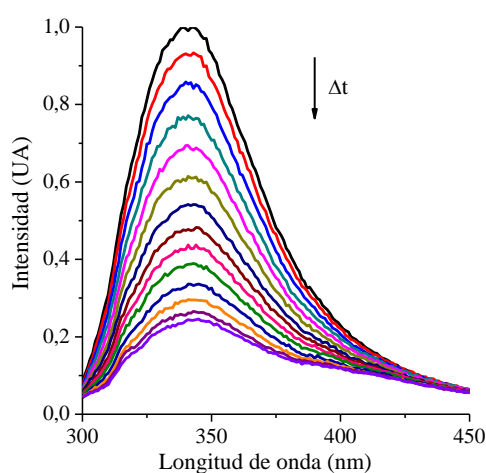


Figura 46. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación para la fotooxidación de L-Trp sensibilizada por PA-ZnPc en DMF ($\lambda_{irr}= 680$ nm).

La Figura 47. muestra la cinética de fotooxidación del L-Trp sensibilizado por Bn-ZnPc, Q-ZnPc, PA-ZnPc y M_4 -ZnPc. Los resultados muestran una alta eficiencia de

fotooxidación de PA-ZnPc en comparación con la molécula de referencia (M_4 -ZnPc) y con los demás PS estudiados (Bn-ZnPc y Q-ZnPc). La molécula Q-ZnPc presenta una baja descomposición del aminoácido, al igual que Bn-ZnPc. Los valores de las constantes de velocidad observadas (k_{obs}) para la fotooxidación del L-Trp confirman estos resultados (Tabla 8).

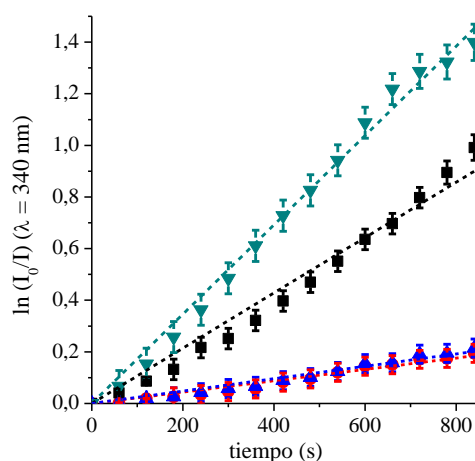


Figura 47. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de L-Trp (20 μ M) sensibilizada por M_4 -ZnPc (■), Bn-ZnPc (●), Q-ZnPc (▲) y PA-ZnPc (▼) ($\lambda_{irr}=680$ nm) en DMF.

La fotooxidación del L-triptófano se estudió en idénticas condiciones que la fotooxidación del DMA mediante la presencia de $O_2(^1\Delta_g)$, debido a esto se logró calcular la constante de reacción de descomposición del aminoácido vía mecanismo tipo II (Ecuación 12) (Tabla 8).

El valor de la constante de reacción para DMA en DMF es $k_r^{DMA}=5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [128], a partir de él se obtuvo la $k_r^{Trp}=(5,21 \pm 0,05) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ utilizando Bn-ZnPc, $k_r^{Trp}=(6,28 \pm 0,06) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para Q-ZnPc, $k_r^{Trp}=(5,21 \pm 0,05) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ utilizando PA-ZnPc y $k_r^{Trp}=(1,78 \pm 0,02) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para M_4 -ZnPc [128]. Los valores encontrados para los PS estudiados concuerdan con los informados en bibliografía en donde se reportan valores de k_r^{Trp} del orden de 10^7 - 10^8 [129]. Para poder distinguir el tipo de mecanismo que actúa en la descomposición de L-Trp es necesaria la utilización de atrapadores químicos de ROS como lo son D-manitol y azida de sodio [130-131].

Tabla 8. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de L-Trp (k_{obs}) en DMF ($\lambda_{irr}= 680$ nm)

Ftalocianinas	k_{obs} (s ⁻¹)	k_r (M ⁻¹ s ⁻¹)
Bn-ZnPc	(2,19±0,02)x10 ⁻⁴	(5,21±0,05)x10 ⁷
Q-ZnPc	(2,39±0,02)x10 ⁻⁴	(6,28±0,06)x10 ⁷
PA-ZnPc	(1,73±0,02)x10 ⁻³	(4,80±0,05)x10 ⁸
M4-ZnPc	(1,07±0,01)x10 ⁻³	(1,78±0,03)x10 ⁸

5.3.4. Estudios de fotooxidación de L-Trp en presencia atrapadores químicos

La fotooxidación del L-Trp se estudió en presencia de atrapadores químicos de ROS: D-manitol y azida de sodio (N_3^-) en DMF/agua 5%, en condiciones aeróbicas irradiando ($\lambda_{irr}=680$ nm) durante diferentes períodos de tiempo. Este estudio se desarrolló con el objetivo de dilucidar el/los mecanismo/s que actúa/n en la fotodescomposición del aminoácido. Como se mencionó anteriormente, el ion azida (N_3^-) es soluble en agua y puede desactivar al $O_2(^1\Delta_g)$ (Esquema 41) por quenching físico y el D-manitol actúa como un atrapador de especies radicalarias, tales como O_2^- y OH (Esquema 42) [130-132].

La Figura 48. muestra la cinética de fotooxidación del L-Trp mediada por Bn-ZnPc, Q-ZnPc y PA-ZnPc en presencia de N_3^- y D-manitol. Los resultados indican, para todos los PS estudiados, la contribución de los dos mecanismos en la fotooxidación del sustrato, sin embargo es posible notar una mayor acción del mecanismo tipo II. PA-ZnPc muestra una marcada participación de la especie $O_2(^1\Delta_g)$ en la descomposición del aminoácido. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

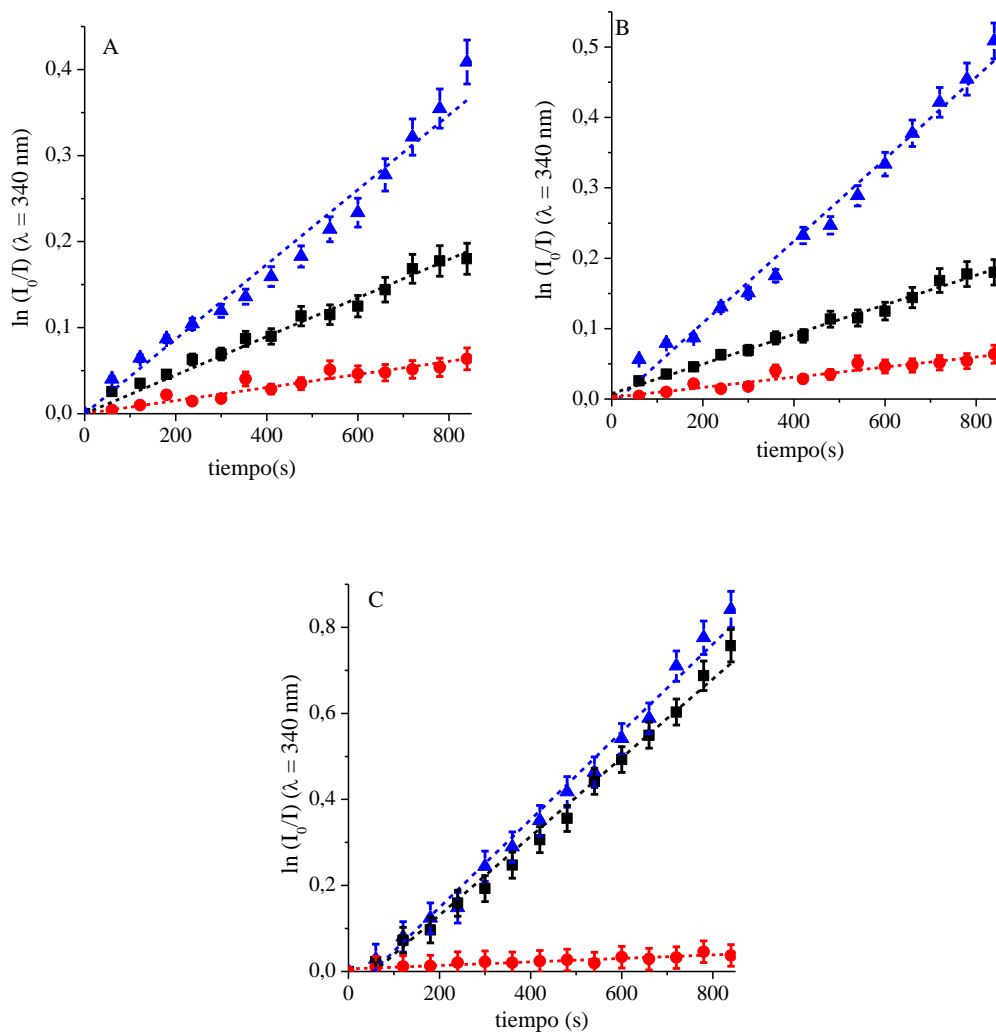


Figura 48. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de L-Trp (20 μ M) sensibilizada por (A) Bn-ZnPc, (B) Q-ZnPc y (C) PA-ZnPc. PS (\blacktriangle), PS + D-manitol (\blacksquare) y PS + azida de sodio (\bullet) ($\lambda_{in}=680$ nm) en DMF/agua 5%.

Tabla 9. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de L-Trp (k_{obs}) en DMF/agua 5%.

Ftalocianinas	k_{obs}^{L-Trp} (s^{-1})	$k_{obs}^{L-Trp+azida}$ (s^{-1})	$k_{obs}^{L-Trp+manitol}$ (s^{-1})
Bn-ZnPc	$(4,33 \pm 0,04) \times 10^{-4}$	$(7,59 \pm 0,07) \times 10^{-5}$	$(2,24 \pm 0,02) \times 10^{-4}$
Q-ZnPc	$(5,67 \pm 0,06) \times 10^{-4}$	$(7,57 \pm 0,07) \times 10^{-5}$	$(2,23 \pm 0,03) \times 10^{-4}$
PA-ZnPc	$(1,02 \pm 0,01) \times 10^{-3}$	$(4,08 \pm 0,04) \times 10^{-5}$	$(9,14 \pm 0,09) \times 10^{-4}$

5.4. Estudios en medios biológicos

5.4.1. Estudios en suspensiones celulares planctónicas

5.4.1.1. Unión del fotosensibilizador a las células microbianas

La capacidad de unión de Q-ZnPc y PA-ZnPc a células de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL), *S. aureus* y *E. coli* ($\sim 10^8$ UFC/mL) se analizó en suspensiones celulares, en PBS. Los cultivos microbianos se incubaron con 5 μ M (*C. albicans* y *S. aureus*) y 10 μ M (*E. coli*) de los PS a diferentes tiempos de incubación (2, 5, 15 y 30 min) a 37 °C en la oscuridad. La concentración intracelular del PS se determinó por espectroscopia de fluorescencia ($\lambda_{exc}=660$ nm). La Figura 49. muestra una cinética de unión rápida a tiempos cortos de incubación (2 min) de los PSs a las células microbianas. Q-ZnPc mostró valores máximos de 0,51 nmol/ 10^6 células de *C. albicans*, 0,25 y 0,87 nmol/ 10^8 células para *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente. Por otra parte, PA-ZnPc exhibió valores máximos de 0,44 nmol/ 10^6 células de *C. albicans*, 0,56 y 0,97 nmol/ 10^8 células para *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente. Estos resultados pertenecen al menor tiempo de incubación (2 min) y se mantuvieron constantes durante los demás períodos de incubación (5, 15 y 30 min), lo cual muestra una rápida unión de los PS a las células microbianas. Resultados similares se encontraron para el fotosensibilizador A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ en la primera etapa de esta tesis.

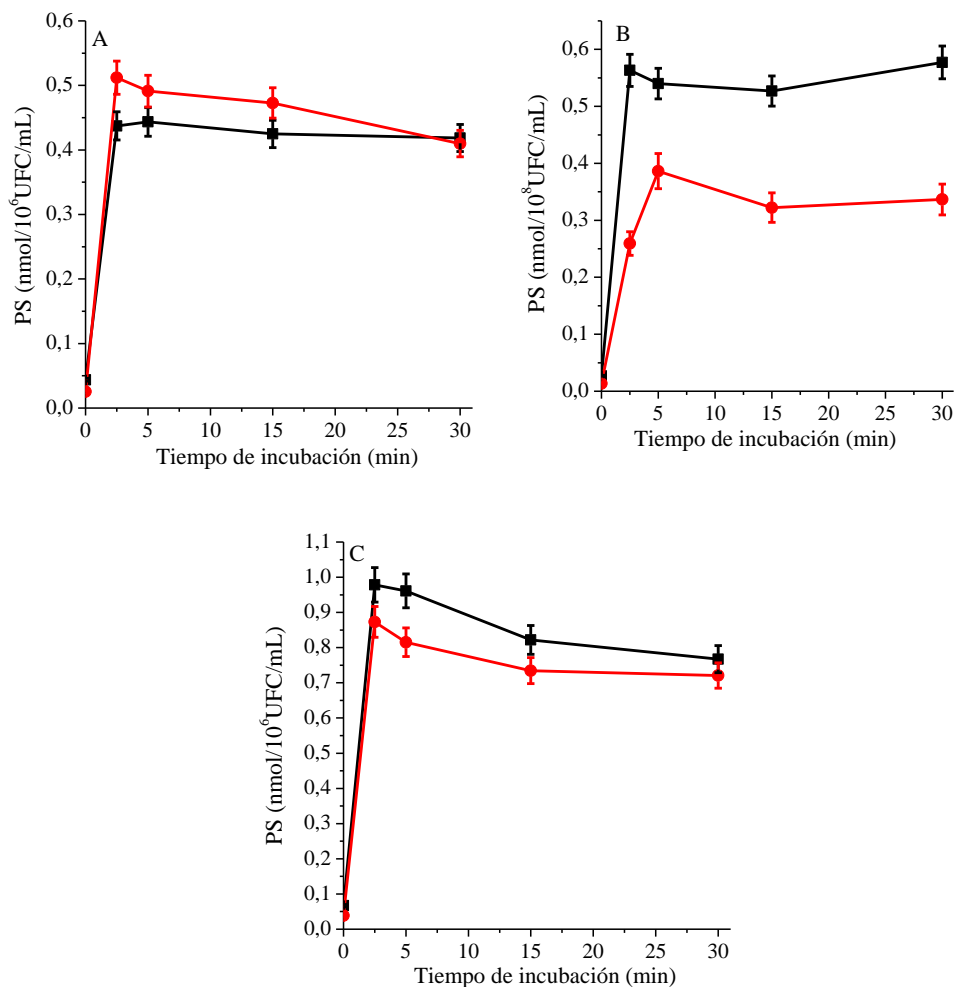


Figura 49. Cantidad de Q-ZnPc (●) y PA-ZnPc (■) recuperados de células de (A) ($\sim 10^6$ UFC/mL), (B) *S. aureus* y (C) *E. coli* ($\sim 10^8$ UFC/mL) tratadas con $5\mu\text{M}$ del sensibilizador para *C. albicans* y *S. aureus* y $10\mu\text{M}$ para *E. coli*, a diferentes tiempos de incubación a 37°C .

5.4.1.2. Inactivación fotodinámica de las cepas microbianas

El estudio de PDI de microorganismos (*C. albicans*, *S. aureus* y *E. coli*) se llevó a cabo con las moléculas sintetizadas Bn-ZnPc, Q-ZnPc y PA-ZnPc. En primera instancia, se utilizó una sola condición experimental: $5\mu\text{M}$ del PS y 30 min de irradiación. Se observaron resultados mayores de PDI para aquellos fotosensibilizadores conjugados ftalocianina-polímeros que para aquel precursor Bn-ZnPc (Figura 50.). Por esta razón, se continuó con el estudio de la PDI de *C. albicans*, *S. aureus* y *E. coli* con los fotosensibilizadores Q-ZnPc y PA-ZnPc.

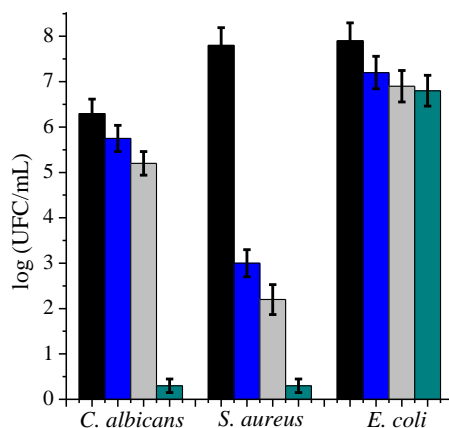


Figura 50. PDI de *C. albicans*, *S. aureus* y *E. coli* sensibilizados con 5 μM de sensibilizadores Bn-ZnPc (azul), Q-ZnPc (gris) y PA-ZnPc (verde), irradiados 30 min. Control celular (negro).

La fotoinactivación de los microorganismos mediada por Q-ZnPc y PA-ZnPc se estudiaron en suspensiones celulares en PBS (2 mL, $\sim 10^6$ CFU/mL para *C. albicans*, $\sim 10^8$ UFC/mL para *S. aureus* y *E. coli*) durante diferentes períodos de irradiación (5, 15 y 30 min) con luz visible. Los experimentos control muestran que la viabilidad de los tres microorganismos no se ve afectada por la iluminación o la oscuridad, y tampoco por la incubación con el PS durante 30 min. Esto es un indicativo de que la mortalidad celular obtenida posterior al tratamiento de PDI sólo corresponde al efecto que el agente PS produce al exponerse a la luz visible.

La Figura 51. muestra las curvas de supervivencia de las células de tratadas *C. albicans* con Q-ZnPc y PA-ZnPc. El conjugado Q-ZnPc produce un decrecimiento de ~ 0.5 log en la supervivencia celular de *C. albicans* para todas las concentraciones estudiadas e irradiadas por 5 min. Dicho valor de supervivencia celular se mantuvo al aumentar los períodos de irradiación indicando que no existe dependencia alguna con la concentración de Q-ZnPc y el tiempo de irradiación utilizados. Además, Q-ZnPc no produce un efecto de PDI apreciable frente a células fúngicas. Sin embargo, PA-ZnPc muestra una fotoinactivación de *C. albicans* dependiente de la concentración de PS y del tiempo de irradiación. La máxima concentración utilizada (5 μM) produce un decrecimiento de ~ 5 log de la supervivencia celular al menor tiempo de irradiación (5 min), este valor se mantiene constante durante los demás períodos de irradiación (15 y 30 min). Las concentraciones de 1 μM y 2.5 μM generan un decrecimiento de la supervivencia celular de ~ 1 log y ~ 2 log, respectivamente, utilizando el período más largo de irradiación (30 min). Resultados similares se observaron para la

ftalocianina ZnPPc⁴⁺ [135] y para el PS sintetizado en la primera etapa de tesis A(NM₃)₃-ZnPc³⁺.

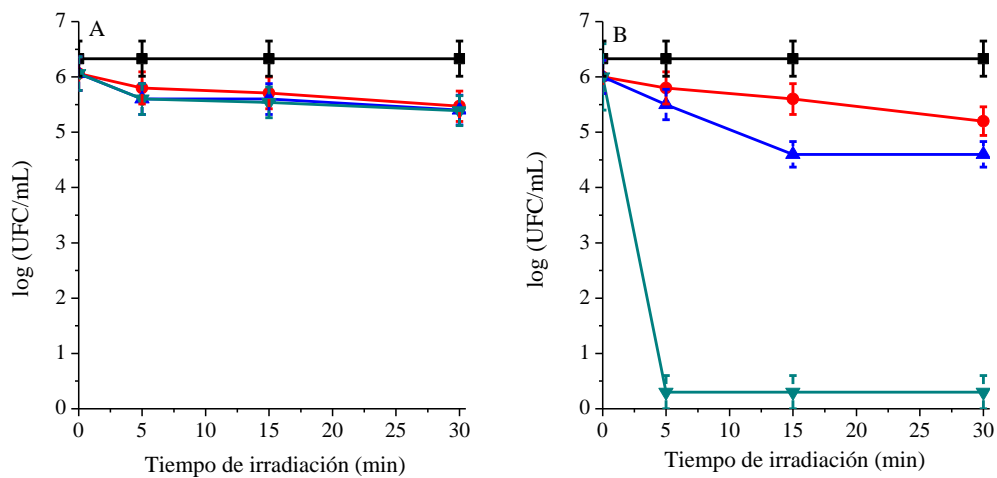


Figura 51. PDI de *C. albicans* sensibilizada por (A) Q-ZnPc y (B) PA-ZnPc a diferentes concentraciones 1,0 μM (●), 2,5 μM (▲) y 5,0 μM (▼) a distintos tiempos de irradiación (5, 15 y 30 min). Control irradiación (■).

La fotoinactivación de *S. aureus* generada por Q-ZnPc y PA-ZnPc se observa en la Figura 52. Q-ZnPc produce una disminución en la supervivencia celular de ~5 log cuando se utilizan concentraciones de 1 μM, 2.5 μM y 5μM de PS irradiando 30 min. El conjugado PA-ZnPc produjo una inactivación total con 5μM del PS y 30 min de irradiación. Esta molécula mostró dependencia de la PDI con la concentración y el tiempo de irradiación utilizados en a PDI de *S. aureus*.

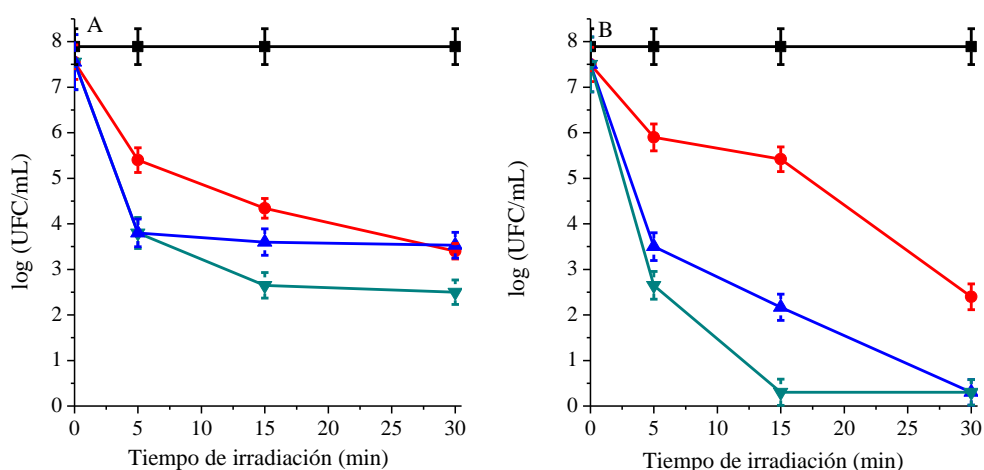


Figura 52. PDI de *S. aureus* sensibilizada por (A) Q-ZnPc y (B) PA-ZnPc a diferentes concentraciones 1,0 μM (●), 2,5 μM (▲) y 5,0 μM (▼) a distintos tiempos de irradiación (5, 15 y 30 min). Control irradiación (■).

Los estudios de PDI de *E. coli* fotosensibilizada por Q-ZnPc y PA-ZnPc se llevaron a cabo en presencia de diferentes concentraciones de quitosano. Con el objetivo de potenciar el efecto de PDI, se utilizó a dicho polímero con el objetivo de potenciar la PDI de la bacteria. El Q es un biopolímero policatiónico lineal natural ampliamente utilizado en aplicaciones biomédicas y en la ciencia ambiental. Además, presenta propiedades antibacteriales, es biocompatible y biodegradable [84]. Por otro lado, el mecanismo de acción antimicrobial que genera el Q no se encuentra completamente dilucidado, sin embargo existe evidencia de que el Q interrumpe las propiedades de la membrana externa de bacterias Gram negativas. La presencia de Q incrementa la permeabilidad de la membrana externa e interna de las células de *E. coli* e irrumpe la membrana provocando así la liberación de contenido celular. La interacción electrostática entre el grupo carbonilo y el fosfato de los fosfolípidos componentes de las membranas celulares con los grupos NH_3^+ del quitosano son la causa del daño en la membrana de las bacterias [84].

Diferentes concentraciones de quitosano (0,25 mg/mL y 0,125 mg/mL) se utilizaron para potenciar la PDI de células de *E. coli* (Figura 53.). Sin embargo, la concentración más alta del polímero resultó tóxica para las células bacterianas.

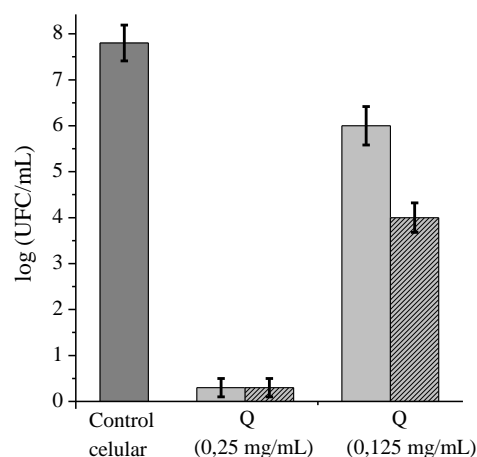


Figura 53. Supervivencia celular de *E. coli* ($\sim 10^8$ CFU/mL) tratadas con diferentes concentraciones de Q (0,25 y 0,25 mg/mL). Oscuridad (columna gris) e irradiado (columna gris rayado).

Los estudios de PDI en *E. coli* se llevaron a cabo en presencia de los PS Q-ZnPc y PA-ZnPc (10 μM) y 0,125 mg/mL de Q, irradiando por 30 min. La Figura 54. muestra el decrecimiento de la viabilidad celular de *E. coli*. La concentración de Q utilizada, produce una disminución de ~ 2 log de la supervivencia celular de la bacteria antes del tratamiento de PDI y posterior al mismo produce, además un decrecimiento ~ 4 log. Además, las

moléculas Q-ZnPc y PA-ZnPc sin la potenciación con Q, generan una PDI de ~ 1 log luego del tratamiento. Cuando se realizó el mismo tratamiento, pero en presencia de 0,125 mg/mL de quitosano, Q-ZnPc mostró una disminución en la supervivencia celular de ~ 3 log mientras que PA-ZnPc logró una PDI total de las células de *E. coli*. Es posible que en la combinación de Q y Q-ZnPc las propias propiedades antioxidantes del Q solo, contrarresten el efecto de desestabilización de la membrana y no se logre observar un efecto de PDI.

Resultados similares de estudios de PDI de *E. coli* utilizando como PS porfirinas se reportaron previamente en bibliografía [84]. La potenciación del tratamiento de fotoinactivación de la bacteria Gram negativa se llevo a cabo utilizando 0,25 mg/mL de Q y 5 μ M de PS. Las moléculas catiónicas como 5,10-di(4-metilfenil)-15,20-di(4-*N,N,N*-trimetil ammoniofenil) porfirina (MPAP²⁺) y TMAP⁴⁺ evidenciaron una potenciación en la disminución de la viabilidad celular de ~ 4 log y ~ 7 log, respectivamente [84].

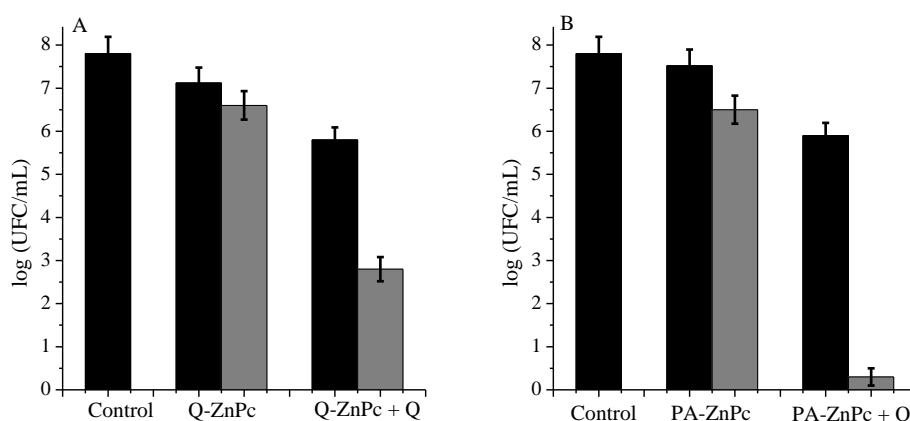


Figura 54. Supervivencia celular de *E. coli* ($\sim 10^8$ CFU/mL) tratadas con: (A) Q-ZnPc, (B) PA-ZnPc. [PS]: 10 μ M y Q 0,125 mg/mL. Oscuridad (negro) e irradiado (gris).

Capítulo 6 - Ftalocianinas para la formación de películas poliméricas

6. Resultados y discusiones

Los estudios de inactivación fotodinámica de microorganismos son llevados a cabo, en general, en suspensiones microbianas mediante la adición de un agente fotodinámico y posterior tratamiento con luz. Sin embargo, esta metodología presenta una notoria desventaja: este tipo de procedimientos puede dejar pequeñas trazas del PS permaneciendo en el medio y, consecuentemente conducir a efectos fotodinámicos remanentes indeseados [93]. Como alternativa a dichos inconvenientes aparece la utilización de soportes poliméricos, como superficies, para la inmovilización de PS. Este tipo de materiales evitaría la acumulación del PS en el medio y además permitiría la reutilización del polímero fotodinámico [94].

Las ftalocianinas son compuestos propicios para el desarrollo de nuevos materiales entre los que se encuentran los materiales electrocrómicos [98-100]. La sustitución de los anillos bencénicos en la periferia del macrociclo con grupos electropolimerizables, permite la formación de películas con propiedades ópticas de interés (propias de las Pc) sobre diferentes sustratos [73]. La sustitución del PS con grupos electroactivos, tales como el EDOT, es una opción adecuada para la generación de películas mediante electropolimerización [103].

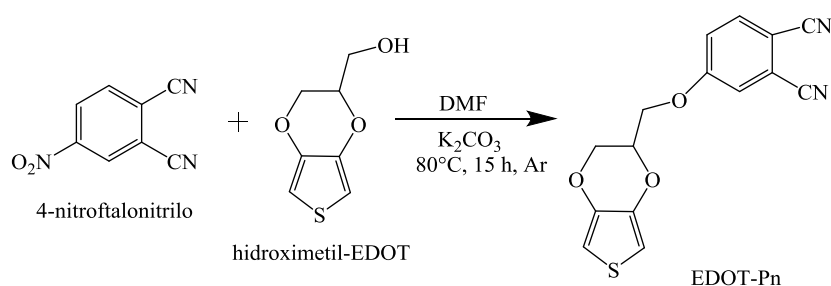
Uno de los precursores utilizados para esta familia de ftalocianinas simétricas, es el derivado del ftalonitrilo sustituido con un grupo hidroximetil-EDOT. Este grupo sustituyente se eligió debido a que posee importantes características útiles para la preparación de polímeros electroactivos funcionales. Dicho compuesto, tiene una alta estabilidad química y propiedades conductoras prometedoras [103,111]. Los monómeros de tiofeno funcionalizados ofrecen muchas oportunidades para la polimerización en solución de nuevos polímeros conjugados con estructura y propiedades especiales [103,143].

Debido a las propiedades interesantes que posee el grupo EDOT, se llevó a cabo la elección de dicho sustituyente para la síntesis de fotosensibilizadores destinados a la formación de películas poliméricas [103].

6.1. Síntesis de ftalocianinas para la formación de películas poliméricas

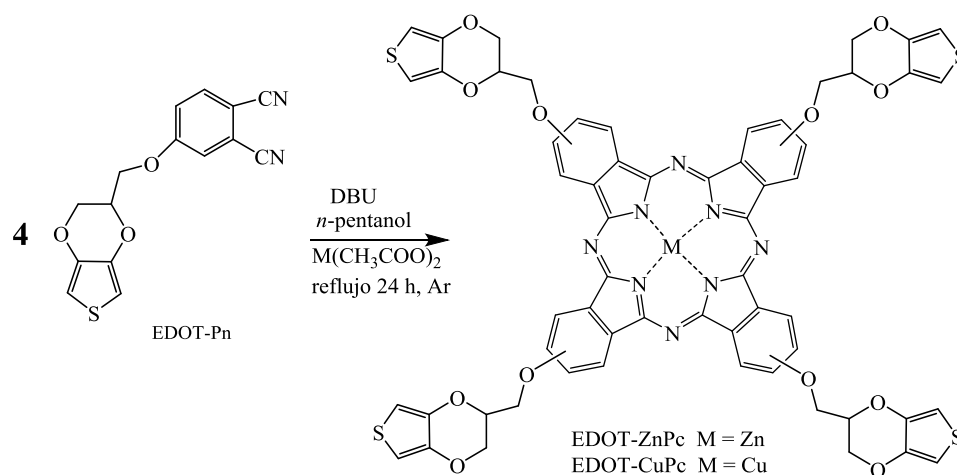
El derivado de ftalonitrilo EDOT-Pn, se preparó mediante la reacción de sustitución nucleofílica aromática (S_NAr) *ipso-nitro*, catalizada por base, del 4-nitroftalonitrilo con hidroximetil-EDOT (Esquema 49). La reacción se llevó a cabo en atmósfera inerte, a 80°C

en DMF con K_2CO_3 [103,111]. El medio básico se utilizó para activar las propiedades nucleofílicas del alcohol. Una vez finalizada la reacción, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se realizaron sucesivas extracciones con una mezcla agua/DCM/metanol (5:5:1). Posteriormente, se evaporó el solvente bajo presión reducida. Para el proceso de purificación se realizó una cromatografía en columna *flash* utilizando como eluyente DCM, obteniéndose un rendimiento de 30 % del ftalonitrilo de interés [103].



Esquema 49. Síntesis de EDOT-Pn.

Una vez sintetizado el correspondiente ftalonitrilo, se realizó la síntesis de dos ftalocianinas de simetría A_4 (EDOT-ZnPc y EDOT-CuPc) mediante la reacción de ciclometátesis de dicho ftalonitrilo, en presencia de las correspondientes sales metálicas (Esquema 50). Los productos se aislaron mediante extracciones con agua y DCM, luego se evaporó bajo presión reducida el solvente orgánico y se lavó con *n*-heptano el sólido color verde, luego se secó a vacío. Rendimientos de ~ 41 % y ~ 39 % se obtuvieron EDOT-ZnPc y EDOT-CuPc, respectivamente [103].



Esquema 50. Síntesis de EDOT-ZnPc y EDOT-CuPc.

6.2. Estudios espectroscópicos

Los complejos de MPcs presentan como característica importante una escasa solubilidad en diferentes medios. Esta capacidad de agregarse en solución, depende del solvente a utilizar y provoca una disminución en la capacidad fotosensibilizante de la ftalocianina [32,73,80]. La sustitución periférica en el macrociclo de la molécula influye sobre las propiedades del compuesto, disminuyendo en algunos casos la agregación [81,133]. Por otro lado, el fenómeno de agregación de los macrociclos depende de las propiedades del solvente utilizado, es por ello que se estudió la influencia del mismo sobre las características de agregación de las moléculas sintetizadas.

La Figura 55. muestra los espectros de las ftalocianinas comparados con la molécula referencia (M_4 -ZnPc) en DMF y se observan bandas Q (600-680 nm) y Soret (300-350 nm) características de derivados de ftalocianinas [32,73]. Los complejos EDOT-Pcs presentan una absorción aguda en la bandas Q, lo cual indica que se encuentran principalmente como monómeros en DMF. Además, la posición de las bandas de absorción de EDOT-ZnPc y EDOT-CuPc, no difiere prácticamente de la referencia, indicando que la presencia del sustituyente EDOT no afecta las propiedades espectroscópicas del macrociclo (Tabla 10).

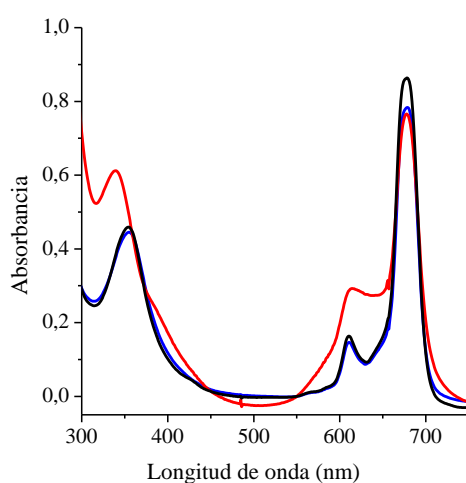


Figura 55. Espectros de absorción de EDOT-ZnPc (azul), EDOT-CuPc (rojo) y M_4 -ZnPc (negro) en DMF.

Los estudios espectroscópicos de los complejos EDOT-Pcs se desarrollaron además, utilizando solventes de diferente polaridad, tales como DCM, DMF, metanol y tolueno, con el objetivo de estudiar el comportamiento de los PS en dichos medios. La Figura 56. muestra los espectros de absorción de EDOT-ZnPc y EDOT-CuPc en los diferentes solventes a igual concentración de PS. La formación de agregados de ftalocianinas se caracteriza por un aumento en el ancho de la banda Q y por el crecimiento de una banda alrededor de los 630

nm [73,79-80]. EDOT-ZnPc y EDOT-CuPc presentan un importante ensanchamiento y disminución de la banda Q en el espectro cuando se utiliza metanol como solvente, posiblemente debido a la formación de agregados. La molécula EDOT-CuPc presenta además agregación en tolueno y DCM, sin embargo se encuentra como monómero o con menor agregación cuando se utiliza solvente DMF.

Los estudios realizados resaltan que DMF es un solvente adecuado para la disolución de EDOT-ZnPc y EDOT-CuPc. El efecto potencial en PDI puede verse afectado en el caso de que el PS no se encuentre como monómero, esto se debe a que disminuye la formación de $^3\text{PS}^*$ y por ende la producción de ROS [32,73,79-80].

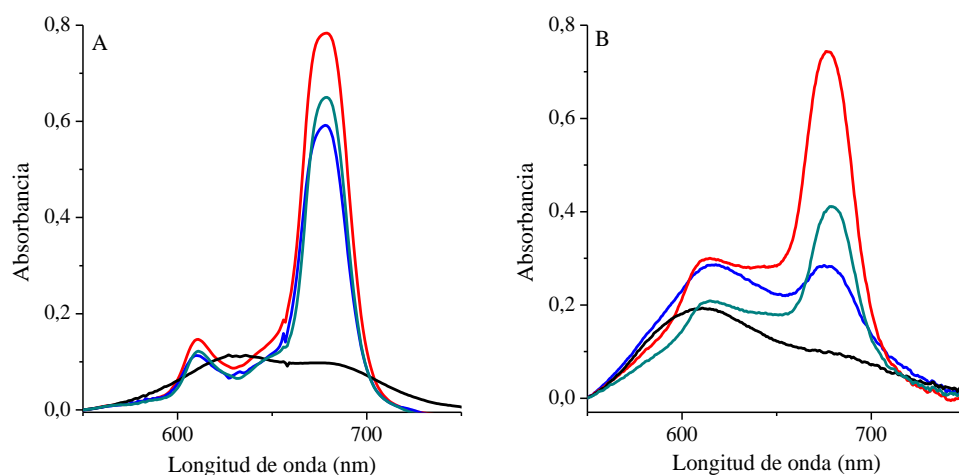


Figura 56. Espectros de absorción de (A) EDOT-ZnPc, (B) EDOT- CuPc, en DMF (rojo), DCM (azul), metanol (negro) y tolueno (verde).

Los espectros de emisión de las moléculas EDOT-Pcs se estudiaron, al igual que los espectros de absorción, en solventes con polaridades disímiles. Las condiciones de trabajo se unificaron para todas las moléculas analizadas ($\lambda_{\text{máx}} = 680$ nm, $\text{Abs}^{\text{PS}} \approx 0,1$, $\lambda_{\text{exc}} = 610$ nm). La Figura 57. muestra los espectros de emisión de las moléculas en DMF. El complejo con Cu como metal central (EDOT-CuPc), no presenta emisión considerable. Esto es lo esperado, ya que estudios previos han demostrado que las ftalocianinas que forman complejos con Cu (II) como metal central, presentan una fluorescencia intrínseca débil [103,111]. Este efecto es debido a que el metal Cu genera un rápido entrecruzamiento de sistema hacia el estado $^3\text{PS}^*$ y un aumento en la velocidad de decaimiento al estado fundamental.

Por otra parte, la ftalocianina EDOT-ZnPc emite de manera similar a la molécula de referencia M_4 -ZnPc, excitando ambas estructuras a 610 nm (Tabla 10). Las características de las bandas de los espectros de emisión de dichos PS pertenecen a las transiciones energéticas $0 \rightarrow 0$.

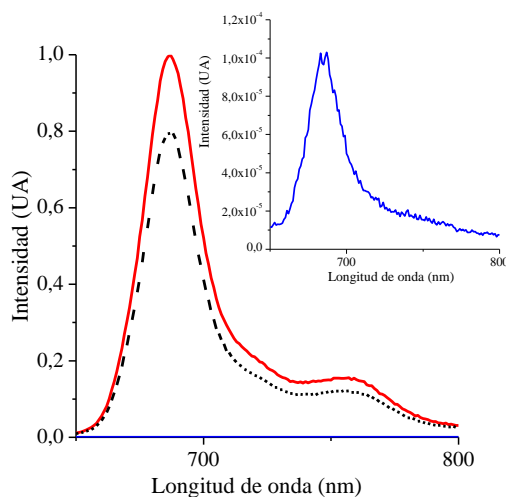


Figura 57. Espectros de emisión de EDOT-ZnPc (rojo), EDOT-CuPc (azul) y M_4 -ZnPc (línea discontinua negra) en DMF ($\lambda_{exc}= 610$ nm).

Además, se estudiaron las emisiones de fluorescencias de los PS en los solventes mencionados anteriormente (Figura 58.). La intensidad de emisión máxima, para EDOT-ZnPc en DMF (~ 687 nm) es mucho mayor que las correspondientes en DCM y tolueno, mientras que en metanol disminuyen considerablemente. El comportamiento en metanol del PS concuerda con los resultados obtenidos en los espectros de absorción en donde se aprecia un posible estado de agregación de la molécula. Aquel PS que forma complejos con Cu, no presentó emisión considerable en todos los solventes, además se observa una elevación en la línea de base de los espectros, indicando un estado agregado, resultados que concuerdan con los obtenidos en espectroscopía UV-visible.

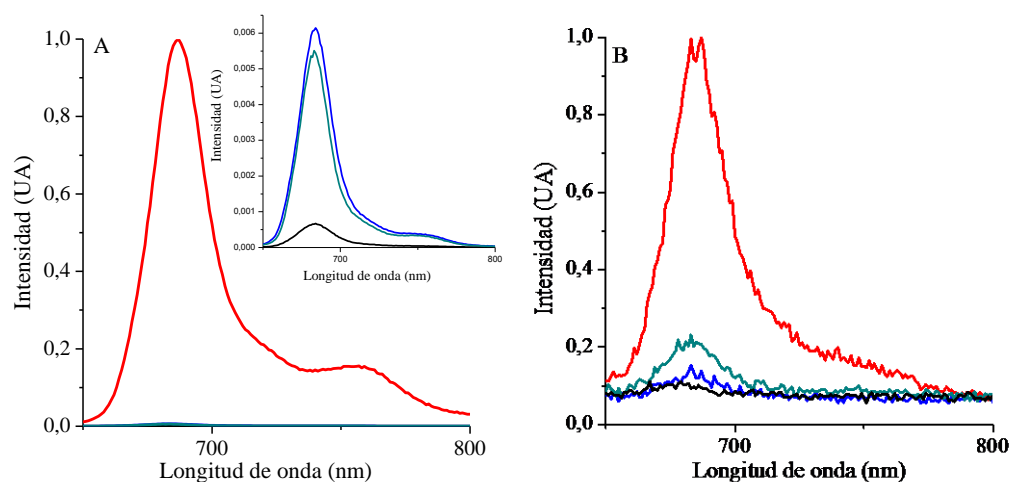


Figura 58. Espectros de emisión de (A) EDOT-ZnPc, (B) EDOT-ZnPc en DMF (rojo), DCM (negro), metanol (azul) y tolueno (verde) ($\lambda_{exc}= 610$ nm).

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia Φ_F se calcularon utilizando como referencia a la molécula M_4 -ZnPc, en DMF [81] (Tabla 10). Es posible observar que el complejo con Zn (EDOT-ZnPc) presenta un Φ_F escasamente menor al exhibido por M_4 -ZnPc. Como era de predecir, el PS que forma quelatos con el metal Cu presenta un insignificante rendimiento de fluorescencia. Además, se muestran los corrimientos de Stokes de los fotosensibilizadores cuyos valores oscilan entre ~5-10 nm los cuales indican que en estas moléculas las energías espectroscópicas son similares a las energías de los estados excitados singlete relajados, de acuerdo con la estructura plana y rígida de los macrociclos. Eso sugiere que sólo una relajación geométrica menor se presenta en el primer estado excitado [83].

Tabla 10. Características espectroscópicas de las ftalocianinas y rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) en DMF.

Ftalocianinas	$\lambda_{m\acute{a}x}^{Abs}$ (nm)	$\lambda_{m\acute{a}x}^{Emi}$ (nm)	Φ_F
EDOT-ZnPc	679	687	$0,23\pm 0,02$
EDOT-CuPc	678	685	$0,0002\pm 0,0001$
M_4 -ZnPc	676	687	$0,26\pm 0,02$

6.3. Fotólisis en estado estacionario

6.3.1. Estudios de fotooxidación de derivados del antraceno

La producción de $O_2(^1\Delta_g)$ de las ftalocianinas EDOT-CuPc y EDOT-ZnPc se estudió mediante un método indirecto en presencia del sustrato DMA. Esta molécula reacciona

específicamente con $O_2(^1\Delta_g)$ dando lugar a la formación del endoperóxido a expensas de la oxidación de los dobles enlaces en el anillo central (Esquema 37). La disminución en la absorbancia de la banda del DMA ($\lambda = 378$ nm) se siguió espectroscópicamente (Figura 59). Las soluciones de PS se irradiaron en presencia de DMA ($\lambda_{irr} = 680$ nm, $A_{bs}^{PS} \sim 0,1$), en condiciones aeróbicas, sin observarse efectos de fotodescomposición para EDOT-CuPc y EDOT-ZnPc (Figura 59), indicando que los PS son estables bajo las condiciones de irradiación utilizadas [123].

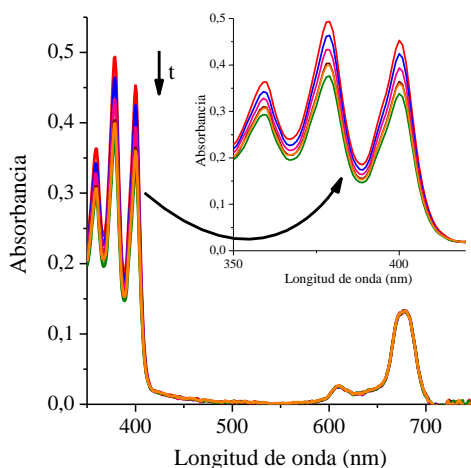


Figura 59. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación para la fotooxidación de DMA sensibilizada por EDOT-ZnPc en DMF ($\lambda_{irr} = 680$ nm).

A partir del estudio de la cinética de fotooxidación de DMA en DMF y de los datos obtenidos de las mismas, se calcularon los rendimientos cuánticos de producción de $O_2(^1\Delta_g)$ (Φ_{Δ}). En la Figura 60 se observan los gráficos correspondientes al ajuste lineal (Ecuación 5), a partir de su pendiente se determinaron las constantes de velocidad observadas (k_{obs}), resultados que se muestran en la Tabla 11. Los Φ_{Δ} para los PS se calcularon utilizando como compuesto de referencia a M_4 -ZnPc [108].

El rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete para EDOT-ZnPc es $\Phi_{\Delta} = 0,76$, valor cercano al de M_4 -ZnPc ($\Phi_{\Delta} = 0,69$). Sin embargo, la Pc que forman quelato con Cu, presentó escaso Φ_{Δ} , resultados que concordaron con los obtenidos en los espectros UV-visible en donde la molécula EDOT-CuPc no se encuentra en estado monomérico (Tabla 11). El potencial efecto en la actividad fotodinámica debido a la agregación del PS disminuye ya que se genera un camino de relajación desde el $^1PS^*$ por pérdida de energía no radiactiva, disminuyendo de esta manera la formación de $^3PS^*$ y por ende la producción de ROS [32,73,79-80]. En el caso de no estar agregado, el complejo con cobre (II) favorece la

formación de $^3\text{PS}^*$ pero además produce una disminución considerable en el tiempo de vida del estado triplete [144]. Se determinaron además las constantes de velocidad observadas (k_{obs}^{DMA}) las cuales se muestran en la Tabla 11. Dichos valores manifiestan que tanto la ftalocianina de referencia como la EDOT-ZnPc se descomponen a velocidades semejantes, mientras que EDOT-CuPc lo hace con marcada lentitud.

Resultados reportados en bibliografía muestran similitudes con los obtenidos para las EDOT-Pcs [145]. Valores de $\Phi_{\Delta} = 0,7$ se informaron para cinc (II) ftalocianina (ZnPc) mientras que no se informa ningún valor para la molécula cobre (II) ftalocianina (CuPc) [145].

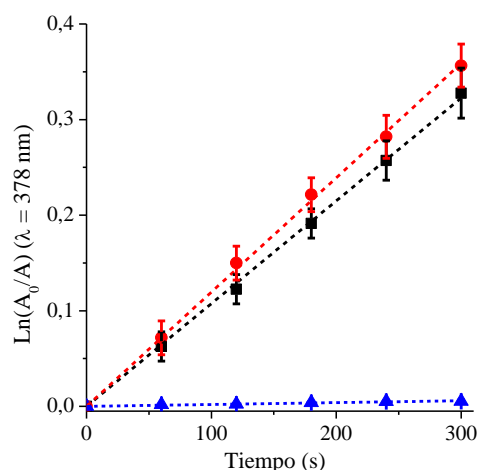


Figura 60. Cinética de fotooxidación de DMA (35 μM) sensibilizado por ftalocianinas. Gráfico de primer orden para las ftalocianinas EDOT-ZnPc (●), EDOT-CuPc (▲) y M₄-ZnPc (■) ($\lambda_{irr} = 680$ nm) en DMF.

Teniendo en cuenta estudios previos realizados con PS de estructura similar [108,133] y comparando los rendimientos cuánticos de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ con los obtenidos en esta experiencia, se observa un incremento en la producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ para EDOT-ZnPc con respecto a la ftalocianina sin sustituir ZnPc ($\Phi_{\Delta} = 0,56 \pm 0,04$) y a la correspondiente referencia M₄-ZnPc [108], como se mencionó anteriormente. Además conciertan con los resultados reportados en bibliografía para 5,10,15,20-tetrakis[3-(*N*-etilcarbazoil)]-porfina (TCP) ($\Phi_{\Delta} = 0,41$ [146]). Se observa que existe un efecto positivo frente a la producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ por parte de los sustituyentes de la periferia al macrociclo.

Tabla 11. Parámetros cinéticos (k_{obs}) para la descomposición de DMA sensibilizada por ftalocianinas y rendimientos cuánticos de $O_2(^1\Delta_g)$ (Φ_Δ) en DMF.

Ftalocianinas	k_{obs} (s^{-1})	Φ_Δ
EDOT-ZnPc	$(8,6\pm 0,8) \times 10^{-4}$	$0,63\pm 0,06$
EDOT-CuPc	$(1,2\pm 0,1) \times 10^{-4}$	$0,11\pm 0,01$
M ₄ -ZnPc	$(7,8\pm 0,8) \times 10^{-4}$	$0,69\pm 0,07$

6.4. Formación de películas poliméricas

Los estudios electroquímicos de EDOT-ZnPc y EDOT-CuPc se llevaron a cabo a partir de medidas de VC. La electropolimerización de PSs con sustituyentes EDOT (EDOT-Pcs) muestran picos de oxidación reversible a potenciales similares de 0,38 y 0,50 V para EDOT-ZnPc/película y EDOT-CuPc/película, respectivamente *vs* SCE. Estos potenciales han sido asignados a la oxidación del anillo de la ftalocianina [103,111]. A potenciales más anódicos se observa un pico de mayor intensidad (corriente) el cual corresponde a un proceso irreversible. Las películas de ftalocianinas pueden formarse mediante el ciclado electroquímico en la ventana de potencial adecuada. La Figura 61. A muestra el crecimiento de la película de polímero de EDOT-CuPc a modo representativo, dado que ambos monómeros presentan comportamientos similares. Si el ciclado se realiza hasta el pico de oxidación más anódico se observa un aumento en las corrientes de oxidación/reducción, indicando que está ocurriendo la deposición de material electroactivo sobre la superficie del electrodo. Al observar las sucesivas VC, la oxidación comienza a potenciales menos anódicos que el monómero lo que indica que el producto formado es más fácil de oxidar que el monómero.

El crecimiento de las películas poliméricas sobre la superficie del electrodo para las dos EDOT-Pcs se realizó en dos rangos de potencial diferentes: de -0,4 a 1,1 V y de -0,4 a 1,4 V. Las Figura 61. A y Figura 62. A corresponden a los dos rangos mencionados para EDOT-CuPc/película. La respuesta electroquímica de las películas de Pc se estudió, luego de lavar los electrodos modificados con DCM y colocarlo en una solución de DCM solo con electrolito soporte. En las Figura 61. B y Figura 62. B se muestran las VC de las diferentes películas obtenidas a distintas velocidades de barrido (25, 50, 75, 100, 150 y 200 mV/s).

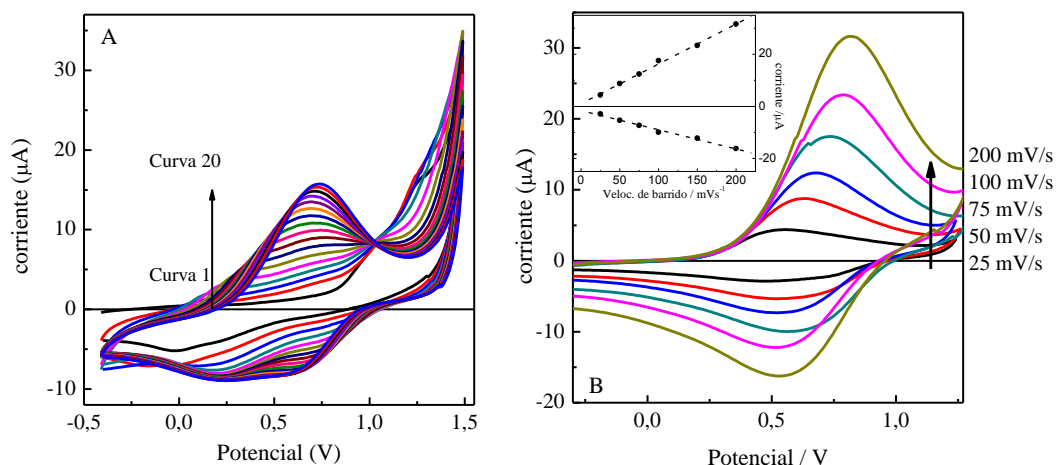


Figura 61. Voltagramas cíclicos para (A) monómero de EDOT-CuPc/película mostrando el incremento de la corriente de oxidación con el número de ciclos. Rango -0,4 a 1,4 V, velocidad de barrido 100 mV/s. (B) electropolímero de EDOT-CuPc/ película medidas a 25, 50, 75, 100, 150 y 200 mV/s. Grafico inserto en la figura (B) Corriente del pico de oxidación *versus* velocidad de barrido. Utilizando un electrodo de Pt en solución de DCM con electrolito soporte hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (0,1 M).

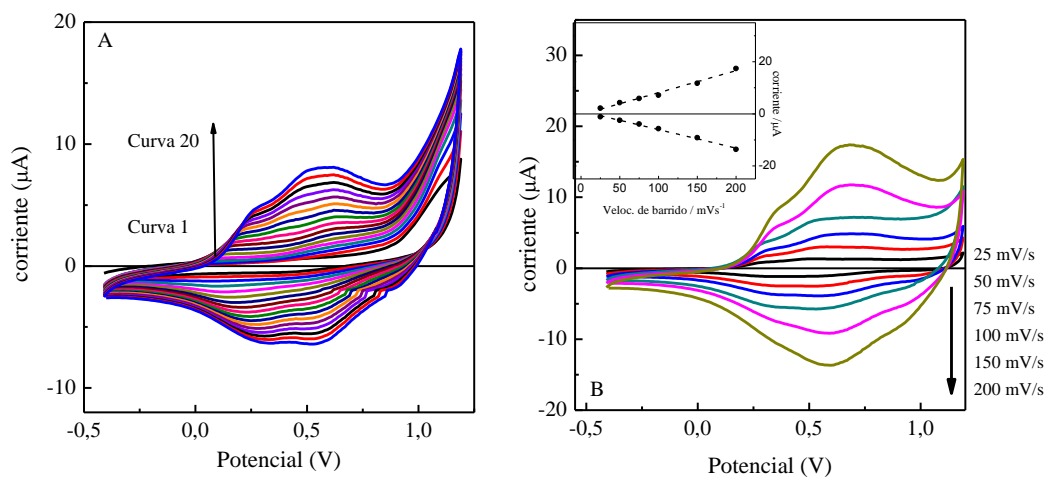


Figura 62. Voltagramas cíclicos para (A) monómero de EDOT-CuPc/ película mostrando el incremento de la corriente de oxidación con el número de ciclos. Rango -0,4 a 1,1 V. (B) película electropolimerizada de EDOT-CuPc/ película medidas a 25, 50, 75, 100, 150 y 200 mV/s. Grafico inserto en la figura (B) Corriente del pico de oxidación *versus* velocidad de barrido. Utilizando un electrodo de Pt en solución de DCM con electrolito soporte.

Cabe mencionar que se realizó el ciclado hasta el primer pico de oxidación de los monómeros y no se observó un cambio de la corriente correspondiente a la formación de un producto electroactivo como en los otros casos.

Las respuestas electroquímicas de las películas muestran un pico de oxidación ancho. A una velocidad de barrido baja (25 mV/s), los picos correspondientes a los procesos de

oxidación/reducción son cercanos (fenómeno difusivo). Como se observa en el gráfico inserto de las Figura 61. B y Figura 62. B existe una proporcionalidad entre las corrientes de pico y la velocidad de barrido lo cual indica que el producto está irreversiblemente adsorbido sobre el electrodo. Si bien las respuestas obtenidas a baja velocidad de barrido son similares para las películas producidas a partir de ciclados a diferentes ventanas de potencial, el comportamiento observado a mayores velocidades difiere. Se observa un comportamiento no difusional para las películas obtenidas en un rango de potencial de -0,4 a 1,1 V mientras que en el otro caso (rango -0,4 a 1,4 V) el proceso se puede definir como difusivo. Luego de realizar sucesivas VC de las distintas películas poliméricas, se determinó que son estables y de buena adherencia debido a que las respuestas obtenidas no variaban significativamente.

La respuesta electroquímica de las EDOT-Pcs/película muestran más de un proceso redox: un pico oxidativo reversible que corresponde al macrociclo [103] y un pico irreversible ($\sim 1,2$ V) que puede atribuirse a los grupos EDOT [103]. Luego de sucesivos ciclos, la corriente comienza a crecer a potenciales menores (0 V) lo cual se debe a la formación del producto (reacción de los cationes radicales de EDOT generados electroquímicamente y luego a los di-cationes) [103,111].

En cuanto a las respuestas de las películas poliméricas se puede asignar los picos de oxidación tanto de ftalocianinas como la de los dímeros de EDOT [147]. Los monómeros y sus respectivas películas poliméricas se estudiaron con espectroscopia de absorción UV-visible. En el caso de las EDOT-Pcs se estudiaron en distintos solventes, entre ellos tolueno donde presentan una buena solubilidad y se observó las bandas Q intensas (~ 678 nm) propias de las ftalocianinas [99,102]. También se estudiaron en metanol donde se observa claramente formación de agregados, donde las bandas Q son más anchas y menos intensas y hay una nueva banda ancha a ~ 630 nm correspondiente a los agregados [81,103]. En cuanto a las películas de polímero, se observan con menor intensidad y definición las bandas Q, lo cual se lo atribuye a la agregación en la película.

Las películas de EDOT-ZnPc y EDOT-CuPc (depositadas sobre ITO) se analizaron a partir de espectroelectroquímica. Los resultados (Figura 63. A) muestran la aparición/desaparición de bandas de absorción en distintas longitudes de onda debido a la oxidación de los diferentes grupos que conforman el polímero.

El espectro de absorción obtenido al aplicar un potencial de 0 V corresponde a la ftalocianina. Además, se observa claramente la coloración verde de la película sobre el ITO.

El espectro observado a 0,6 V pertenece a una nueva especie, el dímero de EDOT, mostrando un incremento de la absorción en la región entre 730-740 nm. A 1 V, desaparece la banda de absorción de la ftalocianina (se oxida). Al aplicar un potencial de 1,2 V, la absorción se extiende en todo el rango visible, la película se torna de color gris. Se forman nuevas especies oxidadas, posiblemente (EDOT^{+2} , Pc^+ , $\text{EDOT}^{+\cdot}$) [148-150].

A partir del análisis de las trazas de absorción se pueden identificar las diferentes especies mencionadas (Figura 63. B). A medida que se barre el potencial a valores positivos la traza de 740 nm comienza a crecer, mientras que la de 650 nm permanece constante (Pc) al igual que la de 920 nm. A potenciales más anódicos la traza de 740 nm disminuye y se observa la oxidación de la ftalocianina (decrece la traza a 650 nm).

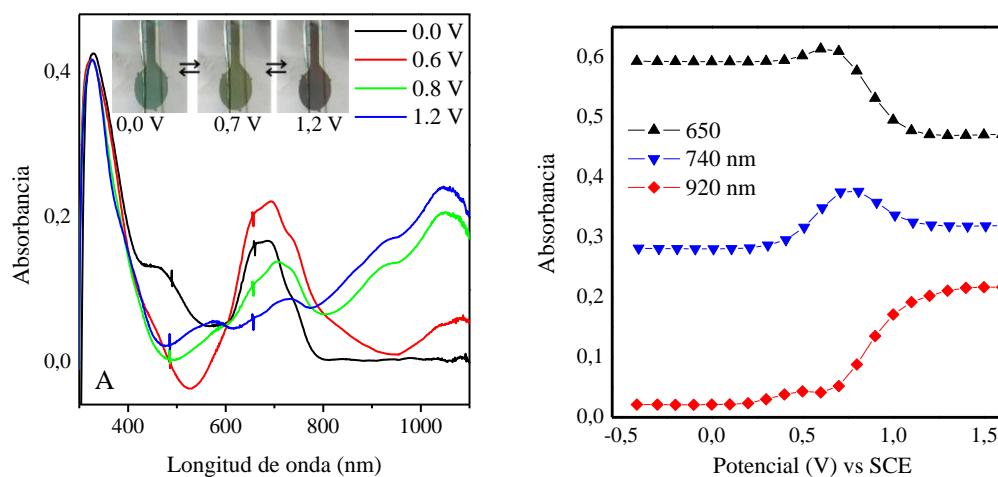


Figura 63. (A) Espectros de absorción de EDOT-ZnPc/ película e imagen fotográfica de la película a diferentes potenciales aplicados. (B) traza de absorción a diferentes longitudes de onda en función del potencial aplicado.

En la Figura 64. se observan fotografías de las películas poliméricas de EDOT-ZnPc y EDOT-CuPc sobre un electrodo de ITO. Las imágenes microscópicas muestran la homogeneidad de las superficies recubiertas con las ftalocianinas con el color verde típico de esta familia de compuestos.

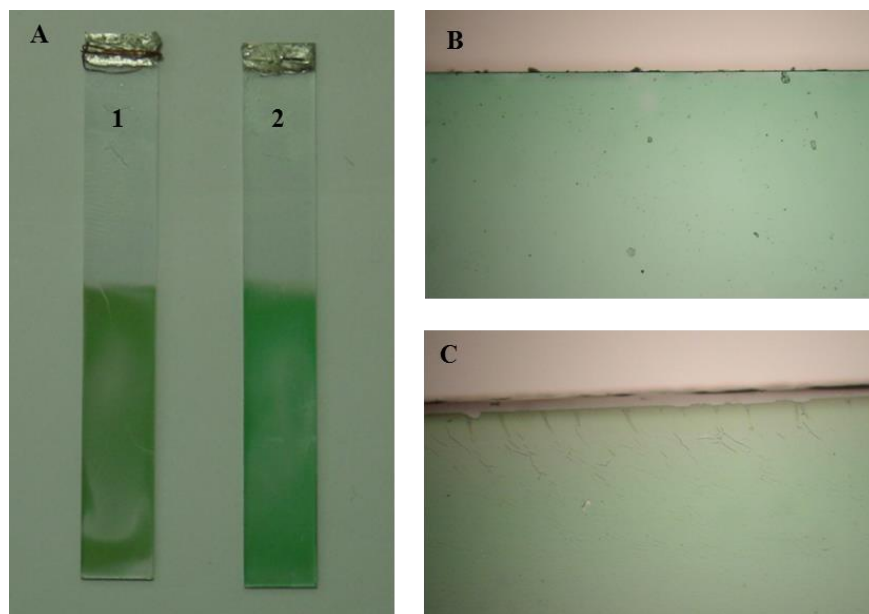


Figura 64. Fotografía se las películas de (A) EDOT-ZnPc/ película (1) y EDOT-CuPc/ película (2) e imagen a microscopio de las películas de (B) EDOT-CuPc/ película y (C) EDOT-ZnPc/ película (objetivo del microscopio 5x)

Se utilizaron técnicas de SEM para investigar la morfología de la superficie de las películas poliméricas obtenidas. La imagen SEM de EDOT-ZnPc/película (Figura 65.) depositada sobre electrodo de ITO muestra que el proceso de electropolimerización (-0,4 a 1,4 V) produce una película homogénea con algunos cristalitas globulares, sin grietas o agujeros en un rango de 10 μm . También la película es muy suave y presenta una baja rugosidad, incluso menor que la superficie de ITO. La película obtenida a partir de una ventana de potencial menor (-0,4 a 1,1 V) es muy similar a la obtenida en el primer caso. Las películas de EDOT-CuPc presentan una superficie sumamente lisa, que cubre toda el área del ITO.

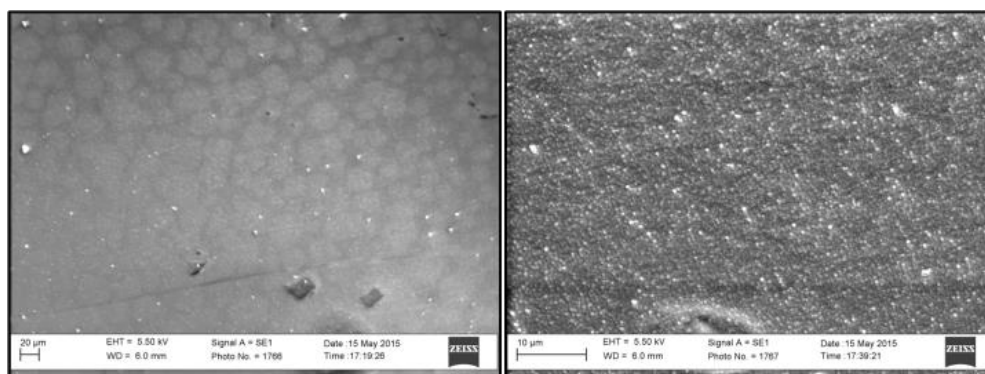


Figura 65. Imagen SEM de la película de EDOT-ZnPc/película obtenida a partir de un ciclado en el rango: -0,4 a 1,1 V.

6.4.1. Estudios espectroscópicos

En la Figura 66. se muestran los espectros de absorción UV-visible de las películas electropolimerizadas con EDOT-ZnPc/película y EDOT-CuPc/película. Dicha figuras confirman la electropolimerización de los derivados de ftalocianina sobre el ITO, y además, ponen de manifiesto que estos macrociclos tetrapirrólicos polimerizados, tienen similares transiciones electrónicas a las observadas en solución. Sin embargo, las bandas de las ftalocianinas electropolimerizadas, muestran un ensanchamiento con respecto a las correspondientes del PS en estado monomérico en DMF, demostrando así un efecto de agregación de los sensibilizadores unidos a la superficie. Además, presentan un aumento en la banda a 620-640 nm característica de la formación de agregados, principalmente para EDOD-CuPc/película, similar a lo observado en solución homogénea en metanol. Estos hechos indican la existencia de una interacción entre las ftalocianinas que están formando la estructura de la película [103].

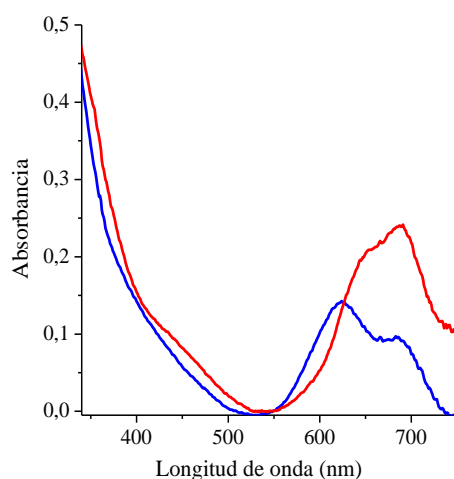


Figura 66. Espectros de absorción de las películas poliméricas de EDOT-ZnPc (rojo) y EDOT-CuPc (azul).

6.4.2. Fotólisis en estado estacionario

6.4.2.1. Estudios de fotooxidación de derivados del antraceno

La generación de la especie $O_2(^1\Delta_g)$ por parte de (EDOT-ZnPc/película y EDOT-CuPc/película) se estudió mediante la reacción de fotooxidación del DMA (Esquema 37). Para ello, se irradiaron soluciones de DMA (35 μ M) en DMF conteniendo las películas de Pc bajo condiciones aeróbicas. La reacción de fotooxidación se siguió mediante espectroscopía UV-visible ($\lambda_{m\acute{a}x}$ = 378 nm) [123]. Las irradiaciones se realizaron en el rango

de λ de 530 nm a 800 nm y posterior a las mismas no existió fotodescomposición de las Pc electropolimerizadas sobre ITO, indicando así la fotoestabilidad presente en las condiciones experimentales utilizadas (Figura 67.).

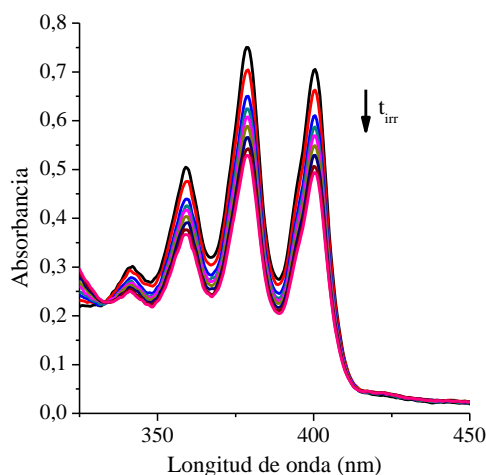


Figura 67. Espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación para la fotooxidación de DMA sensibilizada por EDOT-ZnPc/película en DMF ($\lambda_{irr}= 530-800$ nm).

A partir de los datos obtenidos de la cinética de fotooxidación de DMA a diferentes tiempos de irradiación ($\lambda_{irr} > 530$ nm), se determinaron los rendimientos cuánticos de $O_2(^1\Delta_g)$ (Φ_{Δ}). En la Figura 68. se observa el ajuste lineal de los gráficos aplicando la Ecuación 5. Las constantes de velocidad observadas (k_{obs}) para las películas electropolimerizadas EDOT-ZnPc y EDOT-CuPc se calcularon a partir de la pendiente de los gráficos (Tabla 12). Los rendimientos cuánticos para los PS se obtuvieron utilizando como compuesto de referencia M_4 -ZnPc [108], obteniendo un valor de $\Phi_{\Delta} = 0,078 \pm 0,005$ para EDOT-ZnPc/película mientras que EDOT-CuPc/película generó $O_2(^1\Delta_g)$ en menor medida ($\Phi_{\Delta} = 0,023 \pm 0,005$).

Resultados similares se encontraron para películas plásticas de polisilsesquioxano punteado, dopadas con 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(4-metilfenil)porfirina (SSO-P). Un valor de k_{obs} de $6,3 \pm 0,3 \times 10^{-4} s^{-1}$ se halló para SSO-P para la fotooxidación de DMA en DMF irradiando con luz de 455 nm a 800 nm [93].

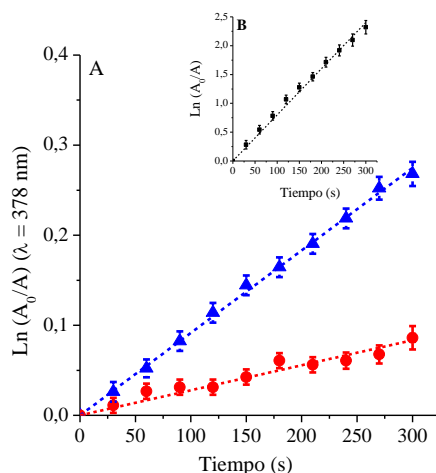


Figura 68. Cinética de fotooxidación de DMA (35 μM) sensibilizado por ftalocianinas electropolimerizadas. Gráfico de primer orden para las ftalocianinas (A) EDOT-ZnPc (●), EDOT-CuPc (▲) y (B) M_4 -ZnPc (■) (gráfico inserto). ($\lambda_{\text{irr}} = 530\text{-}800\text{ nm}$) en DMF.

Tabla 12. Parámetros cinéticos (k_{obs}) para la descomposición de DMA sensibilizada por ftalocianinas y rendimientos cuánticos de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (Φ_Δ) en DMF.

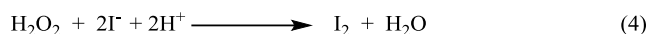
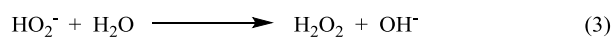
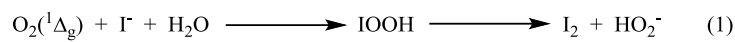
Ftalocianinas	k_{obs} (s^{-1})	Φ_Δ
EDOT-ZnPc/película	$(9,1 \pm 0,9) \times 10^{-4}$	$0,078 \pm 0,008$
EDOT-CuPc/película	$(2,7 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	$0,023 \pm 0,002$
M_4 -ZnPc	$(8,01 \pm 0,08) \times 10^{-3}$	$0,69 \pm 0,07$

6.4.3. Generación de especies de yodo

La incorporación de KI al tratamiento de PDI se llevó a cabo con el objetivo de incrementar el daño celular durante el tratamiento. La interacción que se produce entre las ROS y las especies reactivas de yodo durante la exposición a la luz, provocan una mejora en la inactivación microbiana. El aumento en la del tratamiento eficacia debido al efecto sinérgico del KI y el PS, presenta relevancia a la hora de la erradicación de la infección [153].

La generación de especies reactivas de yodo se estudió mediante medidas de espectroscopía UV-visible de soluciones de 0,1 M de KI en PBS en presencia de EDOT-Pcs/películas bajo condiciones aeróbicas. El Esquema 51 muestra las reacciones del anión ioduro y $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ en medio acuoso. Como resultado de dicha reacción (1), se genera I_2 que posteriormente reacciona con el anión I^- para generar aniones triioduro (I_3^-) (Esquema 51 (2)). La reacción anteriormente mencionada, es utilizada además para la detección indirecta

de dicha ROS. Además, en este proceso se forma peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Esquema 51 (3)) que en presencia de exceso de aniones ioduro, reacciona para generar I_2 . De esta manera se desencadenan con carácter cíclico nuevamente las reacciones presentadas en el Esquema 51 [154,155,156].



Esquema 51. Reacciones generadas a partir de la combinación del anión ioduro con la especie $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.

La Figura 69 permite observar las bandas de absorción características de la especie I_3^- obtenidas luego de la irradiación por 30 min y 60 min de las soluciones en PBS con las películas EDOT-Pcs. Longitudes de onda de 286 nm y 350 nm se hallaron para dicha especie, en las dos películas poliméricas analizadas. EDOT-ZnPc/película mostró ~ 40% más de generación de I_3^- en comparación con la película que contiene Cu.

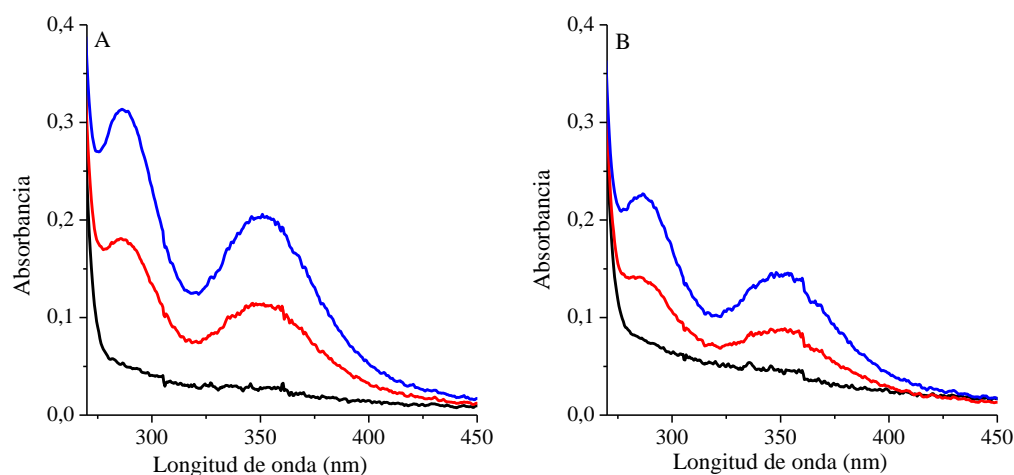


Figura 69. Espectros de absorción de: (A) EDOT-ZnPc/película y (B) EDOT-CuPc/película en PBS con KI 0,1 M a diferentes tiempos de irradiación, 0 min (negro), 30 min (rojo) y 60 min (azul).

Estudios previos con fotosensibilizadores, tales como BODIPYs catiónicos, han demostrado el crecimiento en función del tiempo de irradiación de la banda ~ 360 nm del anión tri-ioduro (I_3^-) [151]. Además, investigaciones reportan la presencia de dos bandas de absorción en la región ultravioleta del espectro para I_3^- , siendo estas a 291 nm y 361 nm

[152,153]. Estos trabajos concuerdan con los resultados obtenidos en los estudios de EDOT-Pcs/películas con KI.

6.4.4. Estudios en medios biológicos

6.4.4.1. Inactivación fotodinámica de *S. aureus* empleando películas electropolimerizadas

La PDI de *S. aureus* se estudió utilizando películas electropolimerizadas de EDOT-Pcs (área= 2,1 cm², Abs~ 0,1). La supervivencia celular de *S. aureus* se evaluó mediante la deposición de 250 µL de la suspensión bacteriana (~10⁴ UFC/mL) sobre la película polimérica y la posterior irradiación por 30 min y 60 min. Los estudios control se llevaron a cabo en presencia de irradiación y de PS, y además en oscuridad con PS. Estos experimentos control evidenciaron que solamente la PDI de EDOT-Pcs/películas son las que afectan la supervivencia celular. Además, los resultados de los tratamientos de PDI no se vieron afectados al reutilizar las EDOT-Pcs/películas hasta tres veces.

La Figura 70. muestra el efecto de fotoinactivación bacteriana causada por EDOT-ZnPc/película y EDOT-CuPc/película. Como puede observarse, la PDI de *S. aureus* en PBS no resultó efectiva cuando se utilizaron los dos PS electropolimerizados.

Con el objetivo de mejorar la eficiencia en PDI de bacterias Gram positivas por parte de EDOT-ZnPc/película y EDOT-CuPc/película, se llevaron a cabo los estudios de fotoinactivación de *S. aureus* en presencia de KI. Se adicionó externamente, como sal, el ion yoduro (I⁻) para incorporar al sistema el efecto de átomo pesado y además, el efecto salino influye en las características de las membranas celulares [154,155,156].

Los estudios se llevaron a cabo incubando los microorganismos por 30 min con 0,1 M de KI en PBS, con el objetivo de potenciar el efecto del tratamiento. Luego de la incubación, se depositaron 250 µL de la suspensión sobre la superficie y se irradiaron por 30 min y 60 min. A partir de ello, se observó una total eficiencia del tratamiento de PDI frente a células de *S. aureus* tanto para EDOT-ZnPc/película como para EDOT-CuPc/película (Figura 70.).

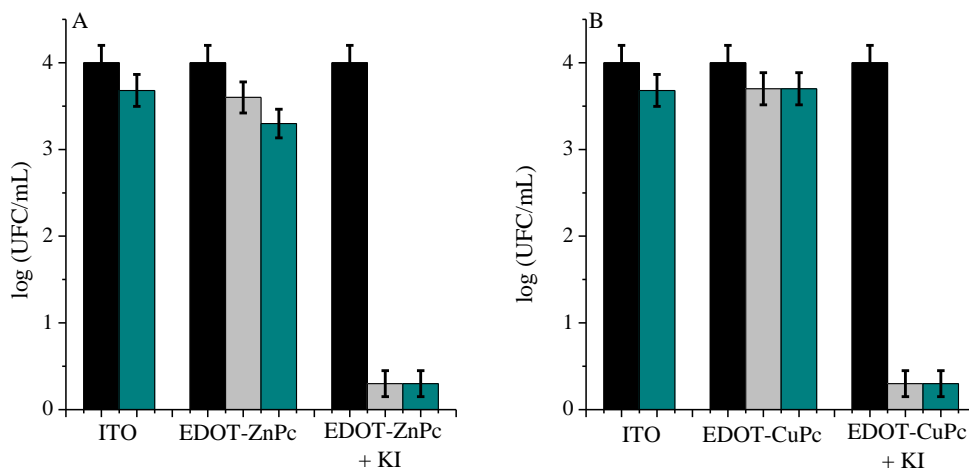


Figura 70. PDI de *S. aureus* empleando películas electropolimerizadas: (A) EDOT-ZnPc y (B) EDOT-CuPc, potenciadas con KI 0,1 M e irradiadas 30 min (gris), 60 min (cian). Control oscuridad (negro)

El anión I_3^- presenta una mayor difusión dentro de las células por lo que el daño es mayor, mientras que el $O_2(^1\Delta_g)$, al tener un tiempo de vida muy corto ($\sim 3,5 \mu s$) sólo genera daño en aquellas células que se encuentran en contacto con la película polimérica [154-157]. Debido a estas características, es de esperar que en presencia de KI, se genere un aumento en la producción de ROS y también en las especies reactivas de yodo (Esquema 51). De esta manera, las posibilidades de dañar los sistemas celulares aumenta [154-156]. El efecto potenciador del KI es efectivo aún para aquellos PS con baja producción de oxígeno singlete.

Estudios realizados en condiciones similares, sin la adición de KI, se han reportado para películas electropolimerizadas de porfirinas y diadas de porfirinas-fullereno C_{60} . Una fotoinactivación $> 99,99 \%$ de células de *S. aureus* obtuvieron para TCP al igual que para la diada TCP- C_{60} [97]. En comparación con los resultados obtenidos en el presente estudio, se encontró una menor efectividad en la erradicación de las bacterias Gram positivas que los resultados informados en bibliografía. Sin embargo, para las películas con Pcs la adición de KI permitió potenciar la inactivación de las bacterias Gram positivas.

6.4.5. Inactivación fotodinámica de biopelículas microbianas

6.4.5.1. PDI de biopelículas de *S. aureus*

Estudios de PDI inducida por los electropolímeros de EDOT-Pcs se llevaron a cabo *in vivo* utilizando biopelículas de *S. aureus*. Sobre las EDOT-Pcs/películas (área: $0,7 \text{ cm}^2$) se hicieron crecer biopelículas bacterianas durante 24 h. Posteriormente las superficies conteniendo la biopelícula de *S. aureus*, se lavó con PBS para eliminar células bacterianas

no adheridas y también aquellas que se adhirieron en la parte posterior de la superficie electropolimerizada [116]. Esta etapa de lavado se realiza con el fin de eliminar las bacterias depositadas en la parte no electropolimerizada del ITO, para así analizar la eficiencia posterior del tratamiento en la biopelícula generada sobre las películas de EDOT-Pcs. Por último, las películas se transfirieron a un pocillo con 500 μL de PBS y se irradiaron con luz visible por 30 min y 60 min. Los experimentos control indicaron que la viabilidad de las bacterias no se ve afectada cuando se mantienen las películas electropolimerizadas en oscuridad, ni durante los tratamientos de irradiación por 60 min.

La Figura 71 A permite observar el efecto de fotoinactivación celular que generaron las EDOT-Pcs/película luego de 30 min y 60 min de irradiación. Este tipo de tratamiento evidenció una disminución del $\sim 11\%$ de la supervivencia celular utilizando EDOT-ZnPc/película y $\sim 5\%$ para EDOT-CuPc/película. Debido a que el efecto de PDI de los electropolímeros resultó escaso, se decidió llevar a cabo la potenciación del tratamiento en presencia de KI. Para ello las irradiaciones se realizaron con las EDOT-Pcs/película inmersas en una solución de KI 0,1 M en PBS. Posterior al tratamiento se observó una potenciación de la PDI bajo la presencia de dicha sal (Figura 71 B), EDOT-ZnPc/película evidenció una disminución de $\sim 40\%$ y para EDOT-CuPc/película $\sim 15\%$ cuando se irradió durante 60 min.

Estos resultados mostraron que ante la adición externa de KI, se generó un mayor efecto en el tratamiento de PDI de la cepa *S. aureus*. Esto se debe a la mayor susceptibilidad que presentan las bacterias Gram positivas, debido a la composición de su membrana celular, ante el ataque tanto de ROS generadas por el PS, como de aquellas especies provenientes de las reacciones de I con las ROS (Esquema 51).

Los resultados obtenidos son comparables con la PDI de biopelículas de *S. aureus* utilizando PS en solución. Una PDI de $\sim 50\%$ de inhibición de la supervivencia celular de las biopelículas bacterianas se reportó para la porfirina 5,10,15,20- tetrakis[4-(3-*N,N*-dimetilammonio)propoxi]fenil]porfirina (TAPP) [116].

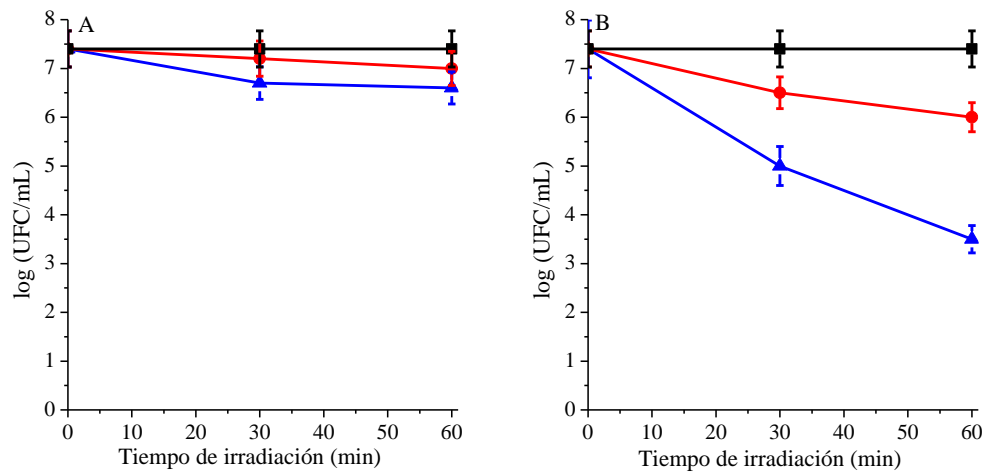


Figura 71. PDI de biopelículas de *S. aureus*: (A) EDOT-CuPc (●), EDOT-ZnPc (▲) ITO (■). (B) EDOT-CuPc + KI (0,1 M) (●), EDOT-ZnPc + KI (0,1 M)(▲), ITO + KI (0,1 M) (■).

Capítulo 7- CONCLUSIONES

7. Conclusiones

Se sintetizaron diferentes ftalocianinas catiónicas, dos de ellas poseen tres cargas positivas y la restante, cuatro cargas. Las ftalocianinas tricatónicas se obtuvieron a partir de la reacción de expansión del anillo de la SubNPc con el ftalonitrilo correspondiente, mientras que la tetra catiónica, por la reacción de ciclotetramerización del 4-nitroftalonitrilo. Inicialmente se obtuvieron Pcs conteniendo grupos NO_2 como sustituyentes, los cuales se redujeron a las correspondientes amino-ftalocianinas $(\text{NH}_2)_4\text{-ZnPc}$, $\text{A}(\text{NH}_2)_3\text{-ZnPc}$ y $\text{CF}_3(\text{NH}_2)_3\text{-ZnPc}$. Finalmente, mediante metilación exhaustiva se sintetizaron los PSs catiónicos $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{+4}$, $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{+3}$ y $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{+3}$. Este procedimiento de metilación asegura la producción de cargas positivas en los compuestos con rendimientos mayores al 90%.

Los estudios espectroscópicos de absorción en DMF muestran que las ftalocianinas catiónicas sintetizadas presentan bandas Q, características de esta familia de PSs cuando se encuentran en estado monomérico. Sin embargo, esta banda presenta un corrimiento hipsocrómico, un ensanchamiento y una disminución en su intensidad en solventes orgánicos, tales como DCM y metanol, debido a la formación de agregados. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia determinados en DMF fueron $\Phi_F = 0,04$ y $0,02$ para $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{+4}$ y $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{+3}$, respectivamente. Sin embargo, $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{+3}$ obtuvo $\Phi_F = 0,14$. Este valor de Φ_F obtenido para $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{+3}$ es el adecuado para cuantificar el PS en medios biológicos y realizar estudios de localización intracelular.

La generación de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ se determinó en DMF y los resultados mostraron valores de $\Phi_\Delta = 0,48$ para $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{+3}$, mientras que para $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{+4}$ y $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{+3}$ no se detectó la formación de dicha especie. Además, se determinó la producción de especie O_2^- mediante el estudio de la reacción de NBT en presencia de $\beta\text{-NADH}$ sensibilizada por $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{+3}$, mostrando resultados positivos. Por otro lado, se estudió la cinética de fotooxidación de L-Trp en presencia de los PSs catiónicos. Los resultados mostraron que para $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{+3}$ la velocidad de reacción es mayor que cuando se utilizan $(\text{NM}_3)_4\text{-ZnPc}^{+4}$ y $\text{CF}_3(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{+3}$ como PS. Además, se estudió el mecanismo de acción fotodinámica por el cuál actúa $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{+3}$ analizando las cinéticas de fotooxidación de L-Trp utilizando desactivadores de ROS, tales como azida de sodio y D-manitol. Debido a que la presencia de azida de sodio inhibe en mayor medida la fotooxidación de L-Trp que

el D-manitol, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la generación de $O_2(^1\Delta_g)$, se deduce que existe una contribución importante del mecanismo tipo II.

La inactivación fotodinámica de *C. albicans* se evaluó con $(NM_3)_4-ZnPc^{+4}$, $A(NM_3)_3-ZnPc^{+3}$ y $CF_3(NM_3)_3-ZnPc^{+3}$. Estos estudios indicaron que $A(NM_3)_3-ZnPc^{+3}$ generó una mayor PDI del microorganismo (~ 5 log). Por otra parte, $(NM_3)_4-ZnPc^{+4}$ y $CF_3(NM_3)_3-ZnPc^{+3}$ no afectaron la viabilidad celular postratamiento. A partir de los resultados obtenidos con los distintos PSs, se evaluó $A(NM_3)_3-ZnPc^{+3}$ para inactivar células de *C. albicans* que se encuentran en suspensión planctónica, en colonias sobre una superficie de agar y en biopelículas. En suspensión se investigó la fotoinactivación de *C. albicans* variando la concentración de $A(NM_3)_3-ZnPc^{+3}$ (1-5 mM) y los tiempos de irradiación (5-30 min). Esta ftalocianina se une rápidamente ($< 2,5$ min de incubación) a las células alcanzando valores de 0,25 y 1,10 nmol/ 10^6 células para 1 y 5 μM $A(NM_3)_3-ZnPc^{+3}$, respectivamente. Después de 5 min de irradiación se observó una disminución en la viabilidad celular de 3,5 y 5 log, respectivamente. Este último resultado representa un valor $>99,999\%$ de fotoinactivación. Asimismo, la fotoinactivación celular no cambió después de dos etapas de lavado, indicando una unión fuerte del PS a *C. albicans*. Los ensayos de PDI en colonias sobre agar mostraron que $A(NM_3)_3-ZnPc^{+3}$ detiene el crecimiento de la levadura. Además, este PS fue capaz de fotoinactivar biopelículas de *C. albicans*. Conjuntamente, se estudió la PDI de bacterias Gram positivas (*S. aureus*) y Gram negativas (*E. coli*), obteniendo una erradicación $> 99,99\%$ de las células bacterianas utilizando 5 μM de $A(NM_3)_3-ZnPc^{+3}$ y el menor tiempo de irradiación. Estos resultados indican que $A(NM_3)_3-ZnPc^{+3}$ presenta propiedades propicias para su utilización en PDI de microorganismos

Por otro lado, se sintetizaron ftalocianinas unidas a polímeros catiónicos, tales como quitosano (Q) y polietilenimina (PA). Una ftalocianina de simetría A_3B conteniendo un grupo éster (Bn-ZnPc), se obtuvo a partir de la reacción de expansión del anillo de la subftalocianina con el derivado de ftalonitrilo correspondiente. Posteriormente, la hidrólisis en medio básico permitió obtener la ftalocianina sustituida por un grupo ácido carboxílico (A-ZnPc), a partir de la cual se formaron los PSs Q-ZnPc y PA-ZnPc.

Los estudios espectroscópicos de absorción de ambos PS mostraron bandas Q agudas en DMF indicando que las moléculas se encuentran en estado monomérico. Además, se puede inferir que la presencia de los sustituyentes Q y PA no generan modificaciones espectroscópicas observables. Los conjugados Q-ZnPc y PA-ZnPc presentaron emisión de

fluorescencia en DMF similares con $\Phi_F \sim 0,28$ adecuados para la cuantificación del sensibilizador en medios biológicos.

Los estudios fotodinámicos mostraron que ambos PSs generan $O_2(^1\Delta_g)$, con valores de $\Phi_\Delta \sim 0,44$ en DMF y $\sim 0,33$ en agua. Mediante el estudio de la fotooxidación del NBT se dilucidó que Q-ZnPc y PA-ZnPc generan $O_2^{\cdot-}$. Q-ZnPc y PA-ZnPc exhibieron una contribución de ambos mecanismos de fotoreacción en la fotooxidación de L-Trp en presencia de atrapadores de ROS, con un aporte levemente mayor del mecanismo tipo II.

Los estudios en *C. albicans*, *S. aureus* y *E. coli* indicaron que los conjugados poliméricos sintetizados mostraron una cinética de unión rápida a tiempos cortos de incubación (2 min). Los estudios de PDI de *C. albicans* fotosensibilizada por PA-ZnPc, exhiben una disminución de la supervivencia celular de ~ 5 log, utilizando 5 μ M de PS y un tiempo de irradiación de 5 min. Sin embargo, la molécula Q-ZnPc no generó un efecto de PDI apreciable. Cuando se llevó a cabo la fotoinactivación de *S. aureus*, se obtuvieron resultados de inactivación $> 99,99\%$ para PA-ZnPc y una disminución de $\sim 15\%$ para Q-ZnPc, utilizando 5 μ M de PS y 30 min de irradiación. Los estudios de PDI de *E. coli* fotosensibilizada por Q-ZnPc y PA-ZnPc no mostraron variabilidad apreciable en los valores de la supervivencia celular de la bacteria. Debido a esto, se potenció el efecto de PDI de los PS (10 μ M), agregando Q debido a las propiedades antibacteriales, biocompatible y biodegradable que presenta. Cuando se combinó la acción de Q y PA-ZnPc para fotoinactivar *E. coli* se logró la erradicación total de la cepa, mientras que la combinación de Q y Q-ZnPc disminuyó la viabilidad en ~ 5 log.

Con el objetivo de obtener películas electropolimerizadas, se sintetizaron dos ftalocianinas simétricas con sustituyente EDOT. La sustitución de la periferia del macrociclo con grupos electroactivos permite la formación de películas. Mediante la ciclotetramerización del ftalonitrilo EDOT-Pn se obtuvieron dos Pcs de simetría A_4 : EDOT-ZnPc y EDOT-CuPc con rendimientos de $\sim 40\%$.

Los estudios espectroscópicos de absorción muestran que las ftalocianinas presentan las bandas Q a $\lambda \sim 670$ nm en DMF, características de estos macrociclos disueltos en forma monomérica. Sin embargo, esta banda se ensancha y disminuye su intensidad en un solvente orgánico polar como metanol, debido a la formación de agregados. Además, EDOT-ZnPc presentó emisión de fluorescencia con un rendimiento cuántico de fluorescencia de 0,23 en DMF. Sin embargo, EDOT-CuPc no mostró fluorescencia, debido a que los complejos que

forman quelatos con Cu(II), presentan una fluorescencia intrínseca débil. Además, para ambos PS se obtuvieron valores de $\Phi_{\Delta} = 0,76$ y $0,01$ para EDOT-ZnPc y EDOT-CuPc, respectivamente.

La electropolimerización de los monómeros EDOT-ZnPc y EDOT-CuPc se realizó sobre electrodos de Pt e ITO. Las películas electrogeneradas presentaron efectos electrocrómicos interesantes, exhibiendo una superficie homogénea, buena conductividad eléctrica y estabilidad. Estas características son de gran importancia para su aplicación en el desarrollo de dispositivos optoelectrónicos. Los espectros de absorción de las películas poliméricas confirmaron la electropolimerización de los derivados de ftalocianina sobre el ITO. Se observó también que los derivados de ftalocianinas polimerizados poseen similares transiciones electrónicas a las observadas en solución, con un marcado ensanchamiento en las bandas de absorción, producto de la agregación del macrociclo en la película. Estos electropolímeros generan $O_2(^1\Delta_g)$ en DMF con valores de $\Phi_{\Delta} = 0,078$ y $0,023$ para EDOT-ZnPc/película y EDOT-CuPc/película, respectivamente. Además, se observó que al irradiar las EDOT-Pcs/películas en presencia de KI formaron la especie reactiva de yodo I_3^- .

Los estudios de PDI de *S. aureus* en soluciones planctónicas en presencia de las películas poliméricas mostraron una escasa efectividad en el tratamiento. Sin embargo, cuando se adicionó KI se potenció la fotoinactivación de la bacteria. La presencia de las ROS y las especies reactivas de yodo producen un aumento $> 99,99\%$ en la inactivación bacteriana para ambas EDOT-Pcs/películas. Por otro lado, se estudió la PDI de biopelículas de *S. aureus* utilizando películas de EDOT-Pcs. Ambas películas no produjeron variación en la supervivencia celular de las biopelículas bacterianas. Sin embargo, cuando se realizó la PDI utilizando KI se evidenció un aumento en la efectividad del tratamiento. La película EDOT-ZnPc/película produjo una disminución de $\sim 4,5$ log en la supervivencia celular biopelícula, mientras que un decrecimiento de $\sim 1,5$ log se encontró para EDOT-CuPc/película.

Los resultados muestran que la combinación de cargas positivas y el carácter anfifílico presente en $A(NM_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ hacen de esta ftalocianina un PS muy efectivo para inactivar los microorganismos estudiados. Además, la conjugación de la ftalocianina con polímeros catiónicos permite obtener agentes fotodinámicos prometedores para erradicar *C. albicans* y *S. aureus* mediante tratamientos de PDI. Por otro lado, las películas fotoactivas pueden ser

aplicadas en la inactivación de microorganismos evitando la acumulación del PS en el medio y permitiendo su reutilización en tratamientos posteriores.

**Capítulo 8 - ANEXO I: Fotosensibilizadores catiónicos
aplicados en terapia fotodinámica de cáncer**

8. ANEXO I

Fotosensibilizadores catiónicos aplicados en terapia fotodinámica de cáncer

8.1. Introducción

La PDT aplicada a cáncer, la cual combina la utilización de una droga (fotosensibilizador), luz visible y oxígeno, se ha convertido en una alternativa viable para el tratamiento de enfermedades cancerosas [1-3]. Los tratamientos de PDT para cáncer se basan en la administración de una molécula PS, la cual se acumula e incorpora selectivamente en células neoplásicas. La posterior exposición a la luz visible del tejido dañado origina diferentes eventos bioquímicos provocando la eliminación de productos tóxicos que inactivan de manera específica a las células neoplásicas [4-5]. Sin bien, los mecanismos fotoquímicos y fotobiológicos que dan lugar a dichos eventos no se encuentran completamente dilucidados, está aceptado que la especie reactiva $O_2(^1\Delta_g)$, en general, es la principal responsable del fotodaño [3,6]. Los fotoproductos responsables de causar la toxicidad en las células forman parte de las ROS, tales como $O_2(^1\Delta_g)$, O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot [3,5].

Investigaciones previas en conjunto con la realizada en este trabajo de tesis doctoral, han demostrado que los derivados de ftalocianina son PSs adecuados para su utilización en PDI mostrándose así como potenciales agentes para su aplicación en PDT [77,124]. La eficiencia y el mecanismo de PDT se encuentran ampliamente relacionados con la localización intracelular del PS [8-12]. Los derivados de ftalocianinas son compuestos considerados PSs que presentan una importancia significativa para la aplicación en PDT [158]. En este sentido, dependiendo de la estructura molecular que el PS presente, es la localización posterior que tendrá dentro de las células neoplásicas [2,3,158].

En el presente apartado se trabajó con células pertenecientes a las líneas celulares HeLa y HaCaT. Tanto las células HeLa como otras líneas celulares, juegan actualmente un papel importante en el estudio y desarrollo de nuevos materiales y tecnologías como bio-sensores [159]. HeLa es una línea celular de adenocarcinoma cérvico-uterino humano más utilizada en los laboratorios de todo el mundo [159].

Por otro lado, uno de los problemas actuales de la sociedad es la aparición de diversas enfermedades neoplásicas y no neoplásicas que involucran células basales de la piel como las células HaCaT [160-161]. En este sentido diversos estudios de PDT se han desarrollado

para estudiar y dilucidar los mecanismos de muerte de este tipo de células [160,162]. Además, en una numerosa cantidad de investigaciones de PDT, se estudia con frecuencia el éxito del tratamiento teniendo en cuenta el efecto por la interacción de las células inmunes del huésped y las células cancerosas moribundas [163]. El objetivo es fusionar el efecto citotóxico del tratamiento, eliminando residuos celulares posiblemente de metástasis [163]. Muchos tumores presentan células inmunes infiltradas antes, durante y posterior al tratamiento de PDT [163].

Las membranas desempeñan papeles fundamentales en los organismos vivos, debido a que no sólo organizan tejidos, células y orgánulos, sino que también influye en la concentración, difusión, reactividad y conformación de biomoléculas. En consecuencia, el reconocimiento, la vinculación y la permeación de moléculas a través de membranas específicas son temas fundamentales de investigación en farmacología [164]. Es importante mencionar que la escasa unión de los PSs a las membranas celulares puede ser una desventaja a la hora de realizar tratamientos de PDT. Es por ello, que los estudios en sistemas organizados tales como vesículas, son de gran interés en el área ya que permiten imitar los sistemas celulares.

Los estudios de PDT se desarrollaron en su totalidad en los laboratorios a cargo del Prof. Mauricio da Silva Baptista, de la Universidad de Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil, durante los meses de marzo, abril y mayo del año 2018. Dichos experimentos se llevaron a cabo en el marco de la Beca otorgada a investigadores jóvenes de América del Sur en el área de Bioquímica y Biología Molecular (South American Research and Travel Grants –SART-) por la Sociedad Brasileira de Bioquímica y Biología Molecular (SBBq).

8.2.Objetivos

8.2.1. Objetivo general

Evaluar la actividad fotodinámica de ftalocianinas catiónicas en células HeLa y HaCaT.

8.2.2. Objetivos específicos

- a) Determinar la unión de ftalocianinas en células HeLa y HaCaT.

- b) Evaluar la citotoxicidad y fototoxicidad inducida por ftalocianinas en células HeLa y HaCaT.
- c) Determinar la unión de ftalocianinas en membranas mímicas.
- d) Estudiar el efecto fotodinámico de ftalocianinas en vesículas.
- e) Evaluar el daño de la membrana de vesículas multilaminares causado por ftalocianinas catiónicas.

8.3. Metodología

8.3.1. Equipamiento general

Las medidas espectroscópicas de absorbancia UV-visible se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC (Shimadzu Corporation, Tokio, Japón). Los espectros se midieron utilizando una celda de cuarzo con paso óptico de 1 cm.

En los estudios realizados en líneas celulares se utilizó como sistema de irradiación una cámara de irradiación RGB fotoestable (Ethik, Brasil) con control de temperatura (15°C a 60°C), equipado con LEDs de diferente longitud de onda (450 nm, 520 nm y 657 nm) (Esquema A 1).



Esquema A 1. Sistema de irradiación: cámara de irradiación (A), sistema de control de parámetros (B) .

Las botellas y placas utilizadas para los cultivos celulares fueron obtenidas de Corning, las microplacas para medidas de fluorescencia (96 pocillos) de Greiner y las cámaras de cultivo sobre lamínula (LabTek – 48 pocillos) de Nunc. Los tratamientos celulares fueron llevados a cabo en una cabina de seguridad biológica de Clase II A1 equipada con una lámpara germicida (254 nm, 30 W). Los microscopios invertidos utilizados fueron: TE-2000 de Nikon (Francia), equipado con una lámpara de mercurio de 130 W. Los espectros de absorbancia, fluorescencia y las medidas de fluorescencia fueron realizados en un lector de microplacas multimodo SpectraMax (Molecular Devices).

8.3.2. Reactivos y solventes

Los reactivos químicos utilizados fueron ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), buffer fosfato salino (PBS), carboxifluoresceína (CF), cloruro de sodio (NaCl), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), 1,2-Dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (DOPC), 1,2 dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilholina (DPPC), dodecil sulfato sódico (SDS), lecitina de Soja, medio Dulbecco's Eagle's modificado (DMEM), medio Sephadex G-50, 4-(1,1,3,3-Tetrametilbutil)fenil-polietilen glicol (Triton X-100), palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-[fosfor-rac-(1-glicerol)] sal de sodio (POPG), penicilina, piruvato de sodio, rojo fenol, suero fetal bobino (FBS y FCS), streptomina, Tripsina. Los solventes utilizados fueron agua, cloroformo (CHCl₃), *N,N*-dimetilformamida (DMF) y dimetilsulfóxido (DMSO). Tanto reactivos como solventes fueron provenientes de Aldrich y se usaron sin purificación adicional.

8.3.3. Fotosensibilizadores

Las ftalocianinas ZnAPc⁴⁺ y ZnPPc⁴⁺ se obtuvieron como se reporta en bibliografía [77,124]. La molécula A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ se sintetizó en el presente trabajo de tesis (Sección 3.3.1.8.).

Las soluciones stock ~0,5 mM de cada uno de los compuestos se prepararon mediante medidas de absorción, utilizando DMF como solvente.

8.3.4. Estudios espectroscópicos

Los estudios espectroscópicos de absorción se llevaron a cabo mediante la utilización de una celda de cuarzo, de paso óptico de 1 cm a 25,0±0,5 °C usando como solventes DMF y PBS. Los estudios espectroscópicos realizados con membranas mímicas y sistemas celulares, se llevaron a cabo en microplacas de 48 y 96 pocillos.

8.3.5. Estudios en medios biológicos

8.3.5.1. Estudios en líneas celulares

8.3.5.1.1. Cultivo celulares

Las líneas celulares de adenocarcinoma humano HeLa (ATTC CCI-2) y de queratinocitos (HaCaT) se cultivaron en botellas de plástico de 75 cm² con 9 mL de medio

DMEM con piruvato de sodio y rojo fenol, suplementado con FBS y 1% penicilina/estreptomicina a 37 °C. Las células crecieron en incubadora húmeda con 5% CO₂ a 37 °C ON. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se adicionó 2 mL de Tripsina y 8 mL de medio DMEM. Se incubó por 24 h y se repitió el procedimiento hasta conseguir una adhesión celular mayor al 80 % y menor al 95%.

8.3.5.1.2. Estudios de unión celular

Una concentración celular de $1,4 \times 10^6$ células/microplaca de 48 pocillos se sembraron e incubaron ON en atmósfera de CO₂ (5 %) a 37 °C, para permitir la adhesión de las células a la matriz de la microplaca. Las células (HeLa y HaCaT) se trataron con 5 μM de los PSs en PBS y se incubó por diferentes períodos de tiempo (1 h, 2 h, 3 h y 4 h) en oscuridad con 5% CO₂ a 37 °C. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se procedió al lisado de las células que quedaron adheridas con SDS 50 mM. Se realizaron controles celulares conteniendo 5 μM de los PS. Las medidas de emisión de los PS se llevaron a cabo en un lector de microplacas SpectraMax, $\lambda_{exc} = 610$ nm y la intensidad de fluorescencia se evaluó en el rango de 650 nm a 750 nm.

A partir de dichas soluciones, se midió la tasa o porcentaje de unión del PS a las células Ecuación A 1.

$$\text{Tasa de unión} = \frac{[PS]_{unido}}{[PS]_{total}}$$

Ecuación A 1

Donde $[PS]_{total} = [PS]_{unido} + [PS]_{libre}$, siendo $[PS]_{unido}$ aquella concentración de fotosensibilizador unida a las células y $[PS]_{libre}$, aquel que no se unió a las mismas.

8.3.5.1.3. Estudios de fototoxicidad de ftalocianinas en células HeLa y HaCaT

Las células HeLa y HaCaT se sembraron en microplacas de cultivo de 48 pocillos con una densidad celular de $1,4 \times 10^6$ células/microplaca y se las incubó con 5% CO₂ a 37 °C ON. Una vez conseguida la adhesión celular, 1 μM de PS incorporado a liposomas de lecitina de soja (2,5 mg/mL), se incubaron con las células por diferentes tiempos (1 h, 2 h y 3 h). Transcurrido el tiempo de incubación, se eliminó el sobrenadante, se lavaron las células con

PBS y se colocó PBS para la posterior irradiación de las células ($\lambda_{\text{irr}} = 660 \text{ nm}$). Se utilizaron diferentes dosis de irradiación 2 J/cm^2 , 6 J/cm^2 y 10 J/cm^2 . La supervivencia celular se midió 24 h más tarde utilizando el ensayo de viabilidad celular de MTT (50 mg/mL) en DMSO [9].

8.3.6. Estudios en membranas mímicas

8.3.6.1. Estudio de unión de los PS a vesículas multilaminares (MLV)

Las vesículas multilaminares (MVL) se formaron a partir de la disolución de 90% de DPPC ($6,6 \text{ mg}$, $9 \text{ }\mu\text{mol}$) y 10% de POPG ($0,7 \text{ mg}$, $1 \text{ }\mu\text{mol}$) en cloroformo, posteriormente se evaporó el solvente bajo flujo de argón para así generar la película de MVL. El protocolo de trabajo utilizado ya ha sido reportado en bibliografía [164]. La película de MVL se hidrató con 2 mL de Buffer Tris $10 \text{ mM/NaCl } 300 \text{ mM}$ y el sistema se agitó con vortex durante 3 min . Seguidamente, la solución se centrifugó a 13500 rpm durante 3 min , se retiró el sobrenadante y se agregó al pellet formado, 2 mL del Buffer utilizado previamente. Este proceso se repitió tres veces y por último se re-disolvió el pellet en 2 mL de Buffer, utilizándose como solución stock de MVL.

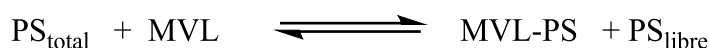
Posteriormente, se colocó $50 \text{ }\mu\text{L}$ del stock de MVL, $5 \text{ }\mu\text{M}$ de PS y la cantidad necesaria de Buffer para completar el volumen final de 2 mL . Cada fotosensibilizador se incubó con las MVL diferentes intervalos de tiempo (30 min , 60 min y 120 min). Finalmente se repitió el proceso de centrifugado con el objetivo de separar el sobrenadante que contiene PS sin unirse a las MVL y el pellet, con el PS incorporado a las MVL. Se colocó por un lado 1 mL del sobrenadante con 1 mL de SDS 100 mM , y por el otro, al pellet se le agregó 1 mL de Buffer y 1 mL de SDS 100 mM .

A partir de dichas soluciones, se midió la tasa o porcentaje de unión del PS a las membranas mímicas (MVL) Ecuación A 2.

$$\text{Tasa de unión} = \frac{[\text{PS}]_{\text{unido}}}{[\text{PS}]_{\text{total}}}$$

Ecuación A 2

Donde $[\text{PS}]_{\text{total}} = [\text{PS}]_{\text{unido}} + [\text{PS}]_{\text{libre}}$, siendo $[\text{PS}]_{\text{unido}}$ aquella concentración de fotosensibilizador unida a las vesículas y $[\text{PS}]_{\text{libre}}$, aquel que no se unió a las mismas (Esquema A 2).



Esquema A 2. Simulación de la reacción de unión del PS a MVL.

8.3.6.2. Estudio del efecto fotodinámico en membranas mímicas

Una suspensión de liposomas se preparó utilizando 30 mg/mL de DOPC y 3 mg/mL de POPG, se disolvió en cloroformo y se eliminó el solvente con una corriente bajo flujo de argón. Una vez formado el film de liposomas, se lo hidrató con 0,5 mL de una solución 50 mM de carboxifluoresceína (CF) en Buffer Tris 10 mM/NaCl 300 mM (pH = 8). Mediante el proceso de extrusión, se hizo eluir la solución de liposomas con CF utilizando una membrana de 1 μM (PC MB 19 nm / QTY:100 Nuclear Track-Etch membrane).

Por otro lado, se preparó una columna cromatográfica utilizando como fase estacionaria Sephadex G-50 y como fase móvil Buffer Tris 10 mM/NaCl 300 mM. Por dicha columna, se hizo eluir la solución anteriormente preparada con el objetivo de obtener sólo liposomas con CF incorporada en la membrana. La fracción de liposomas con CF se identificó visualmente y se colectó.

Posteriormente, en una microplaca de 96 pocillos se colocó 15 μL de liposomas con CF, 285 μL de Buffer y PS en diferentes concentraciones (1 μM y 10 μM). Se realizaron estudios control con liposomas con CF, Buffer sin PS y con liposomas con CF, Buffer y DMF. La microplaca con las soluciones se irradió en diferentes intervalos de tiempo ($\lambda_{\text{irr}} = 660 \text{ nm}$). La fluorescencia se midió a 517 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$) en un lector de microplacas. Una vez finalizado el experimento, se agregó Triton X-100 a todos los pocillos y se midió la fluorescencia nuevamente. El protocolo utilizado se encuentra informado en bibliografía [165].

A partir de los datos obtenidos se calculó el porcentaje de liberación de carboxifluoresceína (%CF):

$$\%CF = \frac{I - I_0}{I_T - I_0} \times 100$$

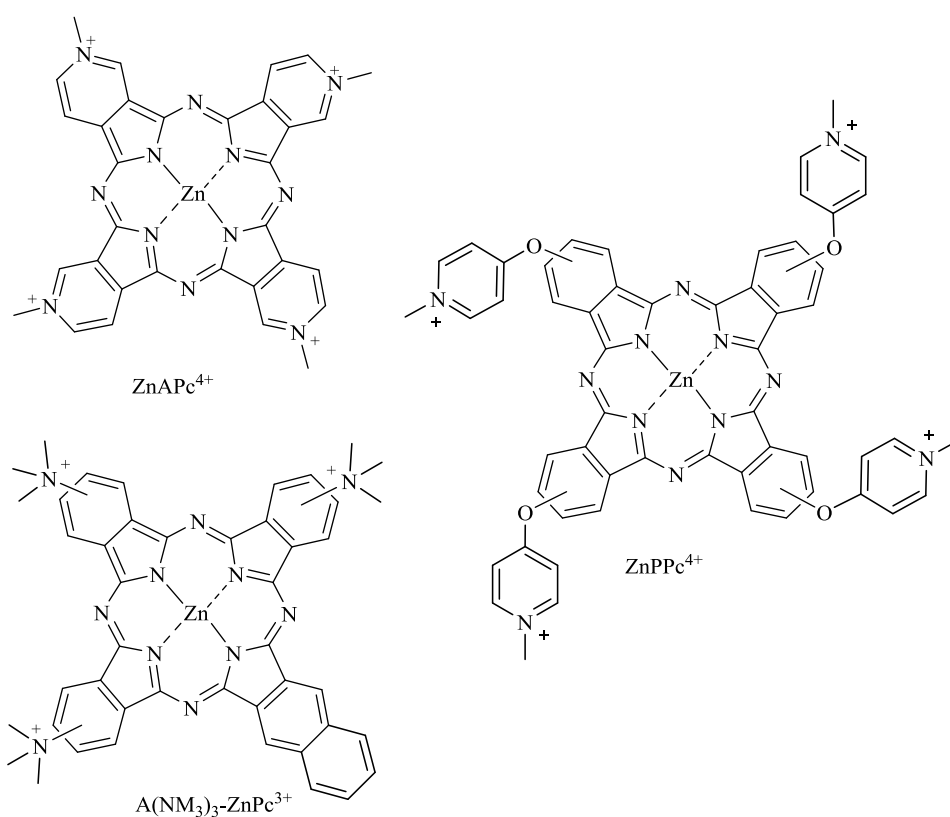
Ecuación A 3

Donde I es la intensidad de fluorescencia de cada medición, I_0 la intensidad inicial y I_T la intensidad de los liposomas totalmente lisados posterior al tratamiento.

8.4. Resultados y discusiones

8.4.1. Fotosensibilizadores

Los fotosensibilizadores utilizados, derivados de ftalocianinas, presentan características propicias para su utilización en PDT. Las moléculas ZnAPc^{4+} y ZnPPc^{4+} se obtuvieron siguiendo las metodologías reportadas en bibliografía [77,124]. La molécula $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ se sintetizó en el presente trabajo de tesis (Sección 3.3.1.8.). El Esquema A 3 presenta las estructuras de los PSs.



Esquema A 3. Estructura de los derivados de Pcs: ZnAPc^{4+} , ZnPPc^{4+} y $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$.

Las moléculas presentan características espectroscópicas interesantes, una absorción aguda de las bandas Q en la región de la ventana fototerapéutica y una banda Soret alrededor de los 340 nm [32,73,124]. Además una característica que tienen los compuestos de la familia de las ftalocianinas, es la generación de fluorescencia lo cual permite la cuantificación y localización del PS en medios biológicos. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) de las moléculas ZnAPc^{4+} , ZnPPc^{4+} y $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$, son 0,30 (piridina), 0,22 (DMF) y 0,14 (DMF), respectivamente [77,124].

Las tres moléculas poseen cargas positivas, siendo dos de ellas tetra-catiónicas (ZnAPc^{4+} y ZnPPc^{4+}) y una tri-catiónica ($\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$). Esta característica favorece la unión o incorporación del PS en las membranas biológicas, lo cual aumenta el potencial efecto de PDT. Además estas moléculas presentan rendimientos cuánticos de generación de oxígeno singlete (Φ_Δ) propicios para su aplicación en terapia fotodinámica, debido a que la especie oxígeno singlete ($\text{O}_2(^1\Delta_g)$), en conjunto con las demás ROS, es la causante de los daños en las células. Presentan valores de Φ_Δ de 0,50, 0,59 y 0,48 para ZnAPc^{4+} , ZnPPc^{4+} y $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$, respectivamente en DMF [77,124].

Debido a las características interesantes presentadas por las tres moléculas fotosensibilizadoras, se las seleccionó para realizar estudios de PDT en células HeLa, utilizándose además células HaCaT.

8.4.2. Estudios en medios biológicos

8.4.2.1. Estudios en líneas celulares

8.4.2.1.1. Estudios de unión celular

Los estudios de unión de ZnAPc^{4+} , ZnPPc^{4+} y $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ a células HeLa y HaCaT ($1,4 \times 10^6$ células/ policubeta) utilizando $5 \mu\text{M}$ de las mismas. Los estudios se desarrollaron utilizando diferentes tiempos de incubación (1 h, 2 h, 3 h y 4 h), posteriormente se eliminó a aquellos PSs no incorporados a las células. Las células se lisaron con SDS 2%. La cuantificación se llevó a cabo por medidas espectroscópicas de fluorescencia $\lambda_{\text{exc}} = 610 \text{ nm}$ y la intensidad de fluorescencia evaluada en el rango de 650 nm a 750 nm. A partir de la Ecuación A 1 se determinó la tasa de unión/incorporación de los PS a células HeLa y HaCaT.

En los experimentos de unión a células HaCaT la tasa de unión/incorporación mostrada por los tres PSs resultó similar. Valores máximos de 0,39, 0,46 y 0,48 se encontraron para $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$, ZnAPc^{4+} y ZnPPc^{4+} , respectivamente (Figura A 1 (A)). Sin embargo, no existió correspondencia entre el porcentaje de unión y el tiempo de incubación de las moléculas. Se observó que a partir de 1 h de incubación, a medida que el tiempo de incubación de las moléculas aumentaba, la unión de éstas a las células HaCaT disminuía (Figura A 1 (A)).

En la Figura A 1 (B) se pueden observar los resultados hallados para los estudios de unión de los PS a células HeLa, en donde la tasa máxima de unión de las moléculas $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ y ZnPPc^{4+} fue de $\sim 0,46$ y de $0,41$ para ZnAPc^{4+} . Además, no existió ningún tipo de

correlación entre el valor de la tasa de unión/incorporación, el tiempo de incubación de los PSs y las estructuras moleculares de los mismos.

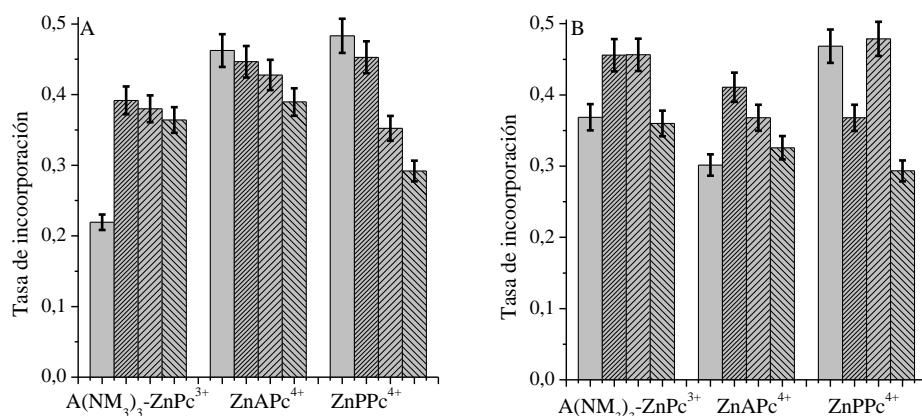


Figura A 1. Tasa de incorporación de los fotosensibilizadores ZnAPc⁴⁺, ZnPPc⁴⁺ y A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ (5 μM) a células HaCaT (A) y HeLa (B) (1,4 x 10⁶ células/microplaca) a diferentes tiempos de incubación: 1 h, 2 h, 3 h y 4 h.

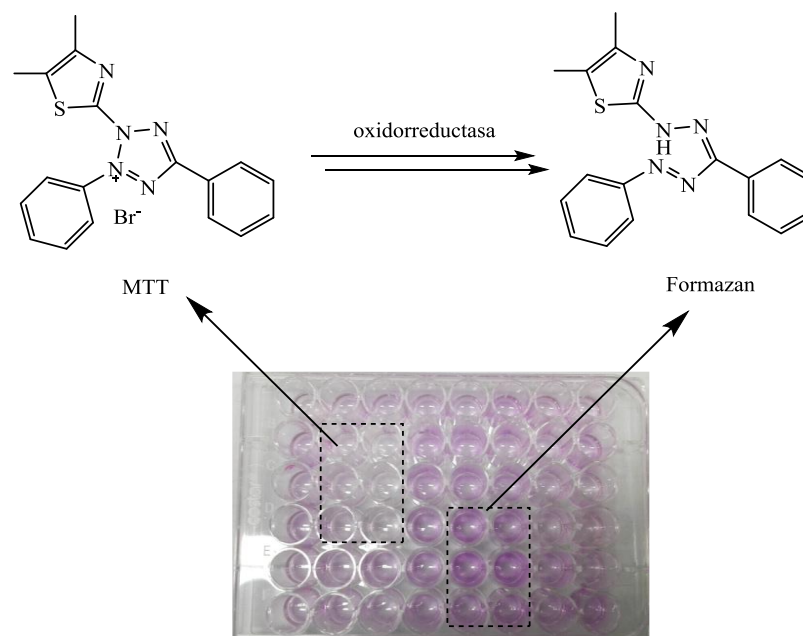
Además, estos resultados indican que no existe correlación de la tasa de incorporación de los PSs con el tiempo de incubación de los mismos con las células (HeLa y HaCaT). Esto podría deberse a que las líneas celulares se encuentran en constante crecimiento o transformación y al transcurrir el tiempo hace que la unión de las moléculas a las membranas o componentes celulares varíe considerablemente.

8.4.2.1.2. Estudios de fototoxicidad de ftalocianinas en células HeLa y HaCaT

Durante los primeros ensayos de citotoxicidad de los PSs (ZnAPc⁴⁺, ZnPPc⁴⁺ y A(NM₃)₃-ZnPc³⁺) frente a células HaCaT y HeLa (1,4 x 10⁶ células/microplaca) se trabajó a diferentes concentraciones, tiempos de incubación y dosis de luz. Estos estudios permitieron seleccionar condiciones óptimas de trabajo. Es por ello que se seleccionó una concentración de PS de 1 μM, 1 h de incubación e irradiando con una dosis de 10 J/cm² para células HaCaT y 2 J/cm² para células HeLa (λ_{irr} = 660 nm). Experimentos control mostraron que las ftalocianinas no presentan citotoxicidad en oscuridad.

La fototoxicidad de las ftalocianinas ZnAPc⁴⁺, ZnPPc⁴⁺ y A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ en células HaCaT y HeLa se evaluó 24 h posterior al tratamiento, utilizando el ensayo de viabilidad celular MTT (50 mg/mL) [9]. Dicho ensayo es del tipo colorimétrico y su objetivo es evaluar la actividad metabólica celular. Las enzimas oxido-reductasas celulares reflejan la actividad de las células viables presentes y además son capaces de reducir el colorante MTT a un

compuesto insoluble de color violeta (*E,Z*)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-1,3-difenildormazan (Formazan) Esquema A 4 [166].



Esquema A 4. Reacción del MTT con oxido-reductasas celulares.

Los estudios se realizaron primeramente con los PSs disueltos en PBS (resultados no mostrados), debido a la importante agregación que en dicho medio presentaban, se trabajó con las moléculas incorporadas en liposomas de lecitina de soja. Las moléculas que no se encuentran en estado monomérico presentan eficiencias menores con bajos rendimientos de generación de ROS, mostrando de esta manera baja eficiencia del tratamiento de PDT, motivo por el cual se utilizaron los PSs incorporados a liposomas. Además, la lecitina de soja se utilizó para aumentar la disponibilidad de los fotosensibilizadores en los sistemas celulares.

La Figura A 2 permite visualizar los resultados de los estudios de fototoxicidad de las ftalocianinas ZnAPc^{4+} , ZnPPc^{4+} y $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ en células HaCaT y HeLa. $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ mostró una disminución del 62% en la viabilidad celular similar a la molécula ZnPPc^{4+} (59%), mientras que ZnAPc^{4+} mostró una disminución del 37%, en las células HaCaT (Figura A 2 A).

La supervivencia de las células HeLa se estudió irradiando con una dosis de 2 J/cm^2 . Las moléculas $\text{A}(\text{NM}_3)_3\text{-ZnPc}^{3+}$ y ZnAPc^{4+} mostraron $\sim 50\%$ de fototoxicidad, sin embargo, ZnPPc^{4+} mostró una disminución del 27% de las células HeLa (Figura A 2 B).

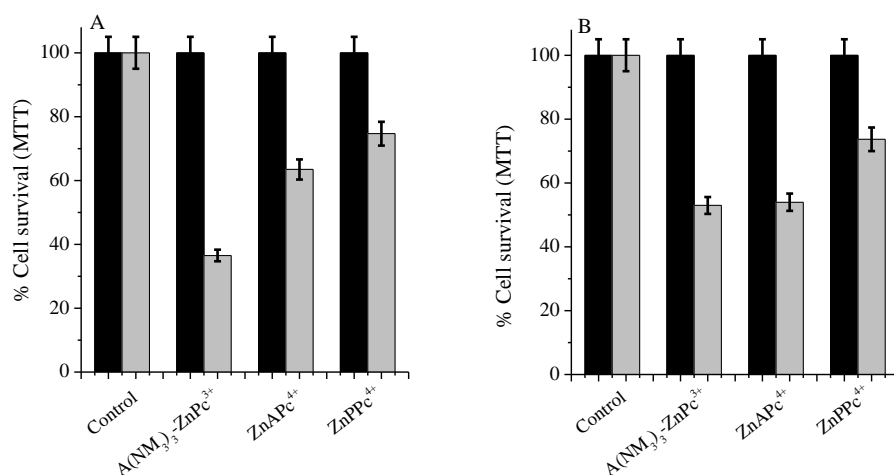


Figura A 2. PDT de células HaCaT (A) y HeLa (B) sensibilizados con 1 μM de PS e irradiados. Control celular en oscuridad (negro), células tratadas (gris).

8.4.3. Estudios en membranas mímicas

8.4.3.1. Estudio de unión de los PSs a MLV

Las MVL son utilizadas como modelo simplificado de membranas biológicas. En estos sistemas el $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, generado por los PS, reacciona con los dobles enlaces de los fosfolípidos de membrana, formando hidroperóxidos que se acumulan y provocan daños en las mismas [167].

Con el fin de imitar la composición lipídica de la membrana mitocondrial interna, se prepararon MLV (DPPC/POPG 9:1) en solución de cloroformo y se secaron en flujo de argón para formar el film. Posteriormente se colocó Buffer y se centrifugó en reiteradas ocasiones con el objetivo de obtener sólo MVL. Por último, se hidrataron las MVL con los PS (5 μM) en Buffer por diferentes tiempos. Se centrifugó y se separó el pellet del sobrenadante; a cada uno se le colocó SDS 2% y se midió la absorbancia de los PSs para luego calcular la Tasa de incorporación de los mismos a las MVL Figura A 3.

Los resultados mostraron una tasa de incorporación de $\sim 0,8$ para todos los PS utilizados (A(NM₃)₃-ZnPc³⁺, ZnAPc⁴⁺ y ZnPPc⁴⁺). Estos resultados mostraron diferencias importantes con los obtenidos en las células en donde la tasa de incorporación era inferior al 0,5 a causa de la diferencia estructural de las membranas que recubren tanto las células HeLa y HaCaT como las vesículas multilaminares.

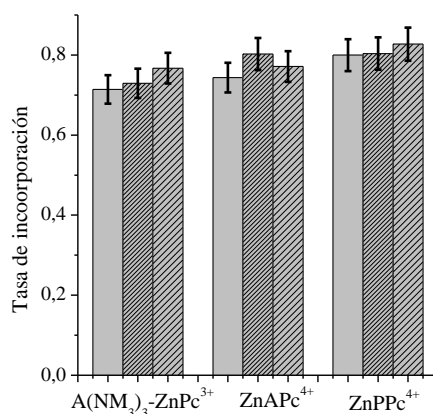





Figura A 3. Tasa de incorporación de los fotosensibilizadores ZnAPc⁴⁺, ZnPPc⁴⁺ y A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ (5 μM) a células MVL a diferentes tiempos de incubación:  30 min,  1 h y  2 h.

8.4.3.2. Estudio del efecto fotodinámico en membranas mímicas

La evaluación del efecto fotodinámico de los PSs (1 μM) en la membrana de los liposomas (DOPG/POPG 9:1) con CF incorporada, se llevó a cabo irradiando ($\lambda_{irr} = 660 \text{ nm}$) durante diferentes períodos de tiempo en presencia de ZnAPc⁴⁺, ZnPPc⁴⁺ y A(NM₃)₃-ZnPc³⁺. Los resultados mostraron que A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ promovió una liberación significativa de CF indicando así un daño importante a la membrana (Figura A 4). ZnAPc⁴⁺ produjo daño a la membrana liposomal con una cinética de liberación de CF más baja que el PS tri-catiónico. Sin embargo, ZnPPc⁴⁺ no originó alguna variación en la fluorescencia de CF durante la irradiación, similar al control sin PS. Después de la irradiación, se observó la fluorescencia completa del sistema (liposomas/CF) lisado mediante la adición de Triton X-100, lo que indica que el 100% de la CF. Una pequeña variación en la fluorescencia de CF se observó con ZnAPc⁴⁺ y ZnPPc⁴⁺ después de la ruptura, sin embargo A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ mostró resultados diferentes, lo que indicaría una posible interacción del PS con CF o bien, una descomposición del CF después de la irradiación.

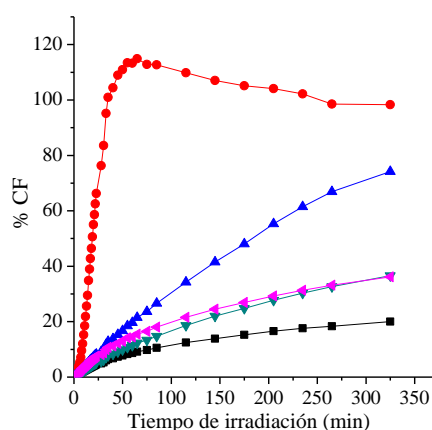


Figura A 4. Porcentaje de liberación de CF en LP de DOPC/POPG: LP (■), LP + A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ (●), LP + ZnAPc⁴⁺ (▲), LP + ZnPPc⁴⁺ (▼) y LP + DMF (◄).

8.5. Conclusiones

A partir de los estudios de PDT frente a la línea celular HaCaT se determinó que el PS más anfífilo (A(NM₃)₃-ZnPc³⁺) tuvo un efecto considerablemente mayor que los fotosensibilizadores simétricos (ZnAPc⁴⁺ y ZnPPc⁴⁺). Posiblemente esto se deba a la localización del A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ en las células. Sin embargo, en las células HeLa la variación en la anfifilicidad de los PS no mostró un efecto diferencial en la fototoxicidad.

Los estudios de unión de las ftalocianinas a MVL mostraron una incorporación similar para todos los PSs, sin verse afectados por la simetría o la anfifilicidad de las moléculas. Sin embargo, estos resultados fueron significativamente diferentes a los obtenidos en los estudios de unión de los PSs a las membranas celulares, debido a la diferencia estructural de las membranas que recubren tanto las células HeLa y HaCaT como las vesículas multilaminares.

En los estudios realizados en sistemas imitadores de membranas, liposomas de DOPC/POPG, se observó una ruptura mayor de la membrana en los liposomas ocasionada por A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ que por ZnAPc⁴⁺, mientras que ZnPPc⁴⁺ no mostró ningún efecto en el estudio de la liberación de CF en liposomas.

Estos resultados demostraron que A(NM₃)₃-ZnPc³⁺ presenta propiedades propicias para su aplicación en tratamientos de PDT.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- 1 Lovell, J. F., Liu, T. W. B., Chen, J., Zheng, G. (2010) Activatable photosensitizers for imaging and therapy. *Chem. Rev.* 110, 2839-2857.
- 2 Agostinis P., Berg K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Giorotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbvelik, M., Wilson, B. C., Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: An update. *A Cancer J. for clin.* 61,250-281.
- 3 Pavani C., Iamamoto, Y., Baptista, M. (2012) Mechanism and Efficiency of Cell Death of Type II Photosensitizers: Effect of Zinc Chelation. *Photochem. Photobiol.* 88, 774–781
- 4 Grossweiner, J.B. (2005) *The Science of Phototherapy: An Introduction*. Holanda. Ed. Springer Publishers.
- 5 Villanueva, A., Vidania, R., Stockert, J. C., Cañete, M., Juarrans, A. (2002) Photodynamic effects on cultured tumor cells. Cytoskeleton alterations and cell death mechanisms. Cap. 3. en *Handbook of Photochem. Photobiol.*. American Scientific Publishers.
- 6 Henderson, B.W., Dougherty, T. J. (1992) How does photodynamic therapy work? . *Photochem. Photobiol.* 55, 145-157.
- 7 Galluzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., Kroemer, G. (2017).Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat. Rev. Immun.*17, 97–111.
- 8 Agostinis, P., E. Buytaert, H. Breysens and N. Hendrickx (2004) Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 721–729.
- 9 Macdonald, I. J., Dougherty, T. J. (2001). Basic principles of photodynamic therapy. *J. Porphyrin Phthalocyanine.* 5, 105-129.
- 10 Krestyn, Y., Kolarova, E. H., Bajgar, R., Tomankova, K. (2010) Photodynamic properties of ZnTPPS4, ClAlPcS2 and ALA in human melanoma G361 cells. *Toxicol. Vitro.* 24, 286–291.
- 11 Bezdetnaya, L., Teiten, M. H., Marchal, S., D’Hallewin, M. A., Guillemin, F. (2003) Primary photodamage sites and mitochondrial events after Foscan photosensitization of MCF-7 human breast cancer cells. *Photochem. Photobiol.* 78, 9–14.
- 12 Reiners, J. J., Caruso, J. A., Mathieu, P., Chelladurai, B., Yin, X. M., Kessel, D.. (2002) Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves bid cleavage. *Cell Death Differ.* 9, 934–944.
- 13 Kessel, D., Reiners, J. J.. (2007) Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochem. Photobiol.* 83, 1024–1028.
- 14 Agostinis, P., Buytaert, E., Callewaert, G., Vandenheede, J. R. (2006) Deficiency in apoptotic effectors BAX and BAK reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum. *Autophagy.* 2, 238–240.
- 15 Hamblin, M. R., Jori, G. (2015) *Photodynamic inactivation of microbial pathogens: medical and environmental applications*. Cambridge. Ed. Roy. Soc. Chem publishing.
- 16 Akilov, O.E., O’Riordan, K., Kosaka, S., Hasan, T. (2006) Photodynamic therapy against intracellular pathogens: problems and potentials. *Medical Laser Application.* 21(4) 251-260.
- 17 Núñez, S. C., Ribeiro, M. S., Garcez, A. S. (2015) *Terapia fotodinâmica antimicrobiana na odontologia*. São Pablo, Brasil. Ed. Elsevier.
- 18 Dai, T., Huang, Y., Hamblin, M. R. (2009) Photodynamic therapy for localized infections—State of the art. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 6(3–4), 170-188.
- 19 Taylor, P.W., Stapleton, P. D., Luzio, J. P. (2002) New ways to treat bacterial infections. *Drug Discovery Today.* 7(21), 1086-1091.)
- 20 Hamblin, M. R., Hasan, T. (2004) Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 3, 436-450
- 21 M. Wainwright, K.B.C. (2004) Photosensitising agents-circumventing resistance and breaking down biofilms. *Rev. Int. Biodeter. Biodegrad.* 53, 119-126.

-
- 22 Huang, L., Zhiyentayev, T., Ying-Ying Huang, M. Yohei Sawayama, M. D., Ashlee Jahnke, B. S., George, B. S., Tegos, P., Wharton, T., Hamblin, M. R. (2010) Innovative cationic fullerenes as broad-spectrum light-activated antimicrobials. *Nanomed. Nanot., Biol. Med.* 6, 442-452.
 - 23 Lang, K., Wagnerová, D. M. (2004) Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coor. Chem. Rev.* 248(3-4), 321-350.
 - 24 Wainwright, M. (2009) Antimicrobial Application – Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy. En *Photosens. Biomed.* John Wiley & Sons, Ltd. 237-257.
 - 25 Hamblin, M. R., Jori, G. (2011) *Comprehensive series in photochemistry and photobiology. In photodynamic inactivation of microbial pathogens: medical and environmental applications.* En *Photodynamic inactivation of microbial pathogens: medical and environmental applications.* Cambridge. Ed. Roy. Soc. Chem publishing.
 - 26 Friedrich, C. L., Moyles, D., Beveridge, T. J., Hancock, R. E. W. (2000) Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on Gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chem.* 44, 2086-2092.
 - 27 Jori, G., Fbris, C., Soncin, M., Ferro, S., Coppellotti, O., Dei, D., Fantetti, L., Chiti, G., Roncucci, G. (2006) Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg. Med.* 38, 468-481.
 - 28 Gil D de M., M. (2000) Staphylococcus aureus: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Lab. Clín. Rev. Chil. Infect.* 17, 145-152.
 - 29 Teramoto, H., Salaheen, S., Biswas, D. (2016) Contamination of post-harvest poultry products with multidrug resistant Staphylococcus aureus in Maryland-Washington DC metro area. *Food Control.* 65, 132-135.
 - 30 Sarkar, A., Raji, A., Garaween, G., Soge, O., Rey-Ladino, J. W. Al-Kattan, A. Shibl, A. Senok. (2016) Antimicrobial resistance and virulence markers in methicillin sensitive Staphylococcus aureus isolates associated with nasal colonization. *Microb. Pathog.* 93, 8-12.
 - 31 Rodríguez, G. (2002) Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. *Salud pública Méx.* 44.
 - 32 Kadish, K.M., Smith, K. M., Guillard, R. (2003) *The Porphyrin Handbook: Phthalocyanines: properties and materials.* USA. Ed. Elseiver.
 - 33 Rex, J. H., Walsh, T. J., Sobel, J. D., Filler, S. G., Pappas, P. G., Dismukes, W. E., Edwards, J. E. (2000) Practice Guidelines for the Treatment of Candidiasis. *Clin. Infec. Dis.* 30(4), 662-678.
 - 34 Romani, L. (2011). Immunity to fungal infections. *Nature Reviews. Immunol.* 11, 275-288.
 - 35 Quindós, G. (2002) *La micosis en el amanecer del Siglo XXI.* En Bial, A. *Rev Iberoam. Micol.* Ed. Elseiver. 19, 1-4.
 - 36 Madigan, M. T., Dunlap, J. M., Clark, P. V., David P. (2009) Brock: Biología de los microorganismos. *Pearson Educación.*
 - 37 Cormick, M. P., Alvarez, M. G., Rovera, M., Durantini, E. N. (2009) Photodynamic inactivation of Candida albicans sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. *Eu. J. of Med. Chem.* 44(4), 1592-1599.
 - 38 Pereira Gonzalez, F. (2012) Photodynamic inactivation for controlling Candida albicans infections. *Fun. Biol.* 116, 1-10.
 - 39 Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2003) Brock: Biología de los microorganismos (10^a ed.). *Pearson-Prentice Hall.*
 - 40 Pardi, G., Perrone, M., Salazar, E. (2001) Detección de especies de Candida en pacientes con estomatitis sub-protésica. *Revista Latinoam. Ortod. Odon. Venez.* 39(3).

-
- 41 Calderone, R. A., Fonzi, W. A. (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microb.* 9(7), 327-335.
- 42 Linares Sicilia, M. J., Solís Cuesta, F., Casal Román, M. (2006) *Enfermedades infecciosas (IX) Clasificación de las infecciones fúngicas. Características microbiológicas de interés clínico. Estudio de resistencia. Infecciones fúngicas superficiales. Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado.* 9(57), 3683-3692.
- 43 Soysa, N. S., Ellepola, L., Arjuna, P. (2004) Cytotoxic drugs, radiotherapy and oral candidiasis. *Oral Onco.* 40(10),971-978.
- 44 Batoni, G., Maisetta, G., Esin, S. (2016) Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. *Biochi. Biophys. A.* 1858, 1044–1060
- 45 Costerton, J. W., Veeh, R., Shirliff, M., Pasmore, M., Post, C., Ehrlich, G. (2003) The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J. Clin Invest.* 112(10), 1466-1477.
- 46 Ohrt-Nissen, S., Fritz, B. G., Walbom, J., Kragh, K. N., Bjarsholt, T., Dahl, B., Manniche, C. (2018) Bacterial biofilms: a possible mechanism for chronic infection in patients with lumbar disc herniation – a prospective proof-of-concept study using fluorescence in situ hybridization. *J. Path. Microb. Imm.* 126, 440 – 447.
- 47 Donlan, R. M., Costerton, J. W. (2002) Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin. Micro. Rev.* 15 (2), 167–193.
- 48 Marshall, K. C. (1976) Interfaces in microbial ecology. *Harvard University Press, Cambridge, Mass.* 44–47.
- 49 Costerton, J. W., Geesey, G. G., Cheng, G. K. (1978) How bacteria stick. *Sci. Am.* 238, 86–95.
- 50 Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., Marrie, T. J. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 435–464.
- 51 Characklis, W. G., Marshall, K. C. (1990) Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. En W. G. Characklis and K. C. Marshall (ed.), *Biofilms*. John Wiley & Sons, New York, N.Y. 3 – 15.
- 52 Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., Costerton, J. W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microb.* 56, 187–209.
- 53 Jori, G., Brown, S. B. (2004) Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3 (5), 403-405.
- 54 Mateos, P. F. (2008) *Agentes antimicrobianos y microorganismos*. En XII Congreso Nacional y IX iberoamericano de etología. Valencia, España.
- 55 Fernandez, P., Martens, E. (2017) Antibiotics in late clinical development. *Biochem. Pharmac.* 133, 152–163.
- 56 Rodríguez Saucedo, E. N., Ximhai, R. (2011) Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Revista Científica de Sociedad, cultura y desarrollo sustentable.* 7, 153-170.
- 57 Maxson, T., Mitchell, D. A. (2016) Targeted treatment for bacterial infections: prospects for pathogen-specific antibiotics coupled with rapid diagnostics. *Tetrah.* 72, 3609-3624.
- 58 Wright, G. D. (2010) Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr. Opin. Microb.* 13, 589–59.
- 59 Sánchez de Rivas, C. (2006) ¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana...? *Revista Química Viva.* 2(5), 63-77.
- 60 Ló, S. M. S.; Barreira, S. M. W.; Gonçalves, A. G.; Tomé, J. P. C. (2015) Foto-antibióticos - a luz na fotoinativação de microorganismos. *Rev. Virtual Quim.* 7 (1), 390-402.
- 61 Theuretzbacher, U. (2013) Global antibacterial resistance: the never-ending story. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 1 (2), 63-69.
- 62 Bidart, T. (2004) Lo antiguo y lo nuevo en antifúngicos y antivirales. *Rev Chil. Infectol.* 22.

- 63 Lizasoain, M., Lumbreras, C. (2004) Aportación de los azoles de segunda generación en las infecciones por *Candida* spp. *Rev. Esp. Quimioterap.* 17, 105-108.
- 64 Sádaba, B., Azanza, R. (2004) Relación entre estructura y función en los azoles. *Rev. Esp. Quimioterap.* 17(1), 71-78.
- 65 Fica, A.C. (2004) Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. *Rev Chil Infect.* 21(1), 26-38.
- 66 Goldman, G. H., dos Reis Marques, E., Savoldi, M., Perlin, D., Park, S., Godoy Martinez, P. C., Goldman, M. H., Colombo, A. L. (2004) Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn. Mic. Infec. Dis.* 50, 25-32.
- 67 Brion, L. P., Goldman, D. L. (2007) Risk of resistance associated with fluconazole prophylaxis: Systematic. *Rev. J. Infec.* 54, 521-529.
- 68 Ribeiro, M., Rodrigues, C. (2007) Up-regulation of ERG11 gene among fluconazole-resistant *Candida albicans* generated in vitro: is there any clinical implication? *Diag. Microb. Infec. Dis.* 57(1), 71-75.
- 69 Di Palma, M. A., Alvarez, M. G., Durantini, E. N. (2015) Photodynamic action mechanism mediated by zinc(II) 2,9,16,23-tetrakis[4-(N-methylpyridyloxy)]phthalocyanine in *Candida albicans* Cells. *Photochem. Photobiol.* 91, 1203-1209.
- 70 Spesia, M. B., Rovera, M., Durantini, E. N. (2010) Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mitis* by cationic zinc(II) phthalocyanines in media with blood derivatives. *E. J. Med. Chem.* 45, 2198-2205.
- 71 Yslas, E. I., Milla, L. N., Omanini, S., Durantini, E. N., Bertuzzi M., Rivarola, V. A. (2010) Comparative photodynamic therapy study using two phthalocyanine derivatives. *Exp. Ther.Med.* 1: 713-718.
- 72 Ochoa, A. L., Tempesti, T. C., Spesia, M. B., Milanese, M. E., Durantini, E. N. (2012) Synthesis and photodynamic properties of adamantylethoxy Zn(II) phthalocyanine derivatives in different media and in human red blood cells. *Eur. J. Med. Chem.* 50, 280-287
- 73 Mckeown, N. B. (1998) *Phthalocyanine materials, Synthesis, structure and function. Chemistry of solid state materials.* Cambridge. Cambridge University Press.
- 74 Nyokong, T. (2007) Effects of substituents on the photochemical and photophysical properties of main group metal phthalocyanines. *Coordination Chemistry Reviews.* 251(13-14), 1707-1722.
- 75 Moser, J.G. (1998) *Photodynamic tumor therapy: 2nd and 3rd generation photosensitizers.* Amsterdam. Harwood Academic Publishers.
- 76 Martí, C., Nonell, S., Nicolau, M., Torres, T. (2000) Photophysical Properties of Neutral and Cationic Tetrapyrrolineporphyrins. *Photochem. Photobiol.* 71(1), 53-59.
- 77 Scalise, I., Durantini, E. N. (2005) Synthesis, properties, and photodynamic inactivation of *Escherichia coli* using a cationic and a noncharged Zn(II) pyridyloxyphthalocyanine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 13(8), 3037-3045.
- 78 Berg, K., Nordstrand, S., Selbo, P. K., Thi Tran, D. T., Angell-Petersen, E., Hogset, A. (2011) Disulfonated tetraphenyl chlorin (TPCS_{2a}) a novel photosensitizer developed for clinical utilization of photochemical internalization. *Photochem Photobiol. Sci.* 10, 1637-1651.
- 79 Kostka, M., Zimcik, P., Miletin, M., Klemra, P., Kopecky, K., Musil, Z. (2006) Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 178(1), 16-25.
- 80 Suchetti, C.A., Durantini, E. N. (2007) Monomerization and photodynamic activity of Zn(II) tetraalkyltetrapyrrolineporphyrinium derivatives in AOT reverse micelles. *Dyes Pig.* 74(3), 630-635.

-
- 81 Cormick, P., Rovera, M. M., Durantini, E. N. (2008) Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of a novel Zn(II) phthalocyanine substituted by fluconazole groups. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 194(2–3), 220-229.
- 82 Kobayashi, N., Kondo, R., Nakajima, S., Osa, T. (1990) New route to unsymmetrical phthalocyanine analogues by the use of structurally distorted subphthalocyanines. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 9640-9641.
- 83 Tempesti, T. C., Álvarez, M. G., Durantini, E. N. (2011) Synthesis and photodynamic properties of amphiphilic A3B-phthalocyanine derivatives bearing N-heterocycles as potential cationic phototherapeutic agents. *Dyes Pig.* 91,6-12.
- 84 Gsponer, N. S., Spesia, M. B., Durantini, E. N. (2015). Effects of divalent cations, EDTA and chitosan on the uptake and photoinactivation of Escherichia coli mediated by cationic and anionic porphyrins. *Photodiag. Photod. Ther.* 12, 67-75.
- 85 Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Soncin, M., Magaraggia, M., Ferro, S., Jori, G. (2004) Synthesis and antibacterial activity of new poly-s-lysine-porphyrin conjugates. *J. Med. Chem.* 47, 6649-6652.
- 86 Hamblin, M. R., O'Donnell, D. A., Murthy, N., Contag, C. H., Hasan, T. (2002) Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by in vivo bioluminescence imaging. *Photochem. Photob.* 75, 51-57.
- 87 Shrestha, A., Kishen, A. (2014) Photoactivated rose bengal functionalized chitosan nanoparticles produce antibacterial/biofilm activity and stabilize dentin-collagen. *Nanom.: Nanotec., Biol. Med.* 10, 491-501.
- 88 Ravi Kumar, M. N. (2000) A review of chitin and chitosan applications. *Reac. Funct. Pol.* 46, 1-27.
- 89 Kobayashi, N., Ishizaki, T., Ishii, K., Konami, H. (1999) Synthesis, spectroscopy, and molecular orbital calculations of subzaporphyrins, subphthalocyanines, subnaphthalocyanines, and compounds derived therefrom by ring expansion. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 9096-9110.
- 90 Xiong-Jie, J., Sin-Lui, Y., Pui-Chi, L., Wing-Ping, F., Dennis, K. P. (2011) Phthalocyanine-polyamine conjugates as highly efficient photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Med. Chem.* 54, 320-330.
- 91 Mora, S. J., Milanesio, M. E., Durantini, E. N. (2013) Spectroscopic and photodynamic properties of 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-N,N-dimethylaminopropoxy) phenyl] porphyrin and its tetracationic derivative in different media. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 270, 75-84.
- 92 Sol, V., Enache, M., Garcia, G., Granet, R., Guilloton, M., Blais, J. C., Krausz, P. (2006) Polyamine conjugates of meso-tritolylporphyrin and protoporphyrin IX: Potential agents for photodynamic therapy of cancers. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 1364-1377.
- 93 Alvarez, M.G., Gómez, M. L., Mora, S. J., Milanesio, M. E., Durantini, E. N. (2012) Photodynamic inactivation of Candida albicans using bridged polysilsesquioxane films doped with porphyrin. *Bioorg. Med. Chem.* 20(13), 4032-4039.
- 94 Funes, M.D., Caminos, D. A., Alvarez, M. G., Fungo, F., Otero, L. A., Durantini, E. N. (2009) Photodynamic Properties and Photoantimicrobial Action of Electrochemically Generated Porphyrin Polymeric Films. *Environm. Sci. Technol.* 43(3), 902-908.
- 95 Donnelly, R. F., McCarron, P. A., Lightowler, J. M., Woolfson, A. D. J. (2005) Bioadhesive patch-based delivery of 5-aminolevulinic acid to the nail for photodynamic therapy of onychomycosis. *Control Release.* 103, 381-392./.

- 96 Donnelly, R. F., McCarron, P. A., Tunney, M. M., Woolfson, A. D. (2007) Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 86, 59-69.
- 97 Ballatore, M. B., Durantini, J., Gsponer, N. S., Suarez, M. B., Gervaldo, M. A., Otero, L. A., Spesia, M. B., Milanesio, M. E., Durantini, E. N. (2015) Photodynamic inactivation of bacteria using novel electrogenerated porphyrin-fullerene C60 polymeric films. *Environ. Sci. Technol.* 49,7456–7463.
- 98 Bozoğlu, C., Arıcı, M., Uğur, A. L., Erdoğmuş, A., Koca, A. (2014) Electrochemical and spectroelectrochemical properties of methylendioxy-phenoxy-substituted novel lutetium (III) mono-and bis-phthalocyanines. *Synthetic Metals.* 190, 56-65.
- 99 Çakır, V., Kantekin, H., Bıyıklıoğlu, Z., Koca, A. (2014) New electropolymerizable metal-free, metallophthalocyanines and their electrochemical, spectroelectrochemical studies. *J. Organom. Chem.* 768, 28-35.
- 100 Demir, F., Bıyıklıoğlu, Z., Koca, A. (2014) Electrochromism of Electropolymerized Metallophthalocyanines. *J. Electrochem. Soc.* 161(3), G1-G6.
- 101 Kobayashi, N., Fukuda, T. (2009) Phthalocyanine, porphyrin, cyclodextrin, and polymer systems suitable for studying by circular dichroism, magnetic circular dichroism, and/or electrochemistry. *Bulletin of the Chem. Soc. Japan.* 82(6),631-663.
- 102 Akçay, H.T., Bayrak, R., Demirbaş, Ü., Koca, A., Kantekin, H., Değirmencioğlu, I. (2013) Synthesis, electrochemical and spectroelectrochemical properties of peripherally tetraimidazole substituted metal free and metallophthalocyanines. *Dyes Pig.* 96(2), 483-494.
- 103 Solis, C., Baigorria, E., Milanesio, M. E., Morales, G., Durantini, E.N., Otero, L., Gervaldo, M. (2016) Electrochemical polymerization of EDOT modified phthalocyanines and their applications as electrochromic materials with green coloration, and strong absorption in the Near-IR. *Electrochem. Acta.* 213, 594-605.
- 104 Amb, C.M., Dyer, A. L., Reynolds, J. R. (2010) Navigating the Color Palette of Solution-Processable Electrochromic Polymers. *Chem.of Materials.* 23(3), 397-415.
- 105 Yuen, A.P., Jovanovic, S. M., Hor, A. M., Klenkler, R. A., Devenyi, G. A., Loutfy, R. O., Preston, J. S. (2012) Photovoltaic properties of M-phthalocyanine/fullerene organic solar cells. *Solar Energy.* 86(6), 1683-1688.
- 106 Williams, G., Suttly, S., Klenkler, R., Aziz, H. (2014) Renewed interest in metal phthalocyanine donors for small molecule organic solar cells. *Solar Energy Mat. Solar Cells.* 124, 217-226.
- 107 Sastre, A., Díaz-García, M. A., Agulló -López, F., Dhenaut, C., Brasselet, S., Ledoux, I., Zyss, J. (1996) Subphthalocyanines: Novel Targets for Remarkable Second-Order Optical Nonlinearities. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 2746-2747.
- 108 Yslas, E.I., Rivarola, V., Durantini, E. N. (2005) Synthesis and photodynamic activity of zinc(II) phthalocyanine derivatives bearing methoxy and trifluoromethylbenzyloxy substituents in homogeneous and biological media. *Bioorg. Med. Chem.* 13(1), 39-46.
- 109 Cong, F. D., Ning, B., Du, X. G., Ma, C. Y., Yu, H. F., Chen, B. (2005) Facile synthesis, characterization and property comparisons of tetraaminometallophthalocyanines with and without intramolecular hydrogen bonds. *Dyes Pig.* 66, 149-154.
- 110 Oluwole, D. O., Prinsloo, E., Nyokong, T. (2017) Photophysical behavior and photodynamic therapy activity of conjugates of zinc monocarboxyphenoxy phthalocyanine with human serum albumin and chitosan. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spect.* 173, 292-300.
- 111 Yıldız, H.K., Korkut, S. E., Koca, A., Şener, M. K. (2011) 3,4-Ethylenedioxythiophene substituted phthalocyanines. *Synthetic Metals.* 161(17–18), 1946-1952.
- 112 Milanesio, M. E., Alvarez, M. G., Silber, J., Rivarola, V., Durantini, E. N. (2003) Photodynamic activity of monocationic and non-charged methoxyphenylporphyrin derivatives in homogeneous and biological media. *Photochem. Photob. Sci.* 2, 926-933.

- 113 Tempesti, T., Stockert, J., C., Durantini, E. N. (2008) Photosensitization ability of a water soluble zinc(II)tetramethyltetrapyrrolineporphyrinium salt in aqueous solution and biomimetic reverse micelles medium. *J. Phy. Chem. B.* 112, 15701-15707.
- 114 Ferreyra, D., D., Reynoso, E., Cordero, P., Spesia, M. B., Alvarez, M. G., Milanesio, M. E., Durantini, E.N. (2016) Synthesis and properties of 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-N,N-dimethylaminopropoxy)phenyl]chlorin as potential broad-spectrum antimicrobial photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 158, 243-251.
- 115 Durantini, E. N. (2006) Photodynamic inactivation of bacteria. *Curr. Bioact. Comp.* 2, 127-142.
- 116 Mamone, L., Ferreyra, D., Gándara, L., Di Venosa, G., Vallecorsa, P., Sáenz, D., Calvo, G., Batlle, A., Buzzola, F., Durantini, E. N., Casas, A. (2016) Photodynamic inactivation of planktonic and biofilm growing bacteria mediated by a meso-substituted porphyrin bearing four basic amino groups. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 161, 222-229.
- 117 Durantini, J., Morales, G. M., Santo, M., Funes, M., Durantini, E. N., Fungo, F., Dittrich, T., Otero, L., Gervaldó, M. (2012) Synthesis and characterization of porphyrin electrochromic and photovoltaic electropolymers. *Organic Electronics.* 13, 604-614.
- 118 Nombona, N., Antunes, E., Chidawanyika, W., Kleyi, P., Tshentu, Z., Nyokong, T. (2012) Synthesis, photophysics and photochemistry of phthalocyanine- ϵ -polylysine conjugates in the presence of metal nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. *J. Photochem. Photob. A: Chem.* 233 (0), 24-33.
- 119 Demidova, T. N., Hamblin, M. R. (2004) Photodynamic Therapy Targeted to Pathogens. *Int. J. of Immunop. Pharm.* 17(3), 245-254.
- 120 Mantareva, V., Kussovski, V., Angelov, I., Borisova, E., Avramov, L., Schnurpfeil, G., Wöhrle, D. (2007) Photodynamic activity of water-soluble phthalocyanine zinc(II) complexes against pathogenic microorganisms. *Bio. & Med. Chem.* 15(14), 4829-4835.
- 121 Segalla, A., Borsarelli, C. D., Braslavsky, S. E., Spikes, J. D., Roncucci, G., Dei, D., Chiti, G., Jori, G., Reddi, E. (2002) Photophysical, photochemical and antibacterial photosensitizing properties of a novel octacationic Zn(ii)-phthalocyanine. *Photochem. Photob. Sci.* 1(9), 641-648.
- 122 De la Torre, G., Vázquez, P., Argulló-López, F., Torres, T. (2004) Role of Structural Factors in the Nonlinear Optical Properties of Phthalocyanines and Related Compounds. *Chem. Rev.* 104(9), 3723-3750.
- 123 Milanesio, M. E., Alvarez, M. G., Yslas, E. I., Borsarelli, C. D., Silber, J., Rivarola, V., Durantini, E. N. (2001) Photodynamic Studies of Metallo 5,10,15,20-Tetrakis(4-methoxyphenyl) porphyrin: Photochemical Characterization and Biological Consequences in a Human Carcinoma Cell Line. *Photochem. Photob.* 74(1), 14-21.
- 124 Dupouy, E.A., Lazzeri, D., Durantini, E.N. (2004) Photodynamic activity of cationic and non-charged Zn(II) tetrapyrrolineporphyrine derivatives: biological consequences in human erythrocytes and *Escherichia coli*. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 992-998.
- 125 Ferreyra, D. D., Spesia, M. B., Milanesio, M. E., Durantini, E.N. (2014) Synthesis and photodynamic properties of 5,10,15,20-tetrakis[3-(N-ethyl-N-methylcarbazoyl)]chlorin and its analogous porphyrin in solution and in human red blood cells. *J. Photochem. Photob. A: Chem.* 282, 16-24.
- 126 Milanesio, M. E., Spesia, M. B., Cormick, M. P., Durantini, E. N. (2013) Mechanistic studies on the photodynamic effect induced by a dicationic fullerene C60 derivative on *Escherichia coli* and *Candida albicans* cells. *Photodiag. Photodyn. Ther.* 10(3), 320-327.
- 127 Milanesio, M. E., Alvarez, M. G., Rivarola, V., Silber, J., Durantini, E. N. (2005) Porphyrin-fullerene C60 Dyads with High Ability to Form Photoinduced Charge-separated State as Novel Sensitizers for Photodynamic Therapy. *J. Photochem. Photob.* 84(4), 891-897.

- 128 La Penna, M., Alvarez, M. G., Yslas, E. I., Rivarola, V., Durantini, E. N. (2001) Characterization of photodynamic effects of meso-tetrakis-(4-methoxyphenyl) porphyrin: biological consequences in a human carcinoma cell line. *Dyes Pig.* 49, 75-82.
- 129 Schweitzer, C., Schmidt, R. (2003) Physical Mechanism of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. *Chem. Rev.* 103(5), 1685-1758.
- 130 Ergaieg, K., Chevanne, M., Cillard, J., Seux, R. (2008) Involvement of both Type I and Type II mechanisms in Gram(+) and Gram(-) bacteria photosensitization by a meso-substituted cationic porphyrin. *Sol. Energ.* 82, 1107-1117.
- 131 Ochsner, M. J. (1997) Photophysical and photobiological processes in photodynamic therapy of tumours. *Photochem. Photobiol. B: Biol.* 39, 1-18.
- 132 Maisch, T., Bosl, C., Szeimies, R. M., Lehn, N., Abels, C. (2005) Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1542-1552.
- 133 Ochoa, A. L., Tempesti, T., Spesia, M. B., Milanesio, M. E., Durantini, E. N. (2010) Synthesis and photodynamic properties of adamantylethoxy Zn(II) phthalocyanine derivatives in different media and in human red blood cells. *Eur. J. Med. Chem.* 50(0), 280-287.
- 134 Lambrechts, S. A. G., Aalders, M. C. G., Van Marle, J. (2005) Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antim. Ag. Chemother.* 49, 2026-2034.
- 135 Di Palma, M. A., Alvarez, M. G., Durantini, E. N. (2013) Optimization of cellular uptake of zinc(II) 2,9,16,23-tetrakis[4-(N-methylpyridyloxy)]phthalocyanine for maximal photoinactivation of *Candida albicans*. *Fun. Biol.* 117(11-12), 744-751.
- 136 Quiroga, E. D., Alvarez, M.G., Durantini, E. N. (2010) Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic action of 5,10,15,20-tetra(4-N-methylpyridyl)porphyrin in different media. *FEMS Imm. & Med. Microb.* 60(2), 123-131.
- 137 Cormick, M. P., Alvarez, M. G., Rovera, M., Durantini, E. N. (2009) Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. *Eu. J. of Med. Chem.* 44(4), 1592-1599.
- 138 do Rosario Palma, A. L., Ramos, L. P., Domingues, N., Nuernberg Back-Brito, G., Dias de Oliveira, L., Pereira, C. A., Olavo, A., Cardoso, J. (2018) Biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus sanguinis* and their Susceptibility to Antimicrobial Effects of Photodynamic inactivation. *Photodiag. Photody. Ther.* Accepted Manuscript. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.07.003>
- 139 Costa, A. C., Pereira, C. A., Freire, F., Junqueira, J. C., Jorge, A.O. (2013) Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed in vitro. *Mycoses.* 56(6):614-622.
- 140 Nobile, C. J., Mitchell, A. P. (2006) Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microb.* 8(9):1382-1391.
- 141 Smith, B. C. (1998) Infrared Spectra Interpretation: A Systematic Approach, *CRC Press, New York*.
- 142 Ballatore, M. B., Spesia, M. B., Milanesio, M. E., Durantini, E. D. (2018) Mechanistic insight into the photodynamic effect mediated by porphyrin-fullerene C60 dyads in solution and in *Staphylococcus aureus* cells. *Roy. Socie. Chem.* 8, 22876 - 22886
- 143 Martin, D. C., Povlich, L. K., Feldman, K. E. (2010) Conjugated Polymers for the Engineering of Device/Tissue Interface. *Mater. Matters. Sigma Aldrich.* 1-5.
- 144 Milanesio, M. E., Alvarez, M. G., Bertolotti, S. G., Durantini, E. N. (2008) Photophysical characterization and photodynamic activity of metallo 5-(4-(trimethylammonium)phenyl)-10,15,20-tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)porphyrin in homogeneous and biomimetic media. *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 963-972.

-
- 145 Redmond, R. W., Gamlin, J. N. (1999) A Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules. *Photochem. Photobiol.* 70(4), 391-475.
- 146 Ballatore, M. B., Spesia, M. B., Milanesio, M. E., Durantini, E. N. (2014) Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of porphyrinefullerene C60 yads with application in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus*. *E. J. Med. Chem.* 83, 685-694.
- 147 Groenendaal, L., Zotti, G., Aubert, P. H., Waybright, S. M., Reynolds, J. R. (2003) Electrochemistry of Poly (3, 4-alkylenedioxythiophene) Derivatives. *Adv. Mat.* 15(11), 855-879.
- 148 Chen, X., Xing, K. Z., Inganäs, O. (1996) Electrochemically induced volume changes in poly (3, 4-ethylenedioxythiophene). *Chem. Mat.* 8(10), 2439-2443.
- 149 Randriamahazaka, H., Noel, V., Chevrot, C. (1999) Nucleation and growth of poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) in acetonitrile on platinum under potentiostatic conditions. *J. Electroan. Chem.* 472(2), 103-111.
- 150 Cid, J. J., García-Iglesias, M. Yum, J. H., Forneli, A., Albero, J., Martínez-Ferrero, E., Vázquez, P., Grätzel, M., Nazeeruddin, M. K., Palomares, E. (2009) Structure-Function Relationships in Unsymmetrical Zinc Phthalocyanines for Dye-Sensitized Solar Cells. *Chem.-A Eur. J.* 15(20), 5130-5137.
- 151 Agazzi, M. L., Ballatore, M. B., Reynoso, E., Quiroga, E. D., Durantini, E. N. (2017) Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of two cationic BODIPY derivatives with application in the photoinactivation of microorganisms. *Eur. J. Medic. Chem.* 126, 110-121.
- 152 Gardner, J. M., Abrahamsson, M., Farnum, B. H, Meyer, G. J. (2009) Visible Light generation of Iodine Atoms and I-I Bonds: Sensitized I- Oxidation and I₃⁻ Photodissociation. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 16206-16214.
- 153 Vecchio, D., Gupta, A., Huang, L., Landi, G., Avci, P., Rodas, A., Hamblin, M. R. (2015) Bacterial photodynamic inactivation mediated by methylene blue and red light is enhanced by synergistic effect of potassium iodide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(9), 5203-5212.
- 154 Reynoso, E., Quiroga, E. D., Agazzi, M. L., Ballatore, M. B., Bertolotti, S. G., Durantini, E. N. (2017) Photodynamic inactivation of microorganisms sensitized by cationic BODIPY derivatives potentiated by potassium iodide. *Photochem. Photobiol. Sci.* 16, 1524-1536.
- 155 Wen, X., Zhang, X., Szewczyk, G., El-Hussein, A., Huang, Y. Y., Sarna, T., Hamblin, M. R. (2017) Potassium iodide potentiates antimicrobial photodynamic inactivation mediated by Rose Bengal: in vitro and in vivo studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61(7), 467-517.
- 156 Huang, L., Szewczyk, G., Sarna, T., Hamblin, M. R. (2017) Potassium iodide potentiates broad-spectrum antimicrobial photodynamic inactivation using photofrin. *ACS Infect. Dis.* 3(4), 320-328.
- 157 Ogilby, P. R. (2010) Singlet Oxygen: There is Indeed Something New Under the Sun. *Chem. Soc. Rev.* 39, 3181 -3209
- 158 Allison, R.R., Sibata, C.H. (2010) Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiag. Photodyn. Ther.* 7, 61-75.
- 159 Santos, P. A., Rocha, C. S., Baptista, M. S. (2014) Adhesión and proliferation of HeLa and fibroblast cells on chemical-modified gold surfaces. *Col. Surf. B: Biointerfaces.* 123, 429-438
- 160 Park, K., Lee, J. H. (2007) Photosensitizer effect of curcumin on UVB-irradiated HaCaT cells through activation of caspase pathways. *Oncology reports.* 17, 537-540.
- 161 Xia, Y., Huang, Y. , Lin, L., Liu, X., Jiang, S., Xiong, L.. (2009) A comparative study on the enhancement efficacy of specific and non-specific Iron chelators for Protoporphyrin IX production and photosensitization in HaCaT cells. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol.* 29(6), 765-770.

-
- 162 Salis, G. V. V., García Praça, F. S., Araújo, M. M., Eloy, J. O., García Medina, W. S. (2017) Lipid-based nanocarriers improved ZnPcSO₄ cellular uptake in human keratinocytes for use in topical photodynamic therapy. *Indian J. Medic. Res. Pharmac. Sci.* 4 (5), 23-32.
- 163 de Freitas, L. M., Bortolozzo, R. S., de Sousa, J. F., Moreira, T. F., Tavares dos Santos, C., Martins Baviera, A., Valente, V., Pienna Soares, C. Fontana, C. R. (2017) Photodynamic therapy combined to cisplatin potentiates cell death responses of cervical cancer cells *BMC Cancer.* 17(1), 123-135.
- 164 Engelmann, F. M., Mayer, I., Gabrielli, D. S., Toma, H. E., Kowaltowski, A. J., Araki, K., Baptista, M. S. (2007) Interaction of cationic meso porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes. *J. Bioen. Biom.* 39,175–185.
- 165 Bacellar, I. O. L., Pavani, C., Sales, E. M., Itri, R., Wainwright, M., Baptista, M. S. (2014) Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers. *Photochem. Photob.* 90, 801-813.
- 166 Tsubone, T. M., Martins, W. K., Pavani, C., Junqueira, H. C., Itri, R., Baptista, M. S. (2017) Enhanced efficiency of cell death by lysosome-specific photodamage. *Scien. Rep.* 7, 6788-6807.
- 167 Itri, R., Junqueira, H. C., Mertins, O., Baptista, M. S. (2014) Membrane changes under oxidative stress: the impact of oxidized lipids. *Biophys. Rev.* 6, 47-61.