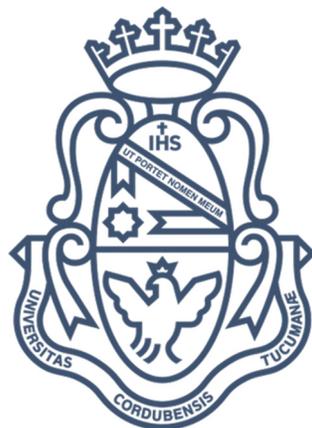


TESIS DOCTORAL

# DESARROLLO DE NUEVOS FOTOSENSIBILIZADORES PARA TERAPIA FOTODINÁMICA ANTIBACTERIANA



***Lic. en Bioquímica Clínica María Jazmín Silvero***

**2016**

Instituto Nacional de Fisiología / Instituto de Biología Vegetal - CONICET

Departamento de Fisiología / Departamento de Farmacia

Facultad de Ciencias Químicas – Universidad Nacional de Córdoba

Córdoba - Argentina

*Dr. Gerardo Aníbal Argüello (Director)*

*Dra. María Cecilia Becerra (Co-Directora)*

## **Miembros de la Comisión**

*Dra. Beatriz Margarita Toselli*

*Dr. Juan Elías Argüello*

## **Evaluador Externo**

*Dr. Claudio Darío Borsarelli*



Si este impulsivo y obsesivo conjunto de moléculas (tesista) alcanzó esta meta, fue gracias a otras que las ordenaron y orientaron desinteresadamente.

Dedico esta tesis especialmente a quienes mantuvieron mi estructura celular en días buenos y malos, sabiendo disminuir mi entropía interna y externa.

A mi mamá y mi papá, ADN de origen.

A mis hermanos adorados, Vero y Gusti, membranas contenedoras.

A mi Fede, mi fuente de energía, mi amada mitocondria. Indispensable e irremplazable organela. A vos te debo no haber abandonado mi sueño.

Adorada familia, ustedes son lo que me sostiene entera en momentos que pienso que me voy a desarmar, los amo incondicionalmente.

También agradezco profundamente todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a que no deje de perseguir mi meta.

A Cami, Guada, Celeste, Ana Paula, Inesita y Clarita, el orgullo y amor maternal que despiertan en mí, me inspira a trabajar en la construcción de un mundo mejor.

A mis abuelos, por los valores que me dejaron. Especialmente a mi Abu Alicia, por sus palabras de aliento, torta casera de por medio.

A mi tía Yola y mi tía Alicita, por cuidarme como una hija.

A mis amigos y compañeros. Quienes me han enseñado cosas que no se encuentran en los papers. A Antonella, por su luz y su dulzura, que siempre reorientan mis vibraciones a la frecuencia correcta. A Solchu, mi brazo derecho en la mesada y fuera de ella, por nunca juzgarme y enseñarme a relajarme. A Meli, por mostrarme con tu ejemplo que ninguna herida es incurable, que ninguna ausencia es insuperable. A Sofi, el recuerdo de tu mirada llena de futuro, me impulsa a disfrutar cada segundo como si fuera el último. A Micky, por las horas de psicoanálisis gratuito y las clases de maquillaje. A Consti, por ser mis ojos en tantas clases y seguir acompañandome en cada etapa. A Ailu, por hacerme desempolvar mis zapatillas de punta y devolverme el placer de bailar. A Bren, por probarme que no todas las personas con rastas son iguales, y por

acompañarme (llueva o truene) a entrenar. A Naty, por los consejos académicos y no tan académicos. To Geniece, Anabel, Stefania, Carlos, María, Natalia, Kevin, Alex, Has, Phil, Emilio, Maddy, and especially to Chiara and Philippe, for make me feel like home's not so far away. Diana, Diana, Diana, Cynthia y Eli, por demostrar que la amistad no conoce de fronteras. A Virgi, Ani, Pauli, Diame y Vivi, por su aguante diario. A Daian, por sus consejos de un "tesísticos". A Walter, por transmitirme su entusiasmo por los anillos. A Fabio y Juli, mis compañeros de Articulación, por recordarme cómo disfrutar de la química como cuando era niña. A Danielita, Pau, Gaby, Esteban, Seba, Sandru, por miles de risas y lágrimas compartidas durante más de 20 años.

Mi eterno agradecimiento a mis tutores, de los cuales aprendí más que química. Querida Doc (Dra. Cecilia Becerra), por su incondicional apoyo y dedicación a mi formación, y la posibilidad que me brinda para seguir creciendo. A Ud, Doc, le debo mucho más de lo que puedo decir en este espacio, espero que el tiempo me permita retribuirle aunque sea una parte de lo que Ud hizo por mí. A Tito, por ser el primero que confió en mi trabajo, por ser un modelo de pasión y compromiso hacia la ciencia. Por el financiamiento económico que él y su grupo de investigación me brindaron para los viajes a Ottawa y cuanto experimento quise hacer... y también por las charlas sin desperdicio y llenas de anécdotas junto a una copita de coñac. A la Bioquímica Ruth Grinfeld (mi tutora durante las prácticas bioquímicas), por marcarme los primeros pasos de este largo camino frente al microscopio. A la admirada Dra. Inés Albesa (Doctoris), por recibirme en su grupo de investigación incondicionalmente. Al Dr. G.A. Argüello y al Dr. Gustavo Argüello, por abrirme las puertas al mundo de la investigación científica cuando era sólo una estudiante.

A los alumnos y practicantes que he conocido durante estos años, por motivarme a seguir mejorando día a día la forma de compartir los conocimientos y por renovar mi mirada de asombro frente a las maravillas de la química.

A los miembros de la Comisión de Tesis, Dra. Beatriz Toselli y Dr. Juan Argüello, por sus sugerencias constructivas, sobre todo en este último período.

Al evaluador externo, Dr. Claudio Borsarelli (de la UNSE) por su valioso aporte al manuscrito y por su presencia en la charla final.

Al personal de la FCQ que me ayudó en situaciones administrativas, las cuales no son mi fuerte, a Ana, Nora, Antonio, Pauli, Eugenia, Betina y Marina. A Susana por encargarse de mantener mi lugar de trabajo impecable y mis ánimos arriba. A la Dra. Mariana Maccioni, por su confianza y apoyo como Directora de Posgrado y por sus inolvidables clases cuando profesora. A Marisa, Fer, Caro y Adrián, por estar siempre dispuestos a prestarme reactivos a último momento, y una oreja cuando la necesitaba. A los encargados de equipamientos específicos, por su colaboración: Dra. Cristina Maldonado (imágenes TEM), Dra. Pilar Crespo (imágenes de Microscopía de Fluorescencia) y Dra. Gloria Bonetto (espectros RMN). A la Dra. Mariela Perez, por la oportunidad de llevar este trabajo de investigación a la próxima etapa.

A las Instituciones Argentinas (no sólo a sus paredes, sino a su gente). A la Universidad Nacional de Córdoba, específicamente a la Facultad de Ciencias Químicas, al Departamento de Fisicoquímica y al INFIQC, por brindarme el espacio para poder investigar durante el desarrollo de la tesis y para desempeñarme como docente al mismo tiempo. Al Departamento de Farmacia y al IMBIV, por hacerme sentir bienvenida estos últimos años. Al CONICET y FONCyT por las becas doctorales y la beca posdoctoral otorgadas y por el financiamiento a los grupos de investigación de los que he formado parte.

Al gobierno de Canadá y al NSERC por colaborar económicamente a realizar tres estadías de investigación en la Universidad de Ottawa, mediante sus becas CREATE y Emerging Leaders of América (ELAP).

A la Universidad de Sao Paulo, al Dr. Mauricio Baptista y su grupo de trabajo por recibirme en sus laboratorios.

A todos los presentes en este día de defensa de mi tesis doctoral, que tanto esperé y anhelé (sobre todo a los que vinieron de lejos), por festejar junto a mi este logro.



## **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL**

1.1	CONTEXTO ACTUAL	1
1.2	HIPÓTESIS	1
1.3	PROBLEMÁTICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	2
1.4	MECANISMO DE ADAPTACIÓN BACTERIANA	4
1.5	TRATAMIENTOS ACTUALES	5
1.6	ESTRÉS OXIDATIVO	6
1.7	ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO DE INTERÉS BIOLÓGICO	8
1.7.1	Especies radicalarias	8
1.7.2	Especies no radicalarias	10

## **CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN A LA TERAPIA FOTODINÁMICA ANTIBACTERIANA (PACT)**

2.1	ASPECTOS GENERALES DE LA PACT	13
2.2	FOTOSENSIBILIZADORES	15

## **CAPÍTULO 3: PROYECTO DE TESIS**

3.1	MOTIVACIÓN	17
3.2	OBJETIVOS GENERALES	17
3.3	NUEVOS FOTOSENSIBILIZADORES PROPUESTOS	17
3.4	FUENTES DE IRRADIACIÓN	18

## CAPITULO 4: COMPLEJOS DEL CROMO COMO FOTSENSIBILIZADORES

4.1	COMPLEJOS DE METALES DE TRANSICIÓN COMO FOTSENSIBILIZADORES	23
4.2	SÍNTESIS DEL COMPLEJO $[\text{Cr}(\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$	24
4.2.1	Equipamiento	24
4.2.2	Materiales y metodología	25
4.2.3	Síntesis de $\text{CrCl}_3 \cdot \text{THF}_3$	25
4.2.4	Síntesis del $\text{Ag}(2,2' \text{ bisimidazol})\text{NO}_3$	26
4.2.5	Síntesis de $[\text{Cr}(\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$ por ruta (A)	28
4.2.6	Síntesis de de $[\text{Cr}(\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$ por ruta (B)	29
4.3	DISCUSIÓN	29

## CAPÍTULO 5: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y FOTOINHIBITORIA DE $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$

5.1	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA DE $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$	37
5.2	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FOTOINHIBITORIA DE $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$	37
5.3	CITOTOXICIDAD DEL COMPLEJO $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$	39

## **CAPÍTULO 6: CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS DE COBALTO**

6.1	ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ELECTRÓNICA	43
6.2	ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS EN AGUA MQ Y EN BUFFER PBS (pH 7,4)	45
6.3	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA	45

## **CAPÍTULO 7: NANOPARTÍCULAS COMO FOTOSENSIBILIZADORES PARA PACT**

7.1	APLICACIONES BIOLÓGICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS	49
7.2	NANOPARTÍCULAS DE ORO	49
7.3	PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AuNP	49
7.3.1	Síntesis de AuNP por tres métodos diferentes	52
7.3.2	Microscopía de transmisión electrónica (TEM) de AuNP	54
7.3.3	Espectros UV-vis de AuNP	54
7.4	CAPACIDAD ANTIBACTERIANA DE AuNP SIN IRRADIAR	55
7.5	MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA (TEM) EN MUESTRAS BIOLÓGICAS	56
7.6	ESTUDIO CINÉTICO DE LA ACTIVIDAD FOTOANTIMICROBIANA DE B-AuNP	58

## **CAPÍTULO 8: NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS Asp@Ag@AuNP**

8.1	PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE Asp@Ag@AuNP	62
8.1.1	Síntesis de Asp@Ag@AuNP	62
8.1.2	Espectrofotometría electrónica	63
8.1.3	Microscopía de transmisión electrónica (TEM)	64
8.1.4	Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS)	65
8.2	MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA (TEM) EN MUESTRAS BIOLÓGICAS	67
8.3	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE Asp@Ag@AuNP	68
8.3.1	Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	68
8.3.2	Estudio cinético de la actividad fotoantimicrobiana de Asp@Ag@AuNP	70
8.3.3	Estudio de citotoxicidad en células eucariotas	73

## **CAPÍTULO 9: ESTUDIO DEL MECANISMO DE MUERTE CELULAR**

9.1	DETECCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ERO)	79
9.2	CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ERO) Y DEL NITRÓGENO (ERN)	80
9.3	DETECCIÓN DE PRODUCTOS PROTEICOS DE OXIDACIÓN AVANZADA (AOPP)	83

## **CAPÍTULO 10: BIBLIOTECA DE NANOPARTÍCULAS “DULCES”**

10.1 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS ESTABILIZADAS CON EDULCORANTES	90
10.1.1 Síntesis de Asp@AgNP, Glu@AgNP y Suc@AgNP	90
10.1.2 Síntesis de de Asp@AuNP, Glu@AuNP y Suc@AuNP	90
10.1.3 Síntesis de Glu@Ag@AuNP y Suc@Ag@AuNP	90
10.1.4 Espectrofotometría de absorción electrónica	91
10.1.5 Microscopía de transmisión electrónica (TEM)	94
10.1.6 Resumen de datos obtenidos para la biblioteca de nanopartículas “dulces”	95
10.2 ESTUDIO CINÉTICO DE LA ACTIVIDAD FOTOANTIMICROBIANA DE Glu@Ag@AuNP y Suc@Ag@AuNP	96

## **CAPÍTULO 11: 11 CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECCIONES**

11.1 RESUMEN DE AVANCES EN EL DESARROLLO DE NUEVOS FOTOSENSIBILIZADORES	101
11.2 RESUMEN DE LAS TECNICAS EMPLEADAS	101
11.3 PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS	102
11.4 FUTUROS EXPERIMENTOS	103

## ANEXO A

A.1	PANELES DE LED (525 y 400 nm) CONSTRUIDOS <i>ad hoc</i>	105
A.2	GLOVE BOX CONSTRUIDA <i>ad hoc</i>	108
A.3	COMPLEJO [Ag(H <sub>2</sub> biim)]NO <sub>3</sub>	110
A.4	COMPLEJO Cr(H <sub>2</sub> biim)NO <sub>3</sub>	111

## Abreviaturas Usadas

AgNP: nanopartículas de plata

AOPP: Productos Proteicos de Oxidación Avanzada (*Advanced Oxidation Protein Products*)

Asp@Ag@AuNP: nanopartículas con núcleo de oro y cubierta de plata estabilizadas con aspartamo

ATCC: *American Type Culture Collection*

AuNP: nanopartículas de oro

biim: bisimidazol (*biimidazole*)

BLEE: Beta-lactamasas de Espectro Extendido

BSA: Albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*)

CHEO: Hospital de Niños de Ottawa (*Children Hospital East Ontario*)

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

CLSI: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (*Clinical and Laboratory Standards Institute*)

DMSO: dimetil sulfóxido

*E. coli*: *Escherichia coli*

ERO: Especies Reactivas del Oxígeno

ERN: Especies reactivas del nitrógeno

FTIR: *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

Glu@Ag@AuNP: nanopartículas con núcleo de oro y cubierta de plata estabilizadas con glucosamina

Glu@Ag@AuNP: nanopartículas con núcleo de oro y cubierta de plata estabilizadas con sucralosa

HSA: Albúmina de suero humano (*Human Serum Albumin*)

IR: Infrarrojo

LB: Luria Bertani (medio de cultivo)

LED: *Light Emitting Diode*

M9: medio de cultivo mínimo mineral

MDA: malondialdeído

MH: Mueller Hinton (medio de cultivo)

MQ: *Milli-Q* marca registrada creada por *Millipore Corporation* para describir agua “ultrapura” Tipo 1

MTS: sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio

NP: nanopartícula

OMS: Organización Mundial de la Salud

*P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*

PACT: Terapia Fotodinámica Antibacteriana (*Photodynamic Antibacterial Chemotherapy*)

PBS: Buffer Fosfato Salino (*Phosphate Buffered Saline*)

PDT: Terapia Fotodinámica (*Photodynamic Chemotherapy*)

pfbz: pentafluorobenzoato (*pentafluorobenzoate*)

phen: fenantrolina (*phenantroline*)

RL: radicales libres

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

*S. aureus*: *Staphylococcus aureus*

*S. epidermidis*: *Staphylococcus epidermidis*

SARM: *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina

SD: Desviación Estándar (*Standard Deviation*)

TEM: Microscopio Electrónico de Transmisión (*Transmission Electron Microscopy*)

THF: tetrahidrofurano

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

$\tau$ : tiempo de vida media

## **1. INTRODUCCIÓN GENERAL**

### **1.1 CONTEXTO ACTUAL**

Actualmente, la salud pública enfrenta diversos problemas económicos, sociales y políticos cuya solución quizás demore varias décadas. Sin embargo, quizás uno de sus principales inconvenientes sea resuelto muy pronto gracias al avance de la ciencia. Es de conocimiento público el aumento de patologías infecciosas en las cuales los antibióticos han dejado de ser efectivos (CAPITULO 1, SECCIÓN 1.3), ya que los microorganismos causantes desarrollan fácilmente resistencia a ellos. Esto se debe a la enorme capacidad de adaptación bacteriana (CAPITULO 1, SECCIÓN 1.4).<sup>1</sup>

En este contexto, se hace imprescindible la investigación básica sobre alternativas que puedan aplicarse a corto plazo en el tratamiento rutinario de este tipo de afecciones. Según estudios previos, la Terapia Fotodinámica Antibacteriana (PACT por sus siglas en inglés) sería una opción interesante (CAPITULO 2, SECCIÓN 2.1) ya que demuestra causar rápidamente la muerte bacteriana, evitando el desarrollo de resistencia. Este tratamiento requiere de un fotosensibilizador (CAPITULO 2, SECCIÓN 2.2) que al ser irradiado se activa de alguna manera y provoca el daño celular. Una de las formas por las cuales la PACT logra su eficacia es interviniendo en el equilibrio redox de las bacterias, el cual es desbalanceado rápidamente por el estrés generado (CAPITULO 1, SECCIÓN 1.6). Este proceso lleva a la oxidación de macromoléculas bacterianas que son de vital importancia (CAPITULO 9, SECCIÓN 9.3). Una vez que éstas son dañadas, la recuperación celular es irreversible y se desencadena la muerte de forma rápida, lo que no permite la adaptación por parte del microorganismo.<sup>2</sup>

### **1.2 HIPÓTESIS**

Complejos de Cr (III) y nanopartículas metálicas con actividades fotoquímicas serían eficaces fotosensibilizadores para PACT.

### 1.3 PROBLEMÁTICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

La utilización terapéutica de la penicilina y otros antibióticos a partir de los años cuarenta ha sido uno de los logros más importantes del siglo. Desde entonces se han obtenido, comercializado y utilizado una gran cantidad de antimicrobianos y sin embargo, así como al comienzo de la era antibiótica se tenía la falsa esperanza de que las enfermedades producidas por microbios desaparecerían, pronto se puso de manifiesto que las bacterias eran capaces de desarrollar mecanismos de resistencia y así en los años 50 ya se conocían cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilina.

La aparición de cepas resistentes es un fenómeno natural que ocurre cuando los microorganismos se reproducen de forma errónea o se intercambian características de resistencia. Sin embargo, la utilización y el uso indebido de antimicrobianos también aceleran su aparición. Las prácticas inapropiadas de control de las infecciones, las malas condiciones sanitarias y la manipulación inadecuada de alimentos propician el surgimiento de organismos que no son susceptibles a los ataques de antimicrobianos. Este contexto hace que las infecciones persistan, lo que incrementa el riesgo de propagación.

En todo el mundo aparecen y se propagan nuevos mecanismos de resistencia que desafían nuestra capacidad para tratar las enfermedades infecciosas habituales causando muertes y discapacidades cuando, hasta hace poco, podían tratarse. Si no disponemos rápidamente de más antiinfecciosos, muchos tratamientos médicos de referencia estarán condenados al fracaso o acarrearán riesgos muy importantes para la medicina moderna, que depende de la disponibilidad de medicamentos eficaces.

Con frecuencia, las infecciones causadas por microorganismos resistentes no responden al tratamiento, lo que da lugar a una enfermedad prolongada y a un mayor riesgo de defunción.

Por ejemplo, se calcula que la mortalidad de los individuos infectados por *S. aureus* resistentes a metilina (SARM), bacteria que causa infecciones graves tanto en hospitales como en el ámbito extrahospitalario, es un 64% más elevada que en aquellos pacientes infectados por *S. aureus* sensibles a los antibióticos.

La resistencia a los antimicrobianos incrementa los costos de atención sanitaria ya que, cuando las infecciones se vuelven resistentes a los medicamentos de primera línea es preciso utilizar terapias más costosas. La mayor duración de la enfermedad y su tratamiento, frecuentemente en hospitales, eleva los costos de atención sanitaria y la carga económica para las familias y las sociedades.

Sin antimicrobianos eficaces para tratar y prevenir infecciones, se pondrían en peligro los éxitos de intervenciones tales como los trasplantes de órganos, la quimioterapia contra el cáncer y las operaciones de cirugía mayor.

Las infecciones, particularmente las intranosocomiales, provocadas por bacterias resistentes a antibióticos son una gran preocupación en los países en vías de desarrollo como los de América Latina. Las principales responsables de ellas son cepas Gram-negativas, predominantemente especies y subespecies de la familia *Enterobacteriaceae*, seguido de las no fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa*. Por ejemplo, desde finales de los años 90, las patologías originadas por enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) se están convirtiendo en endémicas en Argentina.<sup>3, 4, 5</sup>

Actualmente, en nuestro país, los aislamientos de enterobacterias resistentes son muy frecuentes. El porcentaje de pacientes que no responde al tratamiento antibiótico de rutina alcanza el 10% en la comunidad extrahospitalaria y el 20% en la intrahospitalaria.

Al mismo tiempo, la resistencia a los antimicrobianos desarrollada por parte de los patógenos Gram-positivos, particularmente por ciertas cepas de *S. aureus*, es significativamente importante, especialmente en algunas comunidades.<sup>6</sup>

Hoy en día 700.000 personas mueren por infecciones asociadas a bacterias resistentes a múltiples drogas. Debido a la gravedad del problema, en la última asamblea de los países miembros de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se acordó un plan de acción global para combatir las resistencias a los antibióticos. Particularmente en la Argentina, por causa del uso irracional de antibióticos, hasta el 80% de los infectados por una cepa que causa infecciones intrahospitalarias no responde al tratamiento.<sup>11</sup>

La OMS alertó que el mundo se dirige a "una era post-antibiótica": enfermedades comunes y heridas menores que han sido tratables por décadas pueden volver a producir muertes. Por eso, un comité de expertos propuso el siguiente plan que consta de cinco objetivos: mejorar la concientización y el conocimiento sobre la resistencia a los antibióticos, reforzar la vigilancia y la investigación, reducir la cantidad de infecciones; optimizar el uso de los antibióticos; y asegurar una financiación duradera. Cada país deberá poner en marcha una estrategia nacional contra el problema.

Entre los comportamientos que incrementan la aparición de resistencia a los antimicrobianos, se destaca la prescripción médica innecesaria, como así también las ventas sin receta en algunas farmacias.

La OMS lamentó además que la industria farmacéutica privada no invierta suficiente dinero en el desarrollo de nuevos antibióticos y sí en medicamentos que prometen mayores ganancias. De hecho, desde 1985, pocas estructuras propuestas han llegado a la etapa de estudios clínicos.

Todo esto remarca la importancia y urgencia que tiene el desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas. Esta tesis doctoral contribuye al avance en esta área. <sup>7, 8, 9, 10, 11</sup>

#### **1.4 MECANISMO DE ADAPTACIÓN BACTERIANA**

Los mecanismos de adaptación bacteriana más importantes son los adquiridos y transmisibles. Consisten fundamentalmente en la producción de enzimas bacterianas que inactivan los antibióticos, en la aparición de modificaciones que impiden la llegada del fármaco al punto diana o en la alteración del propio punto diana. Una cepa bacteriana puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos y por diversas especies bacterianas. La mayoría de las veces, en la práctica clínica, las infecciones de este tipo deben tratarse de forma empírica por la dificultad para acceder a los estudios microbiológicos o por la lentitud de los mismos; en estos casos el tratamiento debe apoyarse en la etiología más probable del cuadro

clínico, en la sensibilidad esperada de los patógenos más frecuentes y en los resultados previsibles según los patrones de sensibilidad del entorno.

Los distintos tipos y mecanismos de resistencia que presentan las bacterias frente a los antimicrobianos disponibles no sólo deben ser tenidos en cuenta en los protocolos de tratamiento médicos actuales, sino también al desarrollar una nueva estrategia antimicrobiana.

En las cepas utilizadas en los ensayos de esta tesis se observan particularmente dos mecanismos de resistencia: la adquisición de genes que codifiquen para sustitutos de los blancos originales (este es el caso del PBP2' en *Staphylococcus spp.* meticilinoresistentes) y la inactivación enzimática (en el caso de las betalactamasas de espectro extendido producidas por *Escherichia coli*).

## 1.5 TRATAMIENTOS ACTUALES

En los últimos 15 años se han comercializado compuestos de dos nuevas clases para el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* resistente a la meticilina: linezolid en el 2000 y daptomicina en el 2006.<sup>12</sup>

Linezolid es una oxazolidinona con un mecanismo de acción novedoso; se une a la subunidad 50S del ribosoma procariótico, impidiendo que se acompleje con la subunidad 30S, ARNm, factores de iniciación y formilmetionil-tRNA.<sup>13, 14</sup>

La daptomicina actúa exclusivamente sobre bacterias Gram-positivas, uniéndose (en presencia de iones de calcio) a las membranas bacterianas de las células tanto en fase de crecimiento como estacionaria, causando una despolarización y conduciendo a una rápida inhibición de la síntesis de proteínas, de ADN y de ARN. El resultado es la muerte de la célula bacteriana por lisis celular insignificante.<sup>12, 15</sup>

Por otro lado, las infecciones causadas por cepas productoras de BLEE se tratan con cefepime, aminoglucósidos, quinolonas, b-lactámicos combinados con inhibidores de beta lactamasas y carbapenems, entre los más recientes se encuentran ertapenem y faropenem.<sup>16, 17</sup> Aunque ya aparecen reportes de resistencia contra la mayoría de estos fármacos.<sup>18</sup>

Independientemente de sus interacciones fármaco-diana, se ha propuesto que distintas clases de antibióticos bactericidas generan diferentes niveles de ERO que contribuyen a la muerte celular.<sup>19, 20, 21, 22, 23, 24</sup> El estrés oxidativo (CAPITULO 1.6) que generan algunos antibióticos deriva en diversas alteraciones en la fisiología celular y, consecuentemente, en la activación de la respuesta antioxidante.<sup>25, 26</sup> Estos mecanismos defensivos pueden o no ser efectivos, según la cantidad de ERO y la rapidez con que sean generados. Es sabido hoy en día que la alteración del metabolismo oxidativo y el aumento de anión superóxido ( $O_2^-$ ) podría ser un efecto importante implicado en el mecanismo de acción de diferentes antibióticos. De hecho, MC. Becerra *et al.* (2002) ha descrito que ciprofloxacina induce estrés oxidativo en *S. aureus*.<sup>27, 28</sup> Es más, se pudo demostrar la generación de estrés en otras especies con diferentes grados de defensa contra el metabolismo oxidativo, como *P. aeruginosa* y *E. coli*.<sup>29, 30</sup>

La irrevocable evidencia del rol que juegan las ERO en la muerte bacteriana sugiere que una de las estrategias terapéuticas contra microorganismos resistentes a antibióticos debería ser capaz de desequilibrar el balance redox de los mismos rápidamente, para evitar la posibilidad de activación de mecanismos de defensa o de adaptación. La PACT cumple estas condiciones, por lo cual se la presenta como una posible alternativa al urgente problema de las infecciones bacterianas resistentes a antibióticos. (CAPITULO 2, SECCIÓN 2.1)

## 1.6 ESTRÉS OXIDATIVO

Es aquella situación en la que las células están expuestas a un ambiente prooxidante y los mecanismos defensivos antioxidantes son sobrepasados de manera tal que se afectan el ambiente reductor intracelular. En los sistemas biológicos, los elementos prooxidantes provienen en su mayoría del  $O_2$ , por lo que son llamados genéricamente especies reactivas del oxígeno (ERO).

El reconocimiento de los efectos tóxicos del  $O_2$  sobre los seres vivos se remonta al último tercio del siglo XVIII, en 1777 *Carl Wilhem Sheel* los describe por primera vez. Mientras que los primeros experimentos controlados que demostraron el efecto tóxico del  $O_2$  sobre los animales fueron realizados por *Paul Bert* a finales del siglo XIX.<sup>31</sup> Posteriormente, una gran cantidad de

estudios incrementaron el conocimiento de los efectos dañinos de las altas concentraciones de  $O_2$  sobre los procesos biológicos que constituyen la vida. <sup>32</sup> Sin embargo, no fue hasta 1969 cuando se comprobó implícitamente la generación de estos elementos como subproductos de las reacciones intracelulares. En ese año, *McCord* y *Fridovich* descubren la existencia en humanos de la superóxido dismutasa (SOD), enzima que cataliza la reacción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a peróxido de hidrógeno. Desde entonces se ha verificado la formación de diversos elementos reactivos derivados del  $O_2$  durante el metabolismo oxidativo y su participación en procesos fisiológicos y fisiopatológicos. <sup>33</sup>

Dentro del concepto de ERO se incluyen a los radicales libres (RL) de  $O_2$  y a otros compuestos de  $O_2$  que, si bien no pueden clasificarse químicamente como RL, sí son altamente prooxidantes y capaces de generar RL durante su metabolismo. La alta capacidad de reacción de un RL es debida a que posee un electrón desapareado. Esto también condiciona su corta existencia. Los RL se pueden formar a partir de átomos o moléculas por 3 vías: por la ruptura homolítica del enlace covalente de una molécula, por la pérdida o por la adición de un electrón.

En el interior de la célula, los RL se generan fundamentalmente por reacciones con transferencia de electrones. Estas pueden ser mediadas por la acción enzimática o producirse sin la intervención de enzimas, a menudo con la colaboración de iones metálicos de transición. <sup>34</sup> Al mismo tiempo, condiciones extremas como altas temperaturas, radiaciones ionizantes y luz ultravioleta también favorecen la formación de gran cantidad de RL.

A finales de los años 1980, Robert Furchgott, Lou Ignarro y Ferid Murad describieron la naturaleza química y la vía biosintética de un mediador difusible de corto tiempo de vida media ( $\tau$ ) responsable de la relajación del músculo liso vascular, identificado como óxido nítrico ( $\cdot NO$ ). Después del descubrimiento del  $\cdot NO$  y de la formación de otras especies derivadas del nitrógeno con capacidad reactiva, ha surgido la denominación de especies reactivas de nitrógeno (ERN), un término que muchos investigadores consideran inapropiado debido a que en todas las especies reactivas está presente el átomo de  $O_2$  y a que el electrón desapareado se deslocaliza entre los átomos de nitrógeno y oxígeno; y por lo tanto, no es necesario aplicar esta denominación de ERN. En el presente trabajo, el término ERO incluye a todas las especies reactivas oxigenadas (radicales y no radicales) de interés biológico ya sean derivadas del oxígeno, nitrógeno, el azufre o carbono.

El O<sub>2</sub>, al tener 2 electrones desapareados, es un biradical (estado fundamental triplete). Sin embargo, éstos tienen el mismo *spin*, lo que impide que el O<sub>2</sub> reaccione directamente con otros compuestos. La reducción directa por otros 2 electrones (a la vez) del O<sub>2</sub> molecular está impedida por el hecho de que 2 electrones no pueden ocupar un mismo orbital con el mismo *spin*. El principio de exclusión de Pauli (1925) establece que un orbital atómico no puede ser ocupado por más de 2 electrones con *spines* contrarios (+½ y -½). La restricción de *spin* puede evadirse de tres formas (lo que permite que el O<sub>2</sub> pueda ser utilizado para la generación de energía):

- Al excitarse el O<sub>2</sub>, uno de los electrones desapareados puede pasar a otro orbital de más energía y así invertir su *spin*. De esta forma se genera el oxígeno singulete (altamente reactivo) representado como <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.
- La unión del O<sub>2</sub> a un metal de transición que contiene un electrón desapareado forma complejos que pueden aceptar un par de electrones de otros sustratos sin violar el principio de exclusión de Pauli.
- La restricción de *spin* puede violarse mediante la adición de electrones al O<sub>2</sub> paso a paso. La reducción univalente del O<sub>2</sub> involucra la producción de especies parcialmente reducidas de O<sub>2</sub>.

## 1.7 ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO DE INTERÉS BIOLÓGICO

### 1.7.1 Especies radicalarias

Dentro de las especies radicalarias de mayor interés desde el punto de vista biológico se encuentran: radical anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), radical hidroxilo (•OH), óxido nítrico (•NO), radical dióxido de nitrógeno (•NO<sub>2</sub>), radical hidroperoxilo (HO<sub>2</sub>•), radical peroxilo (RO<sub>2</sub>•) y radical alcoxilo (RO•).

*Radical anión superóxido* (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Se forma a partir de una molécula de oxígeno en presencia de una cantidad de energía suficiente que le permita adquirir un electrón suplementario. Esta especie es producida por un gran número de enzimas, por reacciones de autooxidación y por transferencia no enzimática de e<sup>-</sup> provenientes de la reducción molecular univalente del oxígeno.

El  $O_2^{\cdot-}$  formado *in vivo*, con  $\tau$  del orden de los milisegundos, se dismuta por la SOD con una rápida constante de reacción, o por vía no enzimática, en  $H_2O_2$ . La reactividad del  $O_2^{\cdot-}$  es débil, pero puede penetrar las membranas biológicas y causar daños a blancos específicos. Además de los procesos de dismutación anteriormente mencionados, el  $O_2^{\cdot-}$  es capaz de reaccionar con el ácido ascórbico con una constante de velocidad de  $2,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a  $\text{pH}=7,0$ .<sup>31</sup> Aunque es 4 órdenes inferior a la velocidad de reacción de la SOD, la concentración de ascorbato *in vivo* es generalmente 4 órdenes superior a la de SOD, todo ello hace factible la transformación de este radical al radical semidehidroascorbato, el cual es muy poco reactivo e incapaz de causar daños biológicos significativos.<sup>35</sup> También el  $O_2^{\cdot-}$  puede reaccionar con grupos sulfhidrilos (-SH), aunque la velocidad de esta reacción ( $<10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) es usualmente muy baja.<sup>36</sup> Adicionalmente, la reacción del  $O_2^{\cdot-}$  con el glutatión produce radicales sulfurados más lesivos que el propio  $O_2^{\cdot-}$ .<sup>37</sup>

Bajo condiciones de sobreproducción y agotamiento de sus secuestradores, el  $O_2^{\cdot-}$  puede interactuar con los -SH de las proteínas y enzimas de su vecindad e inactivarlas, agotar el glutatión e iniciar una cascada de eventos oxidativos.<sup>38</sup>

*Radical hidroxilo ( $\cdot OH$ )*. Es el radical más reactivo encontrado en los sistemas biológicos.<sup>39</sup> Tiene la capacidad de reaccionar con casi todas las moléculas biológicas con constantes de velocidad del orden de  $10^9$ - $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Se forma esencialmente a partir de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$ , a través de las reacciones de Haber-Weiss y Fenton, las que requieren trazas de metales de transición como catalizadores.<sup>40</sup> En este caso, el hierro juega el papel protagónico *in vivo*. No existen secuestradores específicos *in vivo* para esta especie radicalaria.

La interacción de  $\cdot OH$  con componentes de las membranas bacterianas, son esenciales en el origen del daño oxidativo celular.<sup>41</sup> El  $\cdot OH$  puede atacar un átomo de hidrógeno metilénico de un ácido graso y formar un radical lipídico ( $L^{\cdot}$ ), como resultado queda un  $e^-$  sin aparear en el átomo del carbono metilénico. Este radical sufre un reordenamiento molecular que produce un dieno conjugado que reacciona con el oxígeno molecular para dar lugar a un radical hidroperóxil lipídico ( $LOO^{\cdot}$ ). Dicho radical extrae un átomo de hidrógeno del carbono del grupo metilénico del ácido graso adyacente, y forma otro  $L^{\cdot}$  y el hidroperóxido lipídico ( $LOOH$ ). El  $L^{\cdot}$  se combina con otra molécula de oxígeno (reacción en cadena), proceso conocido como peroxidación lipídica o, por otra parte, se une con otro  $L^{\cdot}$  para formar un complejo no reactivo, a expensas de la unión

cruzada de los ácidos grasos de membrana, lo cual conduce a una disminución de la fluidez de la membrana. <sup>42</sup>

*Radicales peroxilo y alcoxilo ( $RO_2\cdot$ ,  $RO\cdot$ ).* Se forman típicamente como intermediarios, durante la ruptura de lípidos peroxidados en las reacciones radicalarias de la POL. La formación de  $RO_2\cdot$  es el paso más importante de las reacciones de propagación en cadena durante la POL. La peroxidación de la membrana produce pérdida de la fluidez, alteraciones en las funciones secretoras y los gradientes iónicos. <sup>43</sup> Se producen numerosos residuos químicos de estas reacciones, siendo el más importante en las bacterias el malondialdehído (MDA). Entre los secuestradores de los radicales  $RO_2\cdot$  y  $RO\cdot$  el principal es el glutatión.

*Óxido nítrico ( $\cdot NO$ ).* Es un gas incoloro que posee un electrón no apareado deslocalizado entre el átomo de nitrógeno y el de  $O_2$ . El  $\cdot NO$  es relativamente poco estable en presencia de  $O_2$  molecular con un  $\tau$  de aproximadamente  $3 \times 10^{-5}$  s. Se forma *in vivo* a partir del aminoácido L-arginina por acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS). El  $\cdot NO$  puede interactuar con el  $O_2\cdot^-$  en una reacción radical-radical para generar el anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), en una reacción que transcurre con una velocidad de  $6,7 \times 10^9 M^{-1} \times s^{-1}$ . El  $ONOO^-$  puede ejercer su toxicidad directamente sobre las células o descomponerse en otros productos tóxicos, que incluyen el  $\cdot OH$ .<sup>44</sup>

### **1.7.2 Especies no radicalarias**

Las especies no radicalarias de mayor interés biológico son: ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno singlete ( $^1O_2$ ).

*Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ):* Se forma *in vivo* por dismutación del  $O_2\cdot^-$  espontánea o enzimática (SOD y varias oxidasas en reacciones de oxidación-reducción durante el metabolismo celular). Es capaz de oxidar grupos  $-SH$  de proteínas y causar su ruptura. <sup>45</sup> Su efecto más nocivo es la formación de  $\cdot OH$  catalizado por metales de transición. Fisiológicamente el  $H_2O_2$  se remueve por la acción de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT). <sup>46</sup>

En resumen, durante el estrés oxidativo los efectos pro-oxidantes de las ERO originan daños irreparables a las principales biomoléculas como proteínas y lípidos, tanto de bacterias

aerobias como anaerobias. Como se mencionó anteriormente, la PACT sería una alternativa eficaz para romper este balance redox, logrando el efecto bactericida deseado.

---

## **BIBLIOGRAFIA**

- <sup>1</sup> Dwyer DJ, Belenky PA, Yang JH, MacDonald IC, Martell JD, Takahashi N, Chan CT, Lobritz MA, Braff D., Schwarz Ejem: Vosotros JD, Pati M., Vercruyse M., Ralifo PS, Allison KR, Khalil AS, Ting AY, Walker GC, *J Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014; 111 (20), e2100-9
- <sup>2</sup> Tim Maisch *Lasers Med Sci.* 2007, 22: 83–91
- <sup>3</sup> Davies J, Davies D. *Microbiol Rev Mol Biol.* 2010; 74: 417-33
- <sup>4</sup> Guzmán-Blanco M, Labarca JA, Villegas MV, Gotuzzo E; *Braz J Infect Dis.* 2014; 18 (4): 421-33
- <sup>5</sup> Gómez S, M Rapoport, Togneri A, Viegas-Caetano J, Faccione D, Corso A, Petroni A, Pasteran F. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011; 69 (1): 94-7
- <sup>6</sup> John S. Bradley. *Infec. J.* 2014; 68: S63-S75
- <sup>7</sup> The initiatives of ECDC on antimicrobial resistance ([www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2012.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2012.pdf))
- <sup>8</sup> Antimicrobial resistance - Global Report on Surveillance - WHO 2014 ([www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en](http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en))
- <sup>9</sup> Global strategy for containment of antimicrobial resistance - WHO 2001( [www.who.int/drugresistance/WHO\\_Global\\_Strategy\\_English.pdf](http://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_English.pdf))
- <sup>10</sup> The Antibiotic Resistance Threat in the United States – US Department for Health and Human Services - U.S. Centers for Disease Control and Prevention 2013 ([www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf](http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf) )
- <sup>11</sup> “Lanzan un plan mundial contra...” Argentina - *Diario Clarin* 31-05-2015
- <sup>12</sup> Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, Así AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir M, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Coches O. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13 (12): 1057-1098
- <sup>13</sup> Livermore DM. *J. Antimicrob Chemother.* 2003; 51 (2): 9-16. Review.
- <sup>14</sup> Swaney SM, Aoki H., Ganoza MC, Shinabarger DL. *Agentes Antimicrobianos y Quimioterapia.* 1998; 42 (18): 3251-5
- <sup>15</sup> -Arbeit RD, Maki D, Tally FP, Campanaro E, Eisenstein BI. *Clin Infect Dis.* 2004; 38(12): 1673-1681
- <sup>16</sup> Corbella X, Montero A, Pujol M, Dominguez MA, Ayats J, Argerich MJ, Garrigosa F, Ariza J, Gudiol F. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4086-4095
- <sup>17</sup> Mushtaq S, Ge Y, Livermore DM. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1313-1319
- <sup>18</sup> Wolter DJ, Acquazzino D, Goering RV, Sammut, Khalaf N, Hanson ND. *Infect Dis.* 2008; 46 (12):e137-e141
- <sup>19</sup> Ayala J.”Genética molecular de la pared microbiana. Nuevos blancos susceptibles de inhibición” Avances en Ingeniería Genética. Series Nuevas Tendencias. Vicente M, editor. Madrid (CSIC) 1994: 9191-224
- <sup>20</sup> Matagne A, Lamotte J, Frere J. *Biochem J.* 1998; 330:581-98
- <sup>21</sup> “Mecanismos de resistencia” Principles and Practice of Infectious Diseases 4ª ed. Madel, Douglas, Bennet, editores. USA 2002
- <sup>22</sup> Medeiros A. *Clin. Microbiology and Infection* 1997; 3(4): 452-459
- <sup>23</sup> Rasmussen B, Bush K. *Antimicrob. Agents. Chemotherm.* 1997; 41 (2): 223-32
- <sup>24</sup> Wang Z, Fast W, Valentine A, Bencovic S. *Current opinion in Chem. Bio.* 1999; 3: 614-22
- <sup>25</sup> Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B., Lawrence CA, Collins JJ. *Cell,* 2007, 130 (5): 797-810
- <sup>26</sup> Imlay J.A. *Annu Rev Microbiol.* 2003, 57: 395-418
- <sup>27</sup> Becerra MC, Albesa I. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 297 (4): 1003-7
- <sup>28</sup> Becerra MC, PL Páez, Larovere LE, Albesa I. *Mol Cell Biochem.* 2006; 285 (1-2): 29-34
- <sup>29</sup> Albesa I, Becerra MC, Battán PC, Páez PL. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 317 (2): 605-9
- <sup>30</sup> Becerra MC, Páez PL, Laróvere LE, Albesa I. *Mol Cell Biochem.* 2006 Apr; 285 (1-2): 29-34
- <sup>31</sup> Scheele CW. “Chemische Abhandlung von der Luft und dem Feuer” Uppsala y Liepzig, editores Seccion. En: Schelle CW. The collected papers of Carl Wilhelm Scheele. (Reimpresión) New York 1971: 85-178
- <sup>32</sup> Turbay MB, Rey V, Argañaraz NM, Morán Vieyra FE, Aspée A, Lissi EA, Borsarelli CD. *J. Photochem Photobiol B.* 2014;14:275-82
- <sup>33</sup> Joe M. McCord. *Am J Med.* 2000; 108: 652-9
- <sup>34</sup> Halliwell B, Gutteridge JMC. “Free Radicals in Biology and Medicine 2ª ed” Clarendon Press - Oxford UK 1989
- <sup>35</sup> Cabelli DEI, Bielski BHJ. *J Phys Chem.* 1983; 87: 1809-12

- 
- <sup>36</sup> Aruoma OI. *Free Rad Biol Med*. 1989; 6: 593-7
- <sup>37</sup> Schoneich C. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 161: 113-20
- <sup>38</sup> Brent JA, Rumack BH. *Free Radical Biochem. ClinToxicol*. 1993; 31: 139-71
- <sup>39</sup> Aruoma OI, Halliwell B, Mahmood N, Burke A, Greenspan HC. *Free Rad Biol Med* 1996; 20: 675-705
- <sup>40</sup> Goldstein S. The Felton Reagents. *Free Radic Biol Med*. 1993; 15: 435 - 45
- <sup>41</sup> Grisham MB, McCord JM. "Chemistry and Cytotoxicity of Reactive Oxygen Metabolites" Taylor AE, Matalon S, Ward P, editors. *Physiology of Oxygen Radicals*. Maryland - American Physiological Society - USA 1986: 1-18
- <sup>42</sup> Thomas MM, Guy AZ, Stephen MP. *J Biol Chem*. 1999; 274: 25189-92
- <sup>43</sup> Southorn PA, Powis G. *Mayo Clinic Proc*. 1988; 63: 381-9
- <sup>44</sup> Claudio N, Louis JI. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 2003; 43: 97-123
- <sup>45</sup> Rojkind M, Domínguez-Rosale JA, Nieto N, Greenwel P. *CMLS Cell Mol Life Sci*. 2002; 59: 1-20
- <sup>46</sup> Halliwell B. *Free Rad Res Comms*. 1990; 9: 1-32

## **2. INTRODUCCIÓN A LA TERAPIA FOTODINÁMICA ANTIBACTERIANA**

### ***(PHOTODYNAMIC ANTIBACTERIAL CHEMOTHERAPY - PACT)***

#### **2.1 ASPECTOS GENERALES DE LA PACT**

La PACT es una modalidad terapéutica basada en la combinación de un fotosensibilizador (FS) (CAPITULO 2, SECCIÓN 2.2) que se localiza selectivamente en el tejido diana y la iluminación del área de interés para lograr, a través de distintos mecanismos, daño y muerte celular.<sup>1, 2</sup>

Por lo general, el FS es una molécula que tras exposición a luz de una longitud de onda específica dará lugar a la absorción electrónica seguida de la producción de especies excitadas.<sup>3</sup> Las especies excitadas (especialmente especies de tripletes) generan transferencia de energía al oxígeno (fotosensibilización tipo II), o se someten a reacción directa (transferencia de electrones u otras reacciones) con los sustratos diana (fotosensibilización tipo I), generando por lo general radicales y, finalmente, especies reactivas del oxígeno (ERO).<sup>3</sup>

Cuando estas ERO se producen extracelularmente,<sup>4</sup> tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, el resultado es dependiente de la duración de la concentración de FS en las proximidades de las bacterias al momento de irradiación.<sup>5</sup> Sin embargo, si se logra la unión a la superficie celular o la internalización del FS, los resultados de la fotoactivación serían mejores.<sup>6</sup>

La eficacia de la PACT no sólo depende del FS, sino también de la fuente de irradiación utilizada. La longitud de onda de irradiación tiene que coincidir con la de máxima absorción del FS y al mismo tiempo, debe ser tal que su energía no produzca daños celulares por sí misma. Es por ello que el uso de la luz ultravioleta no es recomendado para esta terapia. Por otro lado, la potencia de irradiación debe ser suficiente para lograr excitar al FS. Dado que la PACT depende de la exposición a una fuente de luz, permite el tratamiento y el control local pero, en consecuencia, no se podría utilizar en enfermedades diseminadas.

Es relevante destacar que en la fotoactivación se logra un ataque multifactorial contra los microorganismos, ya que distintas ERO con diferentes mecanismos y sitios de acción son generadas.<sup>7,8</sup> Dicho ataque multifactorial se ha demostrado tanto en virus como bacterias.<sup>1</sup> En consecuencia, un beneficio importante de PACT es la ausencia de resistencia microbiana y, por

tanto, una eficacia similar contra cepas microbianas sensibles a fármacos y resistentes a los medicamentos convencionales. Los resultados recientes han demostrado que los microorganismos tratados con PACT no desarrollan resistencia.<sup>9,10</sup> Además de causar la muerte celular, las reacciones de fotosensibilización en los tejidos biológicos también pueden inducir reacciones inmunes estimulantes y por lo tanto tienen el potencial de mejorar la respuesta general del huésped a las infecciones.<sup>11, 12, 13</sup>

El primer resultado publicado de fotosensibilización en la biología, es una observación hecha por Raab a comienzo del siglo pasado, donde se evidenció la muerte inducida por luz del protozoo *Paramecium caudatum*.<sup>14</sup>

En la década de 1970, el grupo de Dougherty fue pionero en el tratamiento de cáncer de piel utilizando Terapia Fotodinámica (PDT).<sup>15</sup> Sin embargo, la FDA aprobó el primer FS recién en el año 2000, tras varios estudios que demostraron que el ácido amino levulínico (ALA) es eficaz, seguro y bien tolerado por los pacientes con carcinomas de piel. En el año 2003, en Estados Unidos, el ALA fue aprobado para su uso en PACT en casos de acné vulgar inflamatorio. Por otro lado, el Photofrin®<sup>16</sup> (un porfímero sódico) ha obtenido la licencia gubernamental para su uso clínico en Japón en 1994, la cual es equivalente a la aprobación de la FDA en los EE.UU. Este método en la actualidad es utilizado clínicamente en Canadá y los Países Bajos.<sup>17</sup> La aplicación de ALA y Photofrin® en un número de otras condiciones malignas (por ejemplo, psoriasis, verrugas virales, y la eliminación del vello) se encuentra actualmente en investigación.<sup>18, 19, 20, 21</sup> El azul de metileno es otro FS, que se ha aplicado con éxito al tratamiento de procesos infecciosos odontológicos y epiteliales en humanos.<sup>22</sup> Las pterinas presentes en la piel también han sido estudiadas como FS, ya que sus defectos producen un trastorno de despigmentación epitelial donde falla la protección contra la radiación UV debido a la falta de melanina.<sup>23</sup>

Existen al momento un gran número de FS incluyendo variaciones de porfirinas, ftalocianinas, colorantes, extractos vegetales, compuestos de metales de transición y nanopartículas, que ya han sido ampliamente investigados pero no logran llegar a la fase de ensayos clínicos. Las razones son diversas y complejas, pero esto se debe en gran parte a las limitaciones fisicoquímicas y biológicas de cada FS.

## 2.2 FOTOSENSIBILIZADORES

En general, el FS es una molécula que tras la exposición a luz de una longitud de onda específica dará lugar a la absorción electrónica seguida de la producción de especies excitadas.<sup>3</sup> Su interacción con el entorno puede dar lugar a dos tipos de reacciones. Estas reacciones fueron denominadas como Tipo I y Tipo II.<sup>24, 25</sup> En las reacciones Tipo I, el FS en su estado excitado triplete reacciona con biomoléculas (lípidos, proteínas o ácidos nucleicos), transfiriendo átomos de hidrógeno mediante mecanismo radicalario. Éste genera radicales libres o iones radicales que luego reaccionan con el oxígeno, resultando en ERO.<sup>26</sup> Las reacciones Tipo II están basadas en un fenómeno llamado aniquilación triplete-triplete. En estas reacciones, el FS en su estado excitado triplete reacciona con oxígeno en su estado fundamental triplete. Esto produce oxígeno singulete, el cual es altamente reactivo y citotóxico. Por lo general, ambos tipos de reacciones ocurren al mismo tiempo. El balance entre estos dos procesos depende del FS empleado, de las concentraciones de oxígeno y sustrato, y de la afinidad del FS por el sustrato.<sup>27</sup> Sin embargo, en la generación de oxígeno singulete por ejemplo, las reacciones Tipo II son consideradas las principales.<sup>28</sup> Las ERO y el oxígeno singulete tienen gran reactividad y tiempos de vida media cortos. Debido a esto, la PACT afecta directamente sólo a los sustratos biológicos que están en las cercanías de donde estas especies son originadas, usualmente en un radio no mayor a 20 nanómetros.<sup>29</sup> En consecuencia, la localización del FS es un factor primordial para su eficacia.<sup>30</sup>

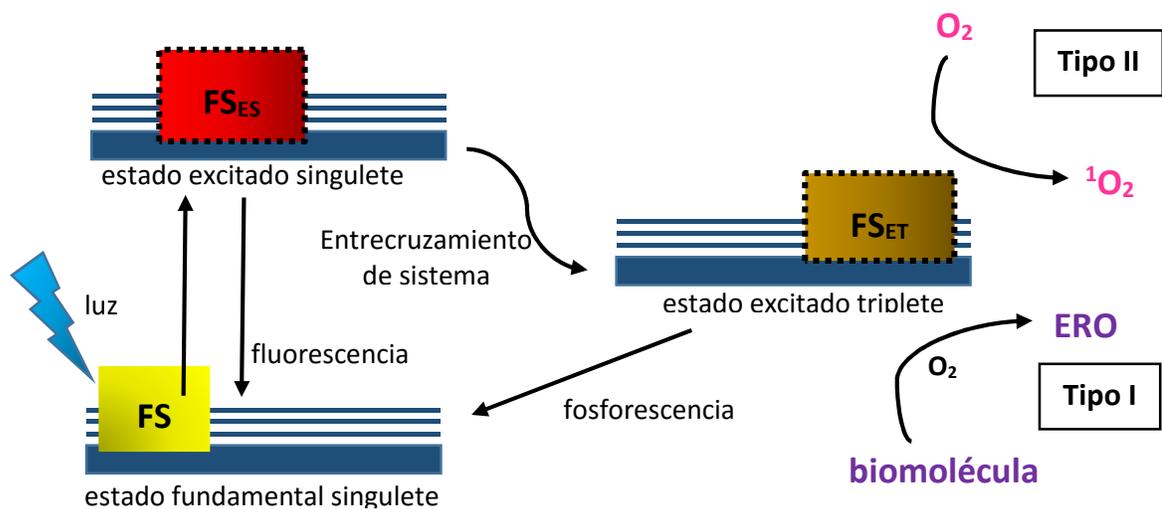


Figura 2a. Diagrama de Jablonsky esquemático donde se ilustran los mecanismos de reacción Tipo I y Tipo II de la PACT.

---

## **BIBLIOGRAFÍA**

- <sup>1</sup> Wainwright M. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 13-28
- <sup>2</sup> MS Baptista. *Braz J Med Biol Res.* 2011; 44 (1): 1 -10
- <sup>3</sup> Foote CS. *Sci.* 1968; 162: 963-970
- <sup>4</sup> Valduga G, Bertoloni G, Reddi E, Jori G *J Photochem Photobiol* 1993; B21: 81–86
- <sup>5</sup> Demidova TN, Hamblin MR *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2329–2335
- <sup>6</sup> De Sordi L, Butt MA, Pye H, Kohoutova D, Mosse CA, Yahiolglu G. *Plus One* 2015; 10 (8): e0135039
- <sup>7</sup> Bush K, Courvalin P, Dantas G, Davies J, Eisenstein B, Huovinen P. *Nat Rev Microbiol* 2011 9: 894–896
- <sup>8</sup> St Denis TG, Dai T, Izikson L, Astrakas C, Anderson RR, Hamblin MR. *Virulence* 2: 509–520
- <sup>9</sup> Tavares A, Carvalho CM, Faustino MA, Cunha A, Gomes NC, Alves E, Almeida A. *Drug Treat.* 2010; 8 (1): 91-105
- <sup>10</sup> Giuliani F, Martinelli M, Cocchi A, Arbia D, Fantetti L, Roncucci G. *Antimicrob Agents Chem.* 2010; 54: 637–642
- <sup>11</sup> Hryhorenko EA, Oseroff AR, Morgan J, Rittenhouse-Diakun K. *Immunopharmacology* 1998; 40: 231-240
- <sup>12</sup> Castano AP, Mroz P, Hamblin MR *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 535- 545
- <sup>13</sup> Aruoma O. “Los radicales libres en enfermedades tropicales” *Chur: Harwood Academic* - Londres 1993
- <sup>14</sup> Raab O. *Zeits Biol* 1900; 39: 524-546
- <sup>15</sup> Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, Moan J, Peng Q. *Photodynamic therapy.J Natl Cancer Inst.* 1998; 90: 889-905
- <sup>16</sup> Japón Lederle Co. Ltd. - Tokio, Japón
- <sup>17</sup> Detty MR, Gibson SL, Wagner SJ. *J. Med. Chem* 2004; 47: 3897–3915
- <sup>18</sup> Robinson DJ, Collins P, Stringer MR, Stables GI, Brown SB, Sheehan-Dare RA. *Acta Dermato-Venereol.* 1999; 79: 451–455
- <sup>19</sup> Stender IM, Na R, Fogh H, Gluad C, Wulf HC. *Randomised Double-blind Trial. Lancet.* 2000; 355: 963–966
- <sup>20</sup> Hongcharu W, Taylor CR, Chang Y, Aghassi D, Suthamjariya K, Anderson RR. *J. Investig. Dermatol.* 2000; 115: 183–192
- <sup>21</sup> Stender IM, Lock-Andersen J, Wulf HC. *Clin. Exp. Dermatol.* 1999; 24: 154–159
- <sup>22</sup> Guglielmi C, Simionato MR, Ramalho KM, Imparato JC, Pinheiro SL, Luz MA. *Clin Exp Dermatol.* 2010; 35(4): 351-4
- <sup>23</sup> Serrano MP, Lorente C, Vieyra FE, Borsarelli CD, Thomas AH. *Phys Chem Chem Phys.* 2012; 14 (33): 11657-65
- <sup>24</sup> Moser, JG. Definitions and General Properties of 2nd & 3rd Generation Photosensitizers” *Photodynamic Tumor Therapy - 2nd & 3rd Generation Photosensitizers.* Moser, JG., editor. *Harwood Academic Publishers* - Londres: 1997: 3-8
- <sup>25</sup> Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu XH, Childs CJH, Sibata CH. *Photodiag. Photodyn. Therapy* 2004; 1: 27–42
- <sup>26</sup> Kharkwal, G.B.; Sharma, S.K.; Huang, Y.-Y.; Dai, T.; Hamblin, M.R. *Lasers Surg. Med.* 2011; 43: 755–767
- <sup>27</sup> Dolmans, D.E.J.G.J.; Fukumura, D.; Jain, R.K. *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3: 380–387
- <sup>28</sup> Macdonald, I.J.; Dougherty, T.J. *J. Porphy. Phthalocyanines* 2001; 5: 105–129
- <sup>29</sup> Allison, R.R.; Moghissi, K. Photodynamic therapy (pdt): Pdt mechanisms. *Clin. Endosc.* 2013; 46: 24–29
- <sup>30</sup> Machado, A.E.d.H. *Quim. Nova.* 2000; 23: 237–243.

### **3. PROYECTO DE TESIS**

#### **3.1 MOTIVACIÓN**

En la presente tesis doctoral se pretende contribuir al desarrollo de fotosensibilizadores para su uso en la PACT que sean eficaces ante microorganismos multiresistentes y que —a su vez— sean fáciles de sintetizar a escala farmacéutica industrial.

#### **3.2 OBJETIVOS GENERALES**

- *Profundizar estudios fotoquímicos y fotofísicos derivados de las líneas de trabajo del grupo.*
- *Contribuir al desarrollo de la PDT<sup>1</sup> y de la PACT<sup>2</sup> mediante la síntesis y estudio de nuevos compuestos que puedan ser usados como fotosensibilizadores.*
- *Promover y fortalecer la interacción entre grupos de investigación provenientes de distintas áreas del conocimiento como Físico-Química y Microbiología.*

#### **3.3 NUEVOS FOTOSENSIBILIZADORES PROPUESTOS**

Un FS ideal debe cumplir con ciertos criterios que son química y clínicamente relevantes. Debe tener una síntesis sencilla y rápida, baja toxicidad en oscuridad pero fuerte fototoxicidad en células procariotas, buena selectividad y biocompatibilidad.

En este sentido, en la presente tesis doctoral se proponen nuevos FS con potencial uso en PACT: un compuesto de un metal de transición (Figura 3a) y una librería de nanopartículas de oro, de plata y bimetálicas.

Las nanopartículas sintetizadas en colaboración con el grupo del Dr. J. C. Scaiano (Universidad de Ottawa – Canadá) fueron, por un lado, nanopartículas de oro (AuNP) “desnudas”, con citrato de sodio y con borohidruro de sodio como reductores/estabilizadores y nanopartículas de plata (AgNP) con borohidruro de sodio. Por otro lado, se obtuvo una librería de AuNP, AgNP y nanopartículas bimetálicas con un núcleo de oro y una cubierta de plata denominadas “*coreshell*” estabilizadas con tres azúcares: aspartamo (Asp), glucosamina (GlcN) y sucralosa (Suc), como se esquematiza a continuación (Figura 3b).

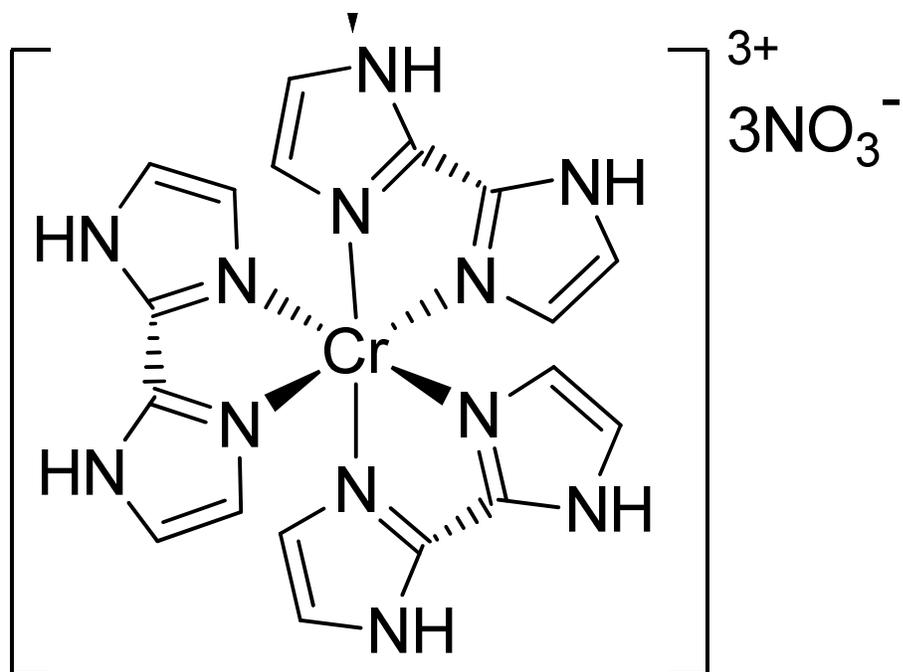


Figura 3a. Nuevo fotosensibilizador de metal de transición sintetizado:  $[\text{Cr}(\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$ .

### 3.4 FUENTES DE IRRADIACIÓN

Las primeras fuentes de luz usadas en PDT eran fuentes de luz no coherente (por ejemplo, lámparas de arco convencionales).<sup>3</sup> Estas pueden ser utilizadas en conjunto con filtros ópticos para obtener la longitud de onda seleccionada. Las desventajas de las lámparas convencionales incluyen un efecto térmico significativo, baja intensidad y la dificultad en el control de dosis de luz.

Entre las fuentes de luz más recientes se destacan los láseres. Producen alta energía de luz monocromática de una longitud de onda específica, con un ancho de banda estrecho para un fotosensibilizador específico. La luz láser presenta una ventaja importante frente a las fuentes tradicionales: se puede enfocar y transmitir mediante fibra óptica, logrando mayor precisión en la irradiación del sitio de interés. Sin embargo, el costo elevado de los mismos evitaría que su uso en PACT a nivel clínico sea factible. Una alternativa más económica serían los diodos emisores de luz (LED), los cuales también pueden generar irradiación selectiva de alta energía y, además,

pueden ser montados en una gama de arreglos de diferentes formas y tamaños, desde paneles hasta sondas intratisulares.<sup>4, 5, 6, 7</sup>

Para la irradiación de los fotosensibilizadores propuestos en esta tesis, se han construido *ad hoc* dos fuentes de LED de alta energía, una con capacidad de emitir a 400 nm y otra a 525 nm. (ANEXO)

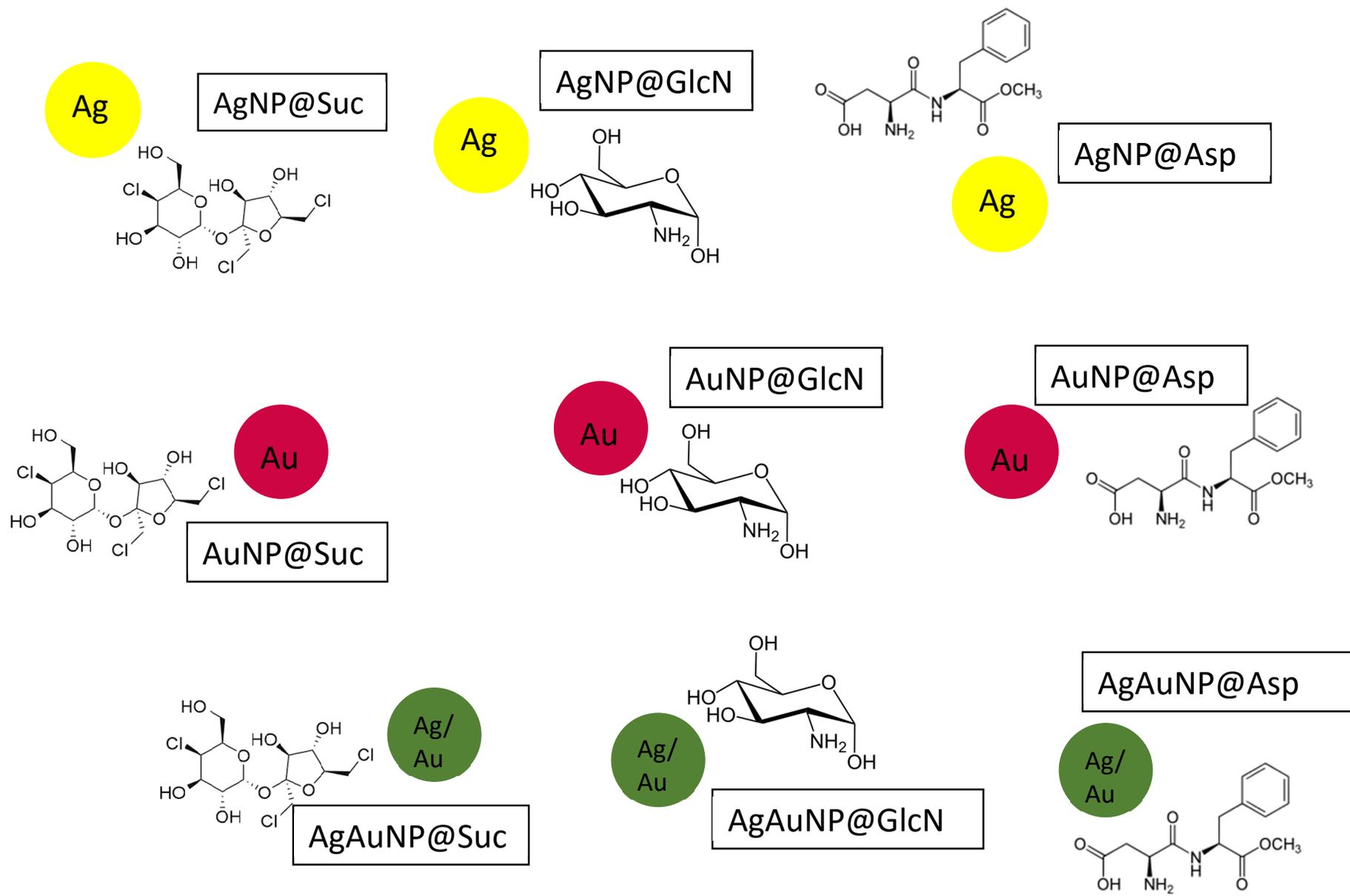


Figura 3b. Librería de nanopartículas ·dulces·.

---

## **BIBLIOGRAFÍA**

- <sup>1</sup> Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. *J Photochem Photobiol B*. 2009; 17, 96 (1): 1-8. *Review*.
- <sup>2</sup> Tim Maisch, *Lasers in Medical Sciences* (2007): 83-91
- <sup>3</sup> Schmidt MH, Bajic DM, Reichert KW II, Martin TS, Meyer GA, Whelan HT. *Neurosurgery* 1996; 38: 552–556
- <sup>4</sup> Lustig RA, Vogl TJ, Fromm D, Cuenca R, His AR, D'Cruz AK, Krajina Z, Turic M, Singhal A, Chen JC. *A Cancer J*. 2003; 98: 1767–1771
- <sup>5</sup> Chen J, Keltner L, Christophersen J, Zheng F, Krouse M, Singhal A, Wang SS. *Cancer J* 2002; 8: 154–163
- <sup>6</sup> Juzeniene A, Juzenas P, Ma LW, Iani V, Moan J. *Lasers Med. Sci* 2004; 19: 139–149
- <sup>7</sup> Mang TS. *Photodiag. Photodyn. Therapy* 2004; 1: 43–48

---

## 4. COMPLEJOS DEL CROMO COMO FOTOSENSIBILIZADORES

### OBJETIVO ESPECÍFICO

- Sintetizar un complejo de coordinación del tipo  $(Cr(NN)_3 \cdot n(N'N'))_n^{z+/}$ , pudiendo ser NN y N'N' cualquier ligando polipiridinico como biim (2,2' bisimidazol), phen (y sus sustituidos), bpz (bipirazida), y otros.

### 4.1 COMPLEJOS DE METALES DE TRANSICIÓN COMO FOTOSENSIBILIZADORES

Diferentes tipos de compuestos demostraron ser capaces de producir la muerte del microorganismo después de la irradiación a la longitud de onda adecuada, por ejemplo, porfirinas, ftalocianinas, complejos de coordinación de Ru (II) y complejos de coordinación de Cr (III).<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9</sup> Entre éstos, los complejos del Cr (III) son capaces de facilitar el mecanismo de tipo I de fotosensibilización, produciendo el daño fotoquímico sin la intervención de especies reactivas del oxígeno (ERO).<sup>10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17</sup> Esto podría ser una opción interesante en contra de algunos de los mecanismos antioxidantes bacterianos conocidos. El uso de complejos de metales de transición en PACT ha sido el foco de nuestra investigación en los últimos años.<sup>18, 19</sup>

Los resultados obtenidos proporcionan evidencian que el estado excitado del complejo  $[Cr(phen)_2(dppz)]^{3+}$  es capaz de dañar la estructura del ADN, además de intercalarse en la doble hélice gracias a su ligando polipiridinico. Por otro lado, los ensayos microbiológicos realizados sugieren que el crecimiento de *Escherichia coli* puede ser inhibido por irradiación en presencia de  $[Cr(phen)_2(dppz)]^{3+}$ .<sup>18</sup> Este complejo también ha demostrado la capacidad de unirse fuertemente con albúmina de suero bovino y humano (BSA y HSA) con constantes de unión  $K_b$  de  $(1,7 \pm 0,3) \times 10^5 M^{-1}$  y  $(2,2 \pm 0,3) \times 10^5 M^{-1}$  a 295 K, respectivamente. La interacción de  $[Cr(phen)_2(dppz)]^{3+}$  con las proteínas séricas causó cambios conformacionales en ellas, con la pérdida de la estabilidad helicoidal y la perturbación local en el bolsillo de unión de dominio IIA. Estos hallazgos alentaron a continuar la investigación de esta familia de complejos.<sup>19</sup>

Más allá de su probada utilidad, no hay muchos de ellos disponibles comercialmente. Esto es, en parte, debido al hecho de que no son fáciles de preparar. Por lo general, la síntesis de complejos de Cr (III) es un procedimiento que consume mucho tiempo. De hecho, se han probado

diversos métodos de síntesis para obtener un complejo homoléptico del Cr(III) para ser utilizado posteriormente en pruebas para la PDT. Uno de ellos partía de cloruro de cromo (III) hexahidrato, pero éste resultó no ser suficientemente reactivo con la sal de plata del bisimidazol (a pesar de cambiar el medio de reacción varias veces), por lo que sólo se llegaba a obtener el complejo de Cr (III) monosustituído a pesar de colocar el ligando en exceso como está descrito para la fenantrolina.<sup>20</sup> Otra metodología partía del cloruro de Cr (II) hexahidrato y se lo hacía reaccionar con la sal de perclorato del bisimidazol. Esto no fue posible porque el ligando escogido no formaba la sal esperada con el perclorato, se cree que debido a la baja solubilidad del bisimidazol en el medio acuoso sugerido. Además, este camino de síntesis implicaba luego oxidar al Cr(II) con burbujeo de cloro gaseoso, por este motivo, se decidió buscar un método alternativo más simple. Se decidió entonces ensayar la síntesis que partía del cloruro de cromo tri-tetrahidrofurano, y se optimizó el procedimiento hasta alcanzar la síntesis del  $[\text{Cr}(\text{biim})_3]\text{NO}_3$  en pocos minutos.

El ligando elegido fue el bisimidazol, ya que posee el potencial de unirse al centro de cromo gracias a sus átomos de nitrógeno y, además, la familia de los imidazoles tiene reconocida acción antimicrobiana.<sup>21</sup>

Teniendo en cuenta que este tipo de complejo es conocido por su potencial como fotosensibilizador, esta síntesis rápida y eficaz sería atractiva para la industria farmacéutica.

## **4.2 SÍNTESIS DEL COMPLEJO $[\text{Cr}(\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$**

### **4.2.1 Equipamiento**

Las reacciones bajo irradiación con microondas se realizaron en tubos cilíndricos de cuarzo ( $\phi = 1,5 \text{ cm}$ ) dentro de un reactor *Anton Paar Monowave 300* (2,455 GHz), con una potencia regulable dentro del rango de 0-300 W y una guía de onda (monomodo) equipado con un dispositivo de agitación y detectores de temperatura IR y de rubí.

Los puntos de fusión se determinaron con un aparato de punto de fusión electrotérmico 9100. Todos los compuestos se caracterizaron por técnicas espectroscópicas estándar ( $^1\text{H}$  RMN, UV, IR), y todos los datos concuerdan con las estructuras propuestas. Los espectros de  $^1\text{H}$  se registraron en DMSO- $d_6$  400 MHz con un espectrómetro *Bruker Avance II* (sonda BBI, gradiente z) ( $^1\text{H}$  en 400,16 MHz y  $^{13}\text{C}$  en 100,56 MHz). Los espectros se midieron a 22 °C.

Los espectros de absorción de las soluciones se registraron con un espectrofotómetro *UV-1601 Agilent 8243* con detector DAD, usando una celda de cuarzo con una longitud de paso óptico de 1 cm y acetonitrilo como disolvente.

Los espectros infrarrojos se registraron en fase sólida con un espectrómetro *Bruker IFS FTIR 28v*, con una resolución de  $2\text{ cm}^{-1}$  en el intervalo de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  mediante el uso de discos de KBr.

#### 4.2.2 Materiales y metodología

El anhídrido  $\text{CrCl}_3$  se obtuvo de  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  con cloruro de tionilo. El 2,2' bismidazol fue adquirido de MP Biomedicals y de  $\text{AgNO}_3$  de Tauro, ambos en grado analítico. Todos los disolventes orgánicos para la síntesis fueron de calidad HPLC y se destilaron bajo atmósfera de nitrógeno justo antes de su uso.

#### 4.2.3 Síntesis de $\text{CrCl}_3 \cdot \text{THF}_3$

La sal  $\text{CrCl}_3$  anhidra (1,00g, 6,31 mmol) se disolvió con suficiente tetrahidrofurano (THF) en un matraz redondo de vidrio previamente seco. El procedimiento se llevó a cabo enteramente en el interior de una *glove box* (construida *ad hoc* ANEXO) bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  debido a la reactividad del  $\text{CrCl}_3$  con la humedad del aire. Después de secar el producto al vacío, se obtuvo un polvo de color púrpura (2,34g, 99% de rendimiento) lo suficientemente puro (Foto 4a). Este nuevo método permite obtener el sólido con rendimiento muy bueno y es considerablemente más fácil y más rápido que el reportado previamente.<sup>22</sup> PF: (142,8 – 142,9)°C. IR (KBr): 1042, 1018, 855  $\text{cm}^{-1}$ .  $\epsilon_{680\text{nm}}$  en THF:  $41211\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$   $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, acetona- $d_6$ ): 3.59 (s, señal ancha, 4H); 1.80 (s, señal ancha, 4H).

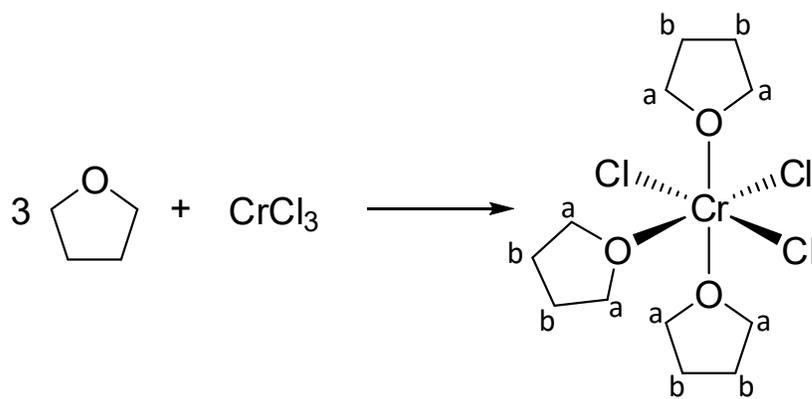


Figura 4a. Síntesis de  $\text{CrCl}_3 \cdot \text{THF}_3$

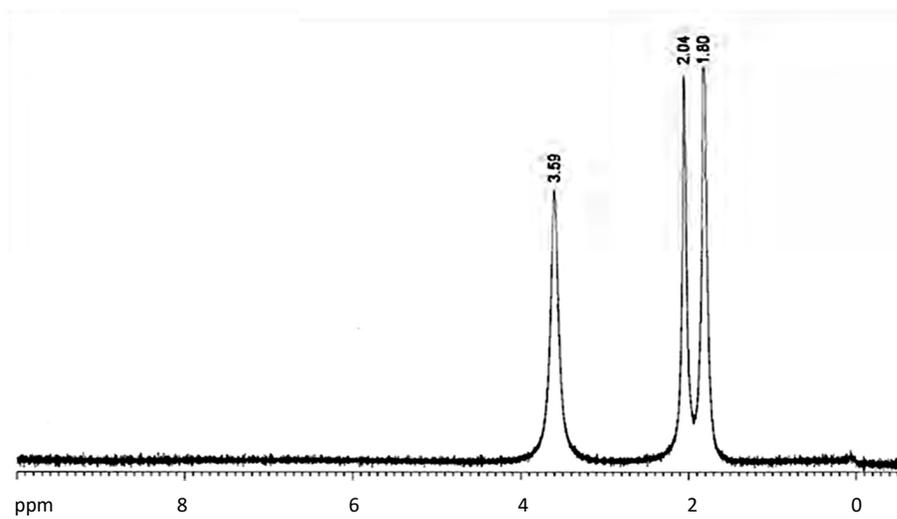


Figura 4b. Espectro  $^1\text{H-NMR}$  de  $[\text{CrCl}_3(\text{THF})_3]$  en acetona- $d_6$



Foto 4a. Sólido anhidro  $[\text{CrCl}_3(\text{THF})_3]$

#### 4.2.4 Síntesis de $\text{Ag}(2,2' \text{ bisimidazol})\text{NO}_3$

La síntesis se lleva a cabo utilizando un reactor de microondas con una potencia fijada en 300 W. Sólo 90 s a 95 ° C son necesarios para completar la reacción entre el 2,2' bisimidazol (70 mg, 0,52mmoles) y nitrato de plata (340 mg, 2mmoles) en ácido nítrico 0,1 M 4 ml. Esta reacción no necesita de un solvente adicional, lo que la convierte en una alternativa ecológica. De hecho, la función primaria de disolventes en la síntesis química clásica es la de facilitar la transferencia de masa para modular las reacciones químicas en términos de velocidad de reacción, los rendimientos, las conversiones y selectividad; sin embargo, después de la reacción, el producto final tiene que ser separado del disolvente a través de medios que consumen mucha energía y producen -por lo general- desechos indeseados. Este tipo de reacción, que protege el medio ambiente, es denominada *green chemistry reaction*. Después de la evaporación de la solución se formaron cristales columnares marrones-dorados (Foto 4b] (390 mg, rendimiento 95%) El análisis espectral concuerda con la literatura.<sup>23, 24</sup>  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 7,06 (s, señal ancha, 4H); 12,65 (s, señal ancha, 2H). IR (KBr): 3149, 3131, 2938, 1383  $\text{cm}^{-1}$ .

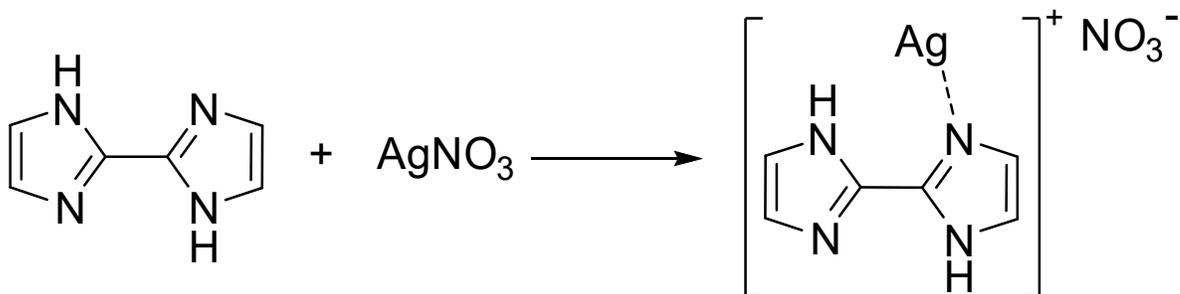


Figura 4c. Síntesis de  $\text{Ag}(2,2'\text{bisimidazol})\text{NO}_3$

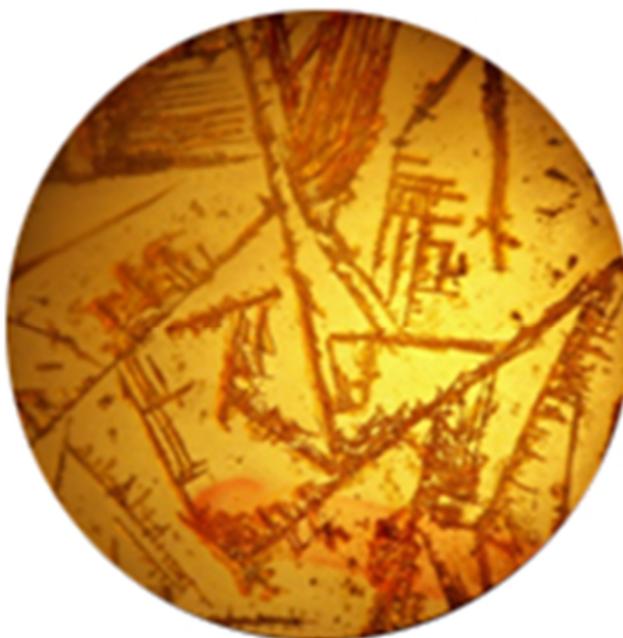


Foto 4b. Cristales de  $\text{Ag}(2,2'\text{bisimidazol})\text{NO}_3$  (2x).

#### 4.2.5 Síntesis de $[\text{Cr}(\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$ (A)

Los precursores se mezclaron en metanol en reflujo por 3 h. Luego la mezcla se enfrió y se filtró el  $\text{AgCl}$ . El producto resultante se concentró y se llevó a  $4^\circ\text{C}$ . A las 48 h se depositaron los cristales deseados.

#### 4.2.6 Síntesis de $[\text{Cr}(\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$ (B)

El precursor  $\text{CrCl}_3 \cdot \text{THF}_3$  (32 mg, 0,08mmol) se mezcló con la sal  $\text{Ag}(2,2' \text{ bisimidazol})\text{NO}_3$  (78 mg, 0,25mmol) en 10 ml de tetrahidrofurano. A continuación, la mezcla se irradió durante 90 s después de ajustar la temperatura de reacción a  $110^\circ \text{C}$  y la potencia en 300 W. Una gran cantidad de precipitado blanco que se observa de inmediato debido a la formación de  $\text{AgCl}$ . Después de la filtración y concentración, se obtuvieron cristales blancuzcos (Foto 4c). (48 mg, rendimiento del 94%)



Foto 4c. Precipitado de  $[\text{Cr}(\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$

#### 4.3 DISCUSIÓN

En la síntesis de  $\text{CrCl}_3 \cdot \text{THF}_3$  todo el material de vidrio y el disolvente deben ser cuidadosamente secados. De lo contrario, se forma la sal de Cr (III), se hidrata y el tetrahidrofurano no puede desplazar las moléculas de agua una vez que se coordinan.

Se probó el método descrito anteriormente para la preparación de  $[\text{Cr}(\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$  utilizando metanol como disolvente.<sup>22</sup> Sin embargo, todos los intentos para llevar a cabo la cristalización o precipitación del complejo fracasaron. Después del análisis de las condiciones de reacción (disolvente, temperatura, etc.) se propone que el problema es la acidez del medio, que

aumenta a medida que transcurre el tiempo (Figura 4d, ruta A). Esto ocurre porque en ese método se utiliza metanol como disolvente; entonces, cuando la reacción se calienta, se forma HCl y esto evita la cristalización del complejo. Este hecho indicaría que el mecanismo de coordinación no se ve favorecido en presencia de H<sup>+</sup>. A medida que transcurre el tiempo, la acidez del medio aumenta y se protona tanto la pequeña cantidad de complejo formado como el 2,2' bisimidazol, el cual no sería capaz de coordinar con el centro de metal. La neutralización del crudo de reacción con unas gotas de solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, nos permite obtener el compuesto cristalizado deseado.

Este hallazgo sugiere que realizar la reacción directamente en THF seco sería más favorable. Cuando se emplea THF, cristales blancos de [Cr(biim)<sub>3</sub>](NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> se depositan después de la concentración y la evaporación del crudo obtenido (Figura 4d, ruta B).

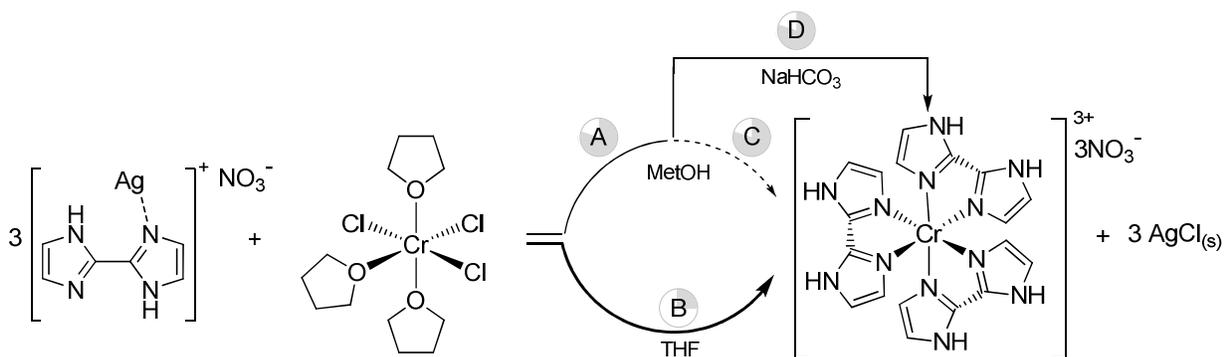


Figura 4d. Síntesis de [Cr(biim)<sub>3</sub>](NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> realizadas a reflujo (A) en el reactor de microondas(B).

Las condiciones de reacción óptimas fueron seleccionadas después de probar diferentes tiempos y temperaturas para la irradiación con microondas (Figura 4e). Este experimento determina que la reacción alcanza su máximo rendimiento después de 90 s a 110 ° C. Es evidente que un aumento en la temperatura por encima de 110 ° C no es adecuado ya que el rendimiento

parece disminuir, posiblemente por la degradación de los precursores y la aparición de otros productos.

El espectro infrarrojo de  $[\text{Cr}(\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$  concuerda con el de la literatura.<sup>22</sup> IR (KBr): 3129, 3000 1788, 1614, 1383, 1246, 1193, 1138, 1102, 1036, 1009, 960, 943, 9224, 875, 815, 837, 763, 739, 701, 624, 539, 451  $\text{cm}^{-1}$ . (Tabla 4a)

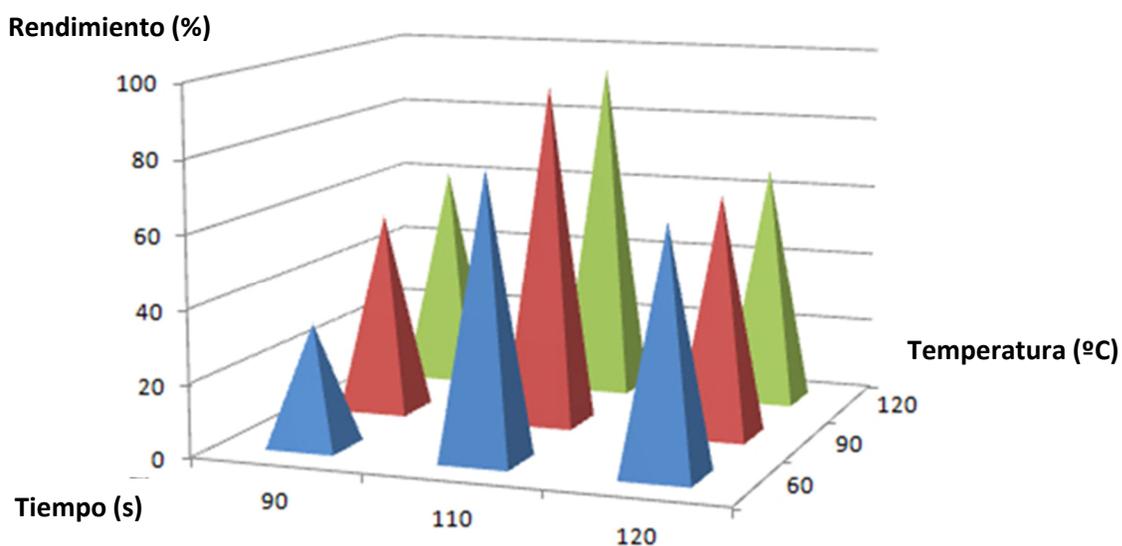


Figura 4e. Rendimiento de síntesis de  $[\text{Cr}(\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$  en diferentes condiciones.

El espectro de RMN de 2, 2' bisimidazol muestra las señales esperadas en  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 7,07 (s, señal ancha, 4H); 12,65 (s, señal ancha, 2H). Estas resonancias del bisimidazol libre se ensanchan después de la coordinación del centro de Cr (III) (Figura 4f). Como era de esperar, también hay una mayor cantidad de THF libre una vez que la reacción de sustitución se lleva a cabo.<sup>25</sup>

Tabla 4a. Datos IR del ligando 2, 2' bisimidazol (H<sub>2</sub>biim) y del complejo [Cr(H<sub>2</sub>biim)<sub>3</sub>](NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>

	H <sub>2</sub> biim	[Cr(H <sub>2</sub> biim) <sub>3</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
v(C-H)	3142 w	
v(C-H)	3112 w	3129 w
v(N-H)	~2900 s, br	3000 s,br
	1740 w, br	1788 m
	1680 w, br	1614 m
R	1545 s	enmascarada
R	1435 m	enmascarada
v <sub>3</sub> (NO <sub>3</sub> )		1383 vs, br
R	1405 s	enmascarada
R	1333 s	enmascarada
		1246 w
C2-C2'	1215 s	1193 s
R	1142 vw	1138 s
δ (C,N-H)	1104 s	1102 m
δ (C,N-H)	1028 vw	1009 m
δ (C,N-H)	939 s	960 vw, 943 vw
R	915 w	924 vw
R	886 s, br	875 w
γ(N-H)	827 w	815 w
v <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> )		837 m
γ(C-H)	763 m	763 s
γ(C-H)	746 s 736 m	739 m,sh
R	689 s	701 s
R	616 vw	624 vw
deformación de anillo		539 m,br
deformación de anillo		451 m

Además, se secó una nueva porción del sólido recristalizado y se disolvió en DMSO- $d_6$  para realizar un espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN (Figura 4g). No se observaron evidencias del ligando (2,2'-bisimidazol) ni del THF libre; esto es importante porque es un indicio fuerte de la coordinación del 2,2'-bisimidazol. Brennan *et al.* (2009) también llegan a esta importante conclusión en la síntesis de compuestos similares <sup>25</sup>

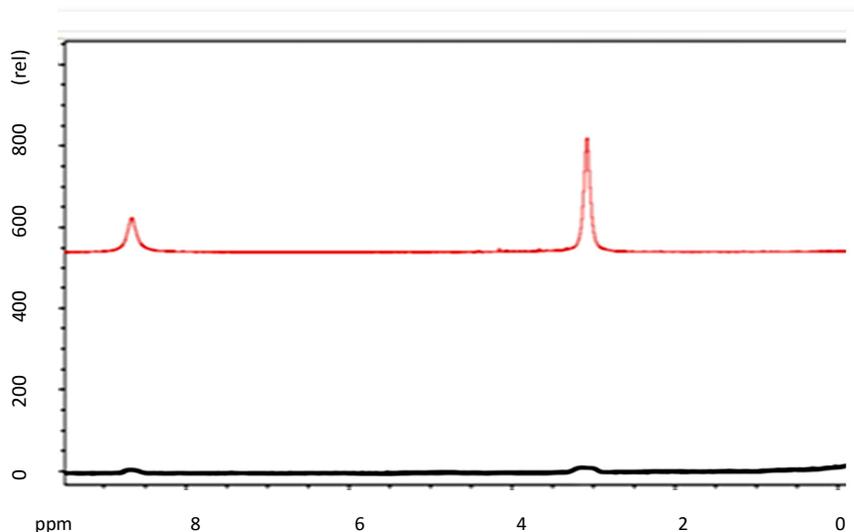


Figura 4f. Espectro RMN del ligando libre 2,2'-bisimidazol (arriba) y de  $[\text{Cr}(\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$  (abajo).

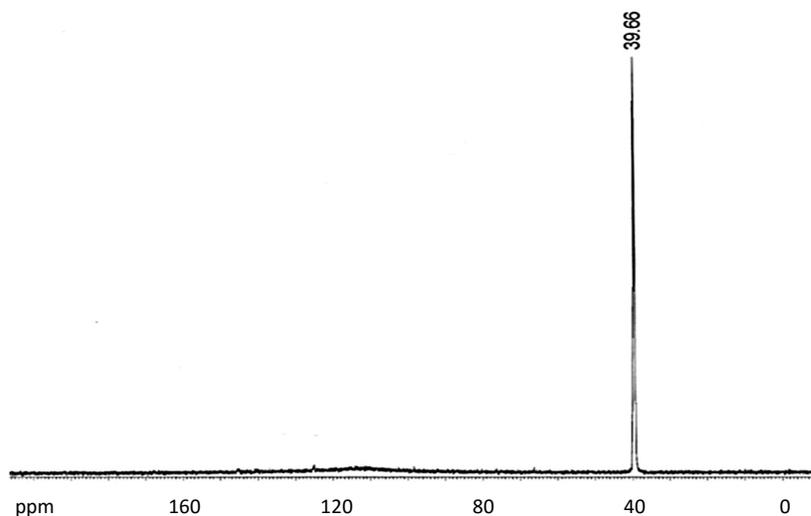


Figura 4g. Espectro  $^{13}\text{C}$ -NMR del complejo final disuelto en DMSO- $d_6$ .

El espectro electrónico del  $[\text{Cr}(\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$  muestra evidencia de las transiciones internas del 2,2' bisimidazol: 275, 283, 288 y 296 nm y del Cr (III) coordinado: 340 nm. Los coeficientes de absorción determinados en DMSO 10 % son los siguientes:  $\epsilon_{275\text{nm}} = 52315 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{340\text{nm}} = 29381 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (ANEXO)

El análisis de rayos X que presentan Gruia *et al.* (2006)<sup>22</sup> para el complejo en cuestión, sugiere que su estructura es muy cercana a la del  $\text{Ru}(\text{Hbiim})_3$  descrita por Tadokoro *et al.* (2002).<sup>26</sup> Esta estructura es de gran interés porque puede servir como “bloque” para la construcción de cadenas o redes tipo “*honeycomb sheets*” útiles para la conducción de energía. El centro de Cr (III) es particularmente atractivo para el desarrollo de compuestos magnéticos que tienen muchas aplicaciones en el campo de la ciencia de los materiales, y debido a su configuración  $d_3$  podría acoplarse a otros iones metálicos paramagnéticos para producir imanes moleculares.

### CONCLUSIONES PARCIALES

- *Se describió un método sencillo para preparar  $\text{CrCl}_3 \cdot 3\text{THF}$ . Es una síntesis de un paso y no requiere la utilización de un Soxhlet. Esto es importante debido a que es un precursor de uso común en la síntesis de varios complejos del Cr (III).*<sup>27</sup>
- *La síntesis del  $\text{Ag}(2,2'\text{-bisimidazol})\text{NO}_3$  también se ha optimizado para ser llevada a cabo utilizando un reactor de microondas para que sea más simple y rápida.*
- *Se propuso un nuevo procedimiento que permite sintetizar un complejo polipiridínico del Cr (III), el  $[\text{Cr}(\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$ , en unos pocos minutos. Este es un avance importante en la búsqueda de fotosensibilizadores con potencial comercial para ser usados en PDT y PACT.*

---

### BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> Boca SC, Four M, Bonne A, van der Sanden B, Astilean S, Baldeck PL, Lemerrier G. *Chem Commun (Camb)*. 2009; 30: 4590-2
- <sup>2</sup> Schmitt F, Govindaswamy P, Zava O, Süß-Fink G, Juillerat-Jeanneret L, Therrien B. *J Biol Inorg Chem*. 2009 Jan; 1: 101-9
- <sup>3</sup> Marques J, Braga TM, Almeida Paz FA, Santos TM, de Fátima Silva Lopes M, Braga SS. *Biometals* 2009; 22: 541–556
- <sup>4</sup> Andrew Minnock, David I. Vernon, Jack Schofield, John Griffiths, J. Howard Parish and Stanley B. Brown. *J. Photochem. and Photobiol. B: Biology* 1996; 32 (3): 159-164
- <sup>5</sup> Liu Y, Hammitt R, Lutterman DA, Joyce LE, Thummel RP, Turro C. *Inorg Chem*. 2009 Jan 5; 48 (1): 375-85
- <sup>6</sup> Balasubramanian KP, Karvembu R, Prabhakaran R, Chinnusamy V, Natarajan K. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2007; 68(1): 50-4
- <sup>7</sup> Tan LF, Shen J, Chen X, Liang X. *DNA Cell Biol*. 2009; 26

- 
- <sup>8</sup> Mazumder UK, Gupta M, Karki SS, Bhattacharya S, Rathinasamy S, Sivakumar T. *Bioorg Med Chem.* 2005; 13 (20): 5766-73
- <sup>9</sup> Liu YJ, Chao H, Tan LF, Yuan YX, Wei W, Ji LN. *J Inorg Biochem.* 2005; 99 (2): 530-7
- <sup>10</sup> V. Balzani, I. Moggi. M. F. Manfrin and F. Bolletta. *Coord. Chem.* 1975; 15: 321. Review
- <sup>11</sup> Domingo M. Vera, Gustavo A. Argüello, Gerardo A. Argüello\* and Hector Gsponer. *J. Photochem. Photobiol. "A" Chem.* 1993; 76: 13
- <sup>12</sup> Héctor E. Gsponer, Gerardo A. Argüello\* and Gustavo A. Argüello. *J Chem. Educ.* 1997; 79 (8): 968
- <sup>13</sup> G. Ferraudi, Gerardo A. Argüello, and M. Frink. *J. Phys. Chem.* 1987; 91: 64
- <sup>14</sup> Daniela Pagliero and Gerardo A. Argüello\*, *J. Photochem. Photobiol "A" Chem.* 2001; 138: 207-211
- <sup>15</sup> G. Ferraudi and Gerardo A. Argüello *Inorg. Chem. Acta* 1988; 144: 64
- <sup>16</sup> L.S. Forster. *Chem Rev.* 1990; 90 (2): 331
- <sup>17</sup> C. Pizzocaro, M. Bolte, H. Sun and M. Z. Hoffman. *New J. Chem.* 1994; 17: 737-743
- <sup>18</sup> Garcia PF, Toneatto J, Silvero MJ, Argüello GA *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1840 (9): 2695-701
- <sup>19</sup> Toneatto J, García PF, Argüello GA *J Inorg Biochem.* 2011; 105 (10): 1299-305
- <sup>20</sup> Wancydora Kharmawphlang, Subrata Choudhury, Alok K. Deb, and Sreebrata Goswami. *Inorg. Chem.* 1995; 34 (14): 3826–3828
- <sup>21</sup> Gupta, N., & Pathak, D. P. (2011). *Indian J. of Pharmaceutical Sciences.* 2011; 73 (6): 674–678
- <sup>22</sup> Gruia LM, Rochon FD, Beauchamp AL. *Can. J. Chem.* 2006, 84: 949-959
- <sup>23</sup> Sowwan M, Abul Haj M, Faroun M, Hawash Z, Ghabboun J, Rida A, Karmi A, Sultan W, Husseini GA. *Journal of Nanomaterials* 2010; article ID 796303
- <sup>24</sup> Hester CA, Baughman RG, Collier HL. *Polyhedron* 1997; 16: 2893-2895.
- <sup>25</sup> Brennan NF "Synthesis and structural studies of N- and P- donor ligands in chromium(III) complexes" *Doctoral thesis.* University of Pretoria 2009
- <sup>26</sup> Tadokoro M, Kanna H, Kitajama T, Unamoto MS, Nakamishu N, Isobe K, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002; 99: 4950
- <sup>27</sup> King RB "Encyclopedia of inorganic chemistry" Second Edition. Volume 9. Wiley, editor. USA 2005: 897

---

## 5. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y FOTOINHIBITORIA DE $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del complejo  $[\text{Cr}(\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$ .*
- *Estudiar su potencial como FS para PACT.*
- *Evaluar la citotoxicidad del complejo frente a células eucariotas.*

### 5.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA DE $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$

La CIM del complejo fue establecida como 24 mg/mL para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, a través del método de dilución en tubos. <sup>1</sup> Los análisis se realizaron por triplicado, con los controles correspondientes. Debido a problemas en la solubilidad del mismo, se solubilizó con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

### 5.2 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FOTOINHIBITORIA DE $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$

#### METODOLOGÍA

La capacidad de fotoinhibición fue evaluada también en *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, mediante el recuento de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) en placas de agar Mueller Hinton (MH). <sup>1</sup> Las muestras no pudieron ser irradiadas en el rango del espectro visible, como se propuso, por la baja absorbancia del FS en esa área. Se empleó una fuente de LED (400 nm) construida *ad hoc*. El tiempo de irradiación óptimo fue de 10 min, al cabo de los cuales se observó la inhibición total del crecimiento bacteriano en las muestras tratadas con el fotosensibilizador en concentraciones subCIM de 12 mg/mL ( $1,75 \times 10^{-6}$  M), en contraste con aquellas a las que sólo se le adicionó buffer fosfato (PBS) como control. En paralelo, se efectuaron controles con el antibiótico de uso clínico ciprofloxacina a la concentración de 5 µg/mL y también controles de las muestras sin irradiar, a modo comparativo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

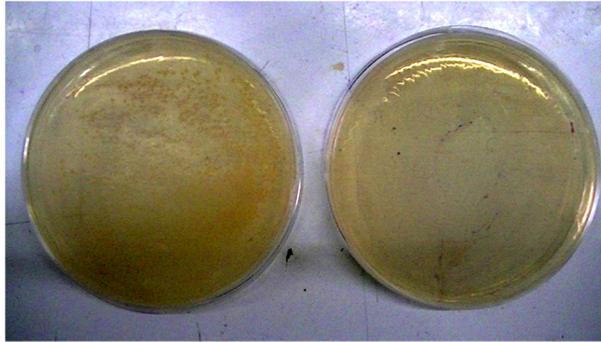


Foto 5a. Placas con *S. aureus* sin FS (izquierda) y con FS (derecha) luego de 10 min de irradiación.

Tabla 5a. UFC/mL luego de 10 min de irradiación (columnas de la derecha) y sus controles sin irradiar (columnas de la izquierda).

<i>S. aureus</i>	NO IRRADIADAS (UFC/mL)		IRRADIADAS (UFC/mL)	
[Cr(biim) <sub>3</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> 12 mg/mL	0,95 x 10 <sup>6</sup>	1,11 x 10 <sup>6</sup>	-	-
control sin antibiótico y sin NP	1,02 x 10 <sup>6</sup>	1,21 x 10 <sup>6</sup>	1,09 x 10 <sup>6</sup>	0,98 x 10 <sup>6</sup>
Ciprofloxacina 0,5µg/mL	-	-	-	-

Los análisis se realizaron por triplicado y se indica el valor promedio de los recuentos.

Los resultados demuestran que este complejo excitado puede lograr un efecto bactericida en *S. aureus*. Sin embargo, la concentración necesaria que produce la muerte bacteriana es muy elevada en comparación alantibiótico de uso clínico, ciprofloxacina. Este antibiótico fue elegido a modo de control positivo bactericida, porque Albesa *et al.* (2004) y otros ya han descrito previamente su mecanismo de acción y cómo éste se ve influenciado por la luz.<sup>3</sup> Por ejemplo, Montero *et al.* (2006) establecieron que ciprofloxacina interactúa con membranas celulares neutras y cargadas, causando formación de ERO.<sup>2</sup> A su vez, se reportó que este estrés oxidativo



Para este experimento se utilizaron fibroblastos maduros de la línea Balb/3T3 clon A31 (ATCC CCL-163 (cultivados en placas *multiwell*) los cuales fueron incubados con el complejo de interés en concentración subCIM, CIM y 2xCIM, durante 14 h. Después fueron lavados y cubiertos nuevamente con medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Por último, se agregó 20 µL del reactivo de MTS 1 M en cada *well* y se dejó reaccionar 4 h antes de proceder a la lectura a 490nm.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La viabilidad de los fibroblastos tratados con el complejo en concentraciones de hasta 500 µg/mL, no se vio afectada en comparación a los controles. Esto demuestra que el complejo no es tóxico en estas células eucariotas, incluso en concentraciones superiores a la CIM establecida; lo cual concuerda con la literatura que reporta que el Cr (III) no es nocivo, a diferencia del mismo elemento en sus otros estados de oxidación. El comportamiento y la toxicidad del cromo, depende fuertemente de la valencia, las características fisicoquímicas de las moléculas que lo contienen y la vía de exposición o administración.<sup>9, 10</sup> Por ejemplo, el Cr (III) es mal absorbido e ingresa a las células principalmente cuando forma complejos orgánicos.<sup>11</sup> Los iones cromatos con Cr (VI) son transportados a las células, mientras que los compuestos con Cr (III) entran en las células mediante difusión pasiva. En los mamíferos, el Cr (III) es un oligoelemento que interviene en el metabolismo de los lípidos y la glucosa.<sup>12</sup> De hecho ha sido aceptado como un elemento esencial por más de 30 años. Sin embargo, un trabajo reciente sostiene que los estudios en que se basan estas afirmaciones poseen defectos metodológicos.<sup>13</sup> En ese trabajo, los experimentos son conducidos por primera vez en condiciones libres de metal cuidadosamente controladas, y demuestran que el contenido de cromo en la dieta no tuvo efecto sobre la masa corporal, ni tampoco alteró la absorción y metabolismo de nutrientes. Del mismo modo, el contenido de cromo de la dieta no tuvo efecto sobre los niveles de glucosa. Sin embargo, en las ratas de estudio con elevado contenido de cromo en la dieta, se observó una clara tendencia hacia niveles más bajos de insulina después de una ingesta de glucosa. Los estudios revelan que una dieta privada de cromo no tuvo ningún efecto sobre la composición corporal, metabolismo de la glucosa, o la sensibilidad a la insulina en comparación con una dieta que contenga cromo en los llamados "niveles suficientes". Estos resultados indican claramente que el cromo ya no se puede

considerar un elemento esencial, ya que para serlo, su carencia debería provocar deficiencias funcionales. Pero, al mismo tiempo, confirman su inocuidad en los niveles razonables de ingesta o administración. Nuestro experimento muestra, además, que tampoco es perjudicial para células de mamíferos en concentraciones muy superiores a las necesarias para ser utilizados en PACT.

### CONCLUSIONES PARCIALES

- *La capacidad fotoinhibitoria del complejo  $[Cr(H_2biim)_3](NO_3)_3$  fue considerable y no presentó toxicidad en la oscuridad.*
- *El complejo fue biocompatible con células eucariotas en las concentraciones bactericidas.*
- *La necesidad de utilizar una fuente de irradiación de alta energía (400 nm) para excitarlo, la alta dosis requerida (12 mg/mL) y su baja solubilidad en soluciones acuosas y medios fisiológicos, desalentaron la continuidad de los estudios microbiológicos.*

---

### BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> Isenberg HD. Clinical microbiology procedures handbook. Washington, American Society for Microbiology 1992
- <sup>2</sup> Montero MT, Pijoan M, Merino-Montero S, Vinuesa T, Hernández-Borrell J. *Langmuir*. 2006; 22 (18): 7574–7578
- <sup>3</sup> Albesa i, Becerra mc, Bazán PC, Páez P. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 317 (2): 605–609
- <sup>4</sup> Becerra MC, P áez PL, Laróvere LE, Albesa I. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2006; 285 (1-2): 29–34
- <sup>5</sup> Páez PL, Becerra MC, Albesa I. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 2010; 24 (6): 771–776
- <sup>6</sup> Aiassa V, Barnes AI, Albesa I. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010; 393 (1): 84–88
- <sup>7</sup> Páez PL, Becerra MC, Albesa I. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2011; 61 (3): 467–472
- <sup>8</sup> Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual* Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, et al., editors. 2015 National Center for Advancing Translational Sciences.
- <sup>9</sup> International Programme on Chemical Safety (IPCS). Inorganic chromium (III) compounds. Concise International Chemical Assessment Document. WHO. 2006. Geneva.
- <sup>10</sup> International Programme on Chemical Safety (IPCS). Inorganic chromium (VI) compounds. Concise International Chemical Assessment Document. WHO. 2006. Geneva.
- <sup>11</sup> European Chemicals Bureau (ECB). Risk Assessment. EUR Report No. 201508. 2005. Inglaterra
- <sup>12</sup> Department for Environment Food and Rural Affairs (DEFRA) and Environment Agency (EA). Chromium. *R&D Publications TOX*. Environment Agency. 2005. Bristol.
- <sup>13</sup> Assem L, Zhu H. Institute of Environment and Health. 2007. Universidad de Cranfield

---

## 6. CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS DE COBALTO Y POTENCIAL ANTIBACTERIANO

Continuando en la búsqueda de nuevos fotosensibilizadores para Terapia Fotodinámica Antimicrobiana (PACT), se caracterizaron tres complejos de cobalto sintetizados por un grupo de investigación dirigido por el Dr. Raj Pal Sharma, en colaboración con la Universidad de Panjab – India. Los complejos eran de Co (III) y se esperaba que presenten propiedades similares al complejo de transición de Cr (III) sintetizado por el grupo. Ellos fueron:  $[\text{Co}(\text{phen})(\text{H}_2\text{biim})_2](\text{BF}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1);  $[\text{Co}(\text{phen})_2(\text{Hbiim})]\text{Cl}_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (2) y  $[\text{Co}(\text{H}_2\text{biim})_3](\text{NO}_3)_3$  (3). Donde phen = fenantrolina y Hbiim = bisimidazol.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Medir los coeficientes de absortividad molar de los complejos en solución acuosa.*
- *Evaluar la estabilidad de los complejos en agua MQ y en buffer PBS (pH 7,4)*
- *Determinar la CIM de cada complejo en cepas de referencia.*

### 6.1 ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ELECTRÓNICA

#### METODOLOGÍA

Se midieron espectros acuosos de los complejos (Figura 6a) y de los ligandos 1, 10 fenantrolina y 2, 2' bisimidazol.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observaron dos transiciones  $d-d$  ( ${}^1\text{A}_{1g} \rightarrow {}^1\text{T}_{1g}$  y  ${}^1\text{A}_{1g} \rightarrow {}^1\text{T}_{2g}$ ) características de los complejos iones que contienen Co (III) a 348, 504; 348, 472 y 381, 471 nm para ( 1 ), ( 2 ) y ( 3 ) respectivamente. Se han reportado transiciones similares en  $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{CO}_3]\text{Br} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{CO}_3](\text{pfbz}) \cdot \text{H}_2\text{O}$ .<sup>1</sup>

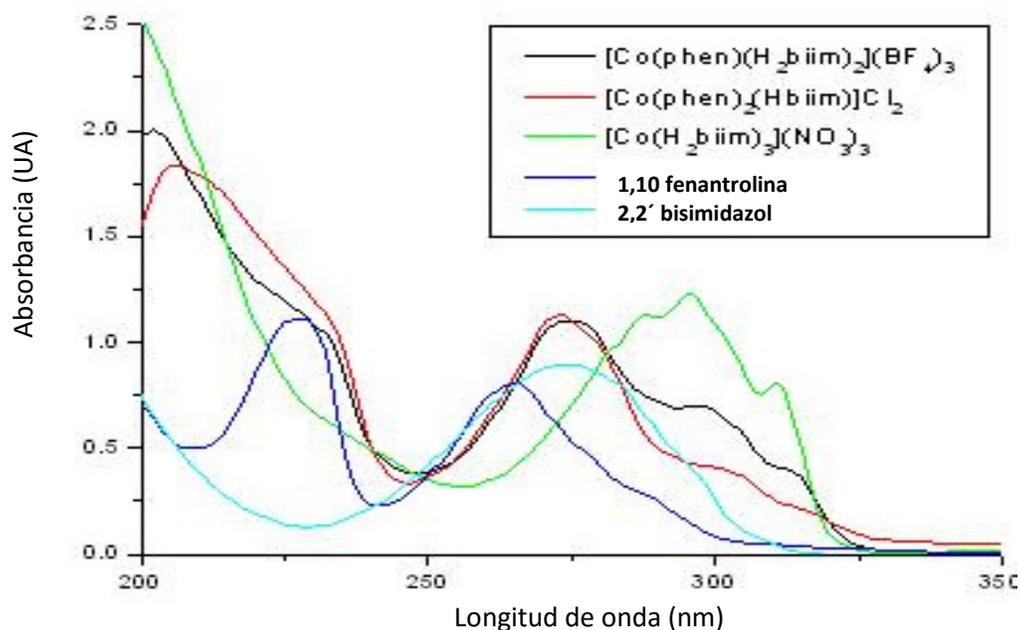


Figura 6a. Espectros de absorción de los complejos de Co (III) y de sus ligandos en agua MQ.

Se encontraron transiciones internas de la coordinación del ligando 1,10 fenantrolina a 224, 232 y 272 nm para (1) y a 227 y 272 nm para (2), en correlación con los resultados reportados para complejos similares. Por otra parte, las transiciones a 279, 296, 313; 280, 303, 317 y 287, 295 y 310 nm podrían ser asignadas a la coordinación del 2,2' bisimidazol en (1), (2) y (3) respectivamente.

Tabla 6a. Coeficientes de absorción molar ( $M^{-1} cm^{-1}$ )

Long. de onda (nm)	$[Co(phen)(H_2biim)_2]^{3+}$	$[Co(phen)_2(Hbiim)]^{2+}$	$[Co(H_2biim)_3]^{3+}$
*272/**295	*30848	*168512	**27248
337	912	4348	3057
355	489	2070	2729
457	103	118	1311

## **6.2 ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS EN AGUA MQ Y EN BUFFER PBS (pH 7,4)**

### **METODOLOGÍA**

Se evaluó la estabilidad de (1), (2) y (3) en solución acuosa y de PBS a pH fisiológico con el fin de realizar futuros experimentos microbiológicos. Para ello se midieron sistemáticamente espectros de absorción UV-visible a temperatura ambiente (20 ° C) y a temperatura corporal (37 ° C).

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Las soluciones en PBS y en agua MQ de los complejos ( $10^{-2}$  M) han demostrado ser estables durante al menos 24 h, ya que no se detectaron cambios en los espectros. Otras mediciones complementarias sugieren que son estables incluso durante períodos de tiempo más largos.

## **6.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)**

### **METODOLOGÍA**

Se determinó la CIM de los complejos (1), (2) y (3) en una cepa Gram-positiva: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) y una cepa Gram-negativa: *Escherichia coli* (ATCC 25922). Las mediciones se realizaron por triplicado en caldo Mueller Hinton (MH) con sus controles respectivos en paralelo.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los valores de CIM para los tres complejos (Tabla 6b) son elevados en comparación a un antibiótico de uso clínico (CIM ciprofloxacina: 5 µg/mL). Lo cual indicaría que las dosis que se necesitan administrar al organismo superan las deseadas para un nuevo fármaco. Además, se nota que el ligando 1,10-fenantrolina no posee actividad antibacteriana por sí mismo, como fue establecido por nuestro grupo con anterioridad.<sup>2</sup>

Tabla 6b. Valores CIM (mg/mL)

Complejo/ligando	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
[Co(phen)(H <sub>2</sub> biim) <sub>2</sub> ](BF <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3,6	3,6
[Co(phen) <sub>2</sub> (Hbiim)]Cl <sub>2</sub> ·10H <sub>2</sub> O	5,3	2,2
[Co(Hbiim) <sub>3</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	inestable	inestable
1,10-Fenantrolina	sin actividad	sin actividad
2, 2' bisimidazol	insoluble	insoluble

Los ensayos se realizaron por triplicado.

En la naturaleza hay pocos ejemplos de complejos de cobalto con actividad biológica; quizás uno de los únicos, pero sumamente relevante para los mamíferos, sea la vitamina B<sub>12</sub>.<sup>3</sup> Sin embargo, un complejo de cobalto sintético ha demostrado ser particularmente útil en medicina. Por ejemplo, en 1998, Epstein y sus colaboradores informaron que un complejo de Co (III) con el ligando 2-metilimidazol fue eficaz en el tratamiento de la queratitis herpética epitelial, una de las principales causas de ceguera en las naciones industriales, en dosis de 5 mg/mL.<sup>4</sup> Una década más tarde, uno con acetato coordinado, fue efectivo en la inhibición del crecimiento de *Bacillus subtilis*.<sup>5</sup> Al mismo tiempo, otro complejo con el ligando bidentado de nitrógeno bis[N-(2,6-diisopropilfenil)imino]acenafteno presentó actividad frente a *S. aureus* y *E. coli* en concentraciones de 4 mg/mL.<sup>6</sup> Los autores notaron que la actividad antibacteriana fue dependiente de los derivados N-bisiminos, los cuales incrementan la lipofilicidad relativa de la molécula, lo que aumentaría la penetración del complejo en las membranas celulares. La quelación del catión metálico reduce la polaridad del ión debido al solapamiento de los orbitales del ligando con los del metal, resultando en la deslocalización de cargas positivas.

La coordinación de los mismos ligandos N-bisiminos con Co (II) en lugar de Co (III) no tuvieron efecto sobre el potencial antibacteriano, sosteniendo la hipótesis de que la cubierta hidrofóbica del centro metálico es la principal responsable de la bioactividad. En el presente estudio, la actividad antibacteriana se atribuye también a la quelación del metal, en este caso con ligando polipiridínicos (fenantrolina y bisimidazol).

### CONCLUSIONES PARCIALES

- *Los coeficientes de absorción molar medidos no favorecen su utilización como FS. Éstos tendrían que ser mayores a longitudes de onda en el rango del espectro visible, que es la sección de radiaciones electromagnéticas que podría ser utilizada en PACT.*
- *La estabilidad de los complejos fue aceptable en agua MQ y PBS. Sin embargo, el complejo (3) no fue lo suficientemente estable en el medio de cultivo MH y precipitó, por lo cual no se pudo avanzar con otros ensayos microbiológicos.*
- *Los valores de CIM para (1) y (2) resultaron demasiado altos (Tabla 6b) para ser empleados en PACT sin causar posibles daños colaterales en el organismo.*
- *Estos resultados mostraron bajo potencial de estos complejos como fotosensibilizadores, por lo cual no se profundizó en su estudio.*

---

### BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> Toneatto J, Lorenzatti G, Cabanillas AM, Argüello GA. *J. Inorg . Biochem.* 2010; 104 (7): 697-703
- <sup>2</sup> Páez PL, Bongiovanni ME, Bazán CM, Albasa I, Becerra MC, Argüello GA . RICIFA - Córdoba, Argentina 2010
- <sup>3</sup> Giedyk M, Goliszewska K, Gryko D. Vitamin B12 catalysed reactions. *Chem Soc.* 2015; 44 (11): 3391-404. *Review*
- <sup>4</sup> Asbell PA, Epstein S.P, Wallace JA, Epstein D, Stewart CC, Burger RM. *Cornea* 1998; 17: 550–557
- <sup>5</sup> Kaya M, Yenikaya C, Colak AT, Colak F. *Russ. J. Gen. Chem.* 2008; 78: 1808–1815
- <sup>6</sup> El-Ayaan U, Abdel-Aziz AAM. *Eur. J. Med. Chem.* 2005; 40: 1214–1221

---

## **7. NANOPARTÍCULAS COMO FOTOSENSIBILIZADORES PARA PACT**

### **7.1 APLICACIONES BIOLÓGICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS**

Cada vez que en la comunidad científica se aísla o sintetiza un nuevo tipo de compuesto, se testean sus posibles beneficios en el área de la salud. Pero no siempre se realizó un exhaustivo análisis previo a su aplicación; algunos de ellos fueron utilizados durante varios años sin conocer en detalle sus interacciones bioquímicas, dando lugar a efectos colaterales no deseados. Este es el caso del uso indiscriminado del radio, a principios de siglo XX para tratar el cáncer y las infecciones <sup>1</sup> y también del uso de la lámpara Fielsen para curar casos de lupus, en los principios de la fototerapia. <sup>2</sup>

Siguiendo esta tendencia, con el auge de la nanotecnología, nuevos nanomateriales se han probado para su utilización en biología. <sup>3</sup> Sin embargo, sólo algunos de ellos son particularmente interesantes como terapia alternativa contra las bacterias resistentes a los antibióticos, un problema de salud importante en la actualidad. <sup>4,5</sup> Para citar sólo un ejemplo, se puede mencionar a las nanopartículas de plata que se han estudiado como una alternativa eficaz contra *biofilms*, una capa delgada y resistente de microorganismos. En la última década se han publicado diversos artículos sugiriendo que la PACT podría beneficiarse en gran medida de estos nanocompuestos, ya que algunos presentan una interacción especial con la luz. Este es el caso de las nanopartículas de oro, que una vez que son excitadas en la longitud de onda de absorción de resonancia de su plasmón se convierten en potenciales antimicrobianos contra cepas clínicas Gram-negativas y Gram-positivas. <sup>6</sup> Sin embargo, la falta de acuerdo en la descripción del mecanismo de acción de estos prometedores nano-fotosensibilizadores (NFS) está demorando el desarrollo de PACT como una herramienta clínica confiable. <sup>7,8</sup> Por lo tanto, son necesarios experimentos que permitan comprender mejor la interacción de nanopartículas y la membrana de células procariontas, su rol en la inactivación bacteriana y su toxicidad.

### **7.2 NANOPARTÍCULAS DE ORO**

Es un hecho conocido que las nanopartículas de oro en solución, según su forma y tamaño, pueden ser de diversos colores. Sin embargo, las AuNP nunca presentan el brillo dorado

característico del metal macroscópico; lo que es sin dudas brillante, es su futuro en la ciencia. De hecho, actualmente el mercado global de los nanomateriales se estima en 11 millones de toneladas, con un valor de 20.000 millones de euros. Es más, a lo largo del año 2015 los productos a base de nanotecnología alcanzaron un volumen global de 2 trillones de euros (Comisión Europea (CE) 2011), lo que demuestra que se trata de un sector en pleno desarrollo. Esto se debe a que las propiedades exhibidas por los nanomateriales son muy diferentes a la de esos mismos materiales en su escala convencional. <sup>9</sup>

Mucho se ha avanzado desde la primera vez que fueron usadas, en la Edad Media para colorear vitrales, cuando ni siquiera se las conocía. Si bien en el siglo XX han sido regularmente empleadas para la tinción por contraste en microscopía electrónica, el desarrollo de productos elaborados a partir de nanomateriales ha ido en abrupto ascenso en los últimos años. <sup>10</sup> Se han descrito numerosas aplicaciones de nanopartículas metálicas en la elaboración de productos de consumo masivo como filtros UV en cremas solares o telas para vestimenta, baterías de litio y paneles solares entre otras. Pero uno de los campos que más puede ser beneficiado por las AuNP es el de la salud. Se han descrito diversas terapias anti-tumorales (The Project on Emerging Nanotechnologies 2012) y por otro lado se ha incursionado en el uso de las AuNP como fármacos o *carriers* de drogas.

Aunque pueda parecerlo, la utilización de oro con fines médicos no es nueva, sino que se remonta a la antigüedad, existiendo constatación de la utilización de oro coloidal en China en el año 2500 antes de Cristo. El descubrimiento por Robert Koch del efecto bacteriostático del cianuro de oro frente al bacilo de la tuberculosis, marca el comienzo de su utilización en la medicina moderna siendo introducido en la terapia de la tuberculosis en 1920. Hoy en día, las nanopartículas de oro destacan especialmente por sus propiedades fototerapéuticas. Al ser irradiadas en la longitud de onda capaz de excitar su plasmón, las AuNP se “activan” y desprenden calor siendo muy útiles en causar la muerte a células que se encuentren cercanas, tanto procariontas como eucariotas según el caso. <sup>10</sup>

A pesar de sus múltiples aplicaciones, actualmente en Europa no existe legislación específica sobre el uso de las AuNP ni de otro tipo de nanopartículas, aunque por ejemplo en Europa éstas entran dentro de la definición de “sustancia” incluida en la Regulación Europea de

Sustancias Químicas (REACH).<sup>11</sup> En mayo de 2011, y en respuesta a una petición de la Comisión Europea, la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA) publicó la primera guía práctica para la evaluación del riesgo de la nanotecnología en alimentos y piensos. Esta guía contiene los procedimientos estandarizados necesarios para la caracterización física, química y toxicológica de los nanomateriales sujetos a evaluación en vista a su posible autorización. En 2012, la EFSA publicó el informe anual de la red de trabajo sobre la evaluación de riesgos de la nanotecnología en alimentos y salud, con el fin de profundizar en la armonización de la evaluación del riesgo asociado a la nanotecnología en la Unión Europea (Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA) 2012). No obstante, el proceso de normalización de esta tecnología se encuentra aún en una fase de recopilación de datos; en la actualidad no es posible una evaluación consensuada de riesgo para el uso de las nanotecnologías en el ámbito de la salud pública y la industria. Los resultados del proceso de evaluación determinarán las medidas de gestión necesarias que deberán implementar los organismos internacionales. Por el momento, es recomendable evaluar la toxicidad de cada tipo de AuNP de forma independiente ya que los efectos biológicos pueden variar según el método con que se las obtenga. Es por esto, que en la presente tesis se estudió *in vitro* la citotoxicidad de todas aquellas que mostraron potencial antibacteriano. Éste es el primer paso en el análisis de la biocompatibilidad de estos nuevos materiales, siendo necesarios posteriores experimentos *in vivo* para asegurar su inocuidad.

Como se mencionó previamente, las propiedades de las AuNP varían según su tamaño, forma y método de síntesis, ya que éste último determinará casi siempre el entorno inmediato a la nanopartícula. En algunos casos las sustancias usadas para reducir el Au<sup>3+</sup> a Au<sup>0</sup> permanecen unidas, aunque débilmente, a su superficie. Entonces, éstas pasan a formar parte del nanoestructurado, e intervienen también en las reacciones y efectos causadas por las AuNP en su entorno. En otros, las nanopartículas son recubiertas de forma adrede con moléculas que sirven como estabilizadoras y/o que otorgan especificidad en las interacciones biológicas buscadas.

En esta tesis se presentan diversos métodos de síntesis de AuNP, pero en todos ellos las moléculas circundantes son muy pequeñas; de lo contrario, el efecto fototérmico que se pretende lograr al irradiarlas se vería disminuido.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Síntesis de nanopartículas de oro coloidales por diferentes vías para ser evaluadas como posibles FS, ya que poseen fuerte absorbanza en el rango visible del espectro.*
- *Caracterización de las AuNP por TEM y espectrofotometría.*
- *Evaluación de la capacidad fotoinhibitoria de las AuNP frente a cepas bacterianas de referencia y clínicas.*

## 7.3 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AuNP

### 7.3.1 Síntesis de AuNP por tres métodos diferentes

Dos tipos de nanopartículas se obtuvieron mediante la reducción de  $\text{HAuCl}_4$  (Sigma Aldrich) con sales de sodio. El primero (A-AuNP) se sintetizó según el método Turkevich empleando citrato de sodio como agente reductor y estabilizante, y el segundo (B-AuNP) se obtuvo usando  $\text{NaBH}_4$ .<sup>12</sup>

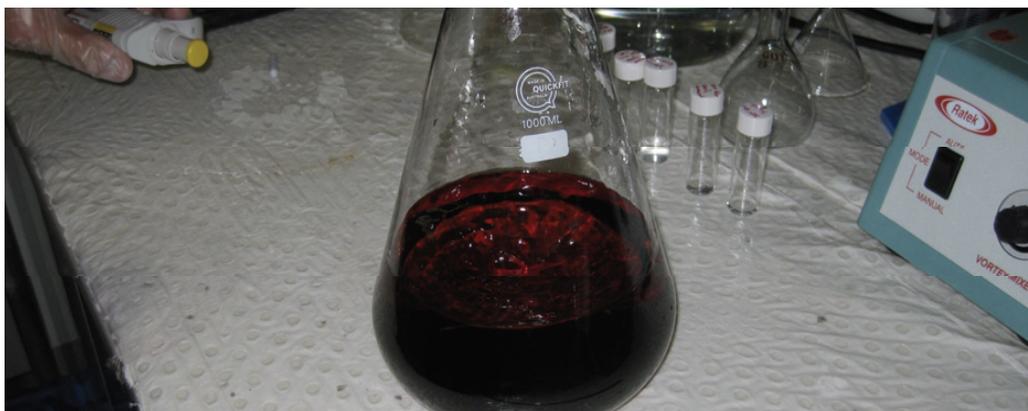


Foto 7a. A-AuNP acuosas obtenidas mediante el método de Turkevich.

Por otra parte, otro tipo de nanopartículas de oro (C-AuNP) se obtuvieron a través de una reacción (Figura 7a) iniciada fotoquímicamente que consiste en la irradiación de una solución de  $\text{Au}^{3+}$  e Irgacure 2959 con lámparas UV durante 30 min.<sup>13</sup>



### 7.3.2 Microscopía de transmisión electrónica (TEM) de AuNP

La estructura y tamaño de las AuNP fue establecido mediante imágenes de TEM analizadas con el software *J image*.

Para obtener la concentración conveniente para la técnica, se depositaron 2 gotas de las nanopartículas coloidales sobre el *grid*, dejando secar adecuadamente entre cada una.

Las imágenes tomadas muestran que los 3 tipos de nanopartículas (A-AuNP, B-AuNP y C-AuNP) son esféricas y con un tamaño promedio de aproximadamente 14 nm.

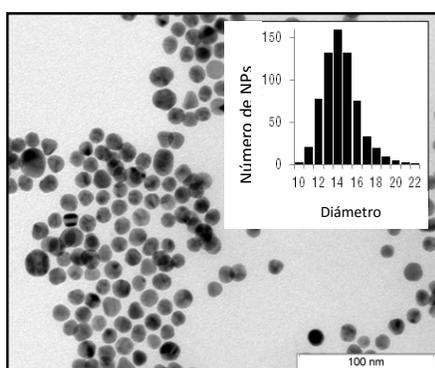


Figura 7b. Imagen TEM de A-AuNP con inserto de histograma en la esquina superior derecha.

### 7.3.3 Espectros UV-vis de AuNP

Los tres tipos de AuNP sintetizados (A-AuNP, B-AuNP y C-AuNP), mostraron una fuerte banda de absorción en la región verde del espectro visible debido a la resonancia del plasmón (Figura 7c). Este efecto en la superficie de las nanopartículas se produce por el movimiento libre de los electrones superficiales. La absorción del plasmón está directamente relacionada con el tamaño y la forma de las nanopartículas en solución coloidal. Es por ello que mediante espectrometría de absorción se pudo determinar que las partículas eran esféricas y monodispersas (en concordancia con el análisis por SEM). Tomando espectros a lo largo de un mes, se observó que las AuNP resultaron estables, ya que sus tamaños y formas se mantuvieron constantes aún después de 30 días de realizada la síntesis.

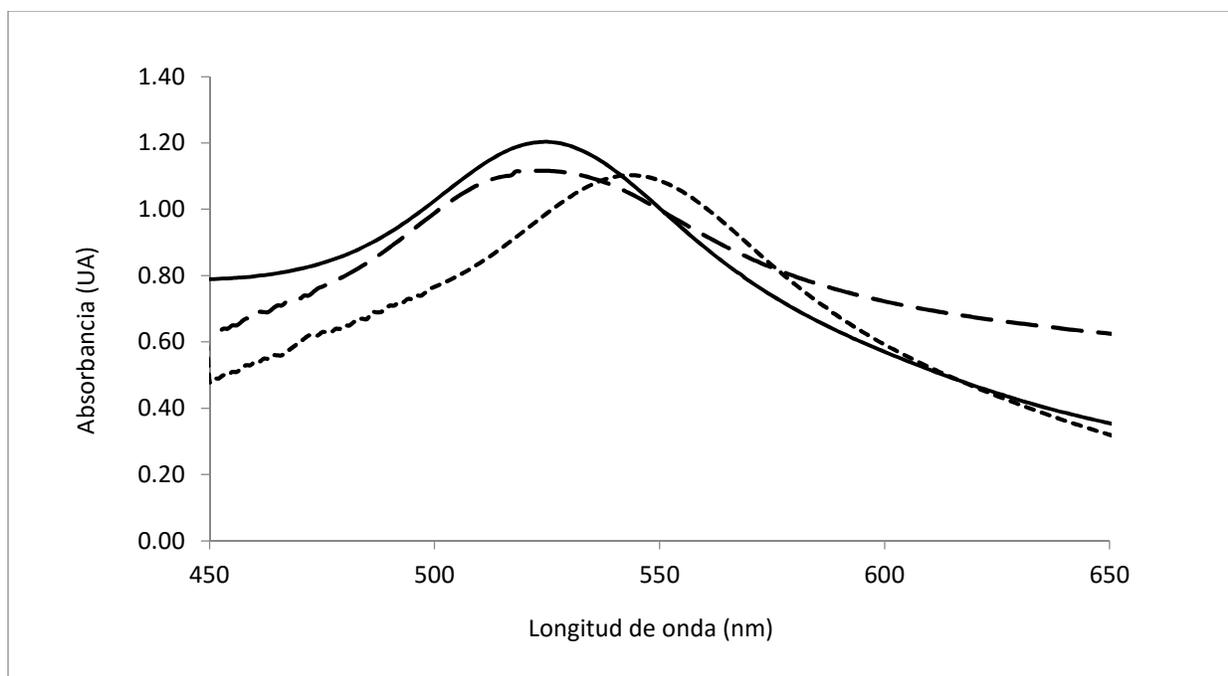


Figura 7c. Espectros de absorción electrónica de soluciones acuosas (0,1 mM) de A-AuNP (—), B-AuNP (---), C-AuNP (---)

La concentración molar de las nanopartículas fue calculada a partir de la correlación directa entre la absorción de resonancia del plasmón con su tamaño y forma.<sup>14, 15</sup>

#### 7.4 CAPACIDAD ANTIBACTERIANA DE AuNP SIN IRRADIAR

##### METODOLOGÍA

Se evaluó la capacidad inhibitoria de las tres diferentes AuNP (sin irradiar) frente a una cepa de referencia (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213) y otra cepa resistente a antibióticos (*Escherichia coli* ATCC 35218 productora de BLEE), empleando el método de los cilindros. Para ello, alícuotas de inóculo bacteriano (20 mL,  $10^6$  UFC/ml) fueron sembradas y esparcidas en forma de césped en una placa de Petri con agar Mueller Hinton (MH).

Luego, se introdujeron los cilindros en el agar sin tocar la base de la placa. En cada cilindro se colocaron 100  $\mu$ L de a) 2 M de A-AuNP, b) 2 M de B-AuNP, c) 2 M de C-AuNP d)  $2 \times 10^{-2}$  M de A-AuNP, e)  $2 \times 10^{-2}$  M de B-AuNP y f)  $2 \times 10^{-3}$  M de C-AuNP.

Las muestras se sembraron por triplicado y se usó PBS y ciprofloxacina (5  $\mu$ g/ml) como controles. Finalmente las placas se incubaron a 37  $^{\circ}$ C por 24 h.

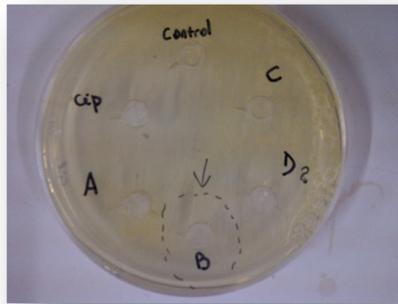


Foto 7b. Una de las placas con los cilindros luego de ser incubada.

## RESULTADOS

Ninguna de las AuNP mostró actividad inhibitoria contra *S. aureus* o *E. coli* en concentraciones de hasta 2 mM sin ser irradiadas.

Las B-AuNP fueron seleccionadas para realizar los posteriores análisis microbiológicos porque eran las que más fácilmente se podían obtener en la concentración requerida y presentaban mayor estabilidad en comparación a A-AuNP o C-AuNP.

## 7.5 MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA (TEM) EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

### METODOLOGÍA

Suspensiones de *S. aureus* ATCC 29213 y de *E. coli* ATCC 35218 (10 ml,  $10^6$  UFC/mL) fueron incubadas con B-AuNP (10 mL, 2 mM) por 1 h en la oscuridad a 37 °C y luego centrifugadas por 15 minutos a 1000 rpm. A continuación, el *pellet* resultante fue fijado con una solución de glutaraldehído (2 %) y formaldehído (4 %) en buffer cacodilato (0.1 M) por 2 h a temperatura ambiente. Luego, cada muestra fue post-fijada con tetróxido de osmio (1%) en el mismo buffer, deshidratada y embebida en Araldita. Posteriormente, se cortaron secciones delgadas con una navaja de diamante empleando un ultramicrotomo JEOL JUM-7, las cuales fueron luego montadas en *grids* de nickel y examinadas en microscopio electrónico Zeiss LEO 906E. Para este

estudio se seleccionó una concentración correspondiente a 2 mM, la cual en ensayos previos demostró que presentaba mayor actividad antimicrobiana.

## RESULTADOS

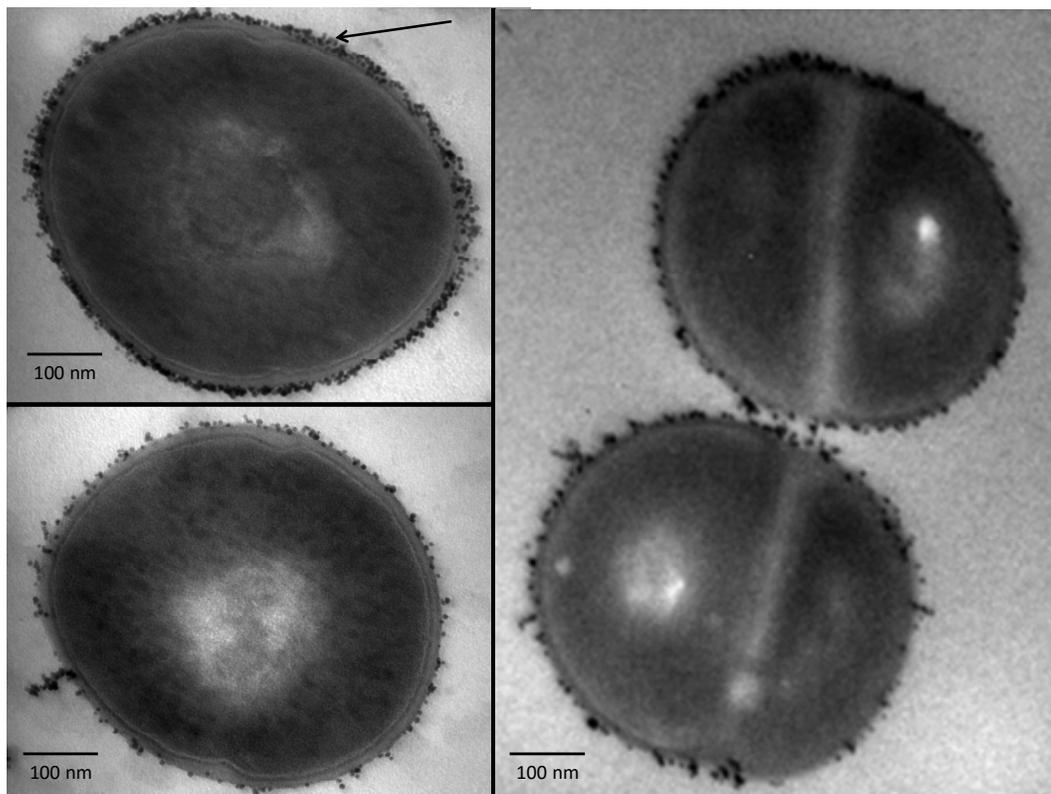


Figura 7d. Imágenes de TEM mostrando la interacción entre B-AuNP y las paredes de *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 35218 luego de 1 h de incubación a 37 °C.

Las imágenes de TEM demostraron que las B-AuNP estaban concentradas principalmente en las paredes de las bacterias. La mayoría de las nanopartículas rodeaban específicamente cada bacteria luego de sólo 1 h de incubación.

\* Las imágenes TEM fueron tomadas en un equipo Zeiss LEO 906E con la colaboración de la Dra. Cristina Maldonado en el Centro de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Córdoba.

## 7.6 ESTUDIO CINÉTICO DE LA ACTIVIDAD FOTOANTIMICROBIANA DE B-AuNP

### METODOLOGÍA

En cada *well* se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de inóculo bacteriano ( $\sim 10^4$  UFC/mL) de *S. aureus* o *E. coli* productora de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y 250  $\mu\text{L}$  de PBS o de B-AuNP (2mM). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado y el ensayo fue repetido para asegurar reproducibilidad. Las placas *multiwell* fueron agitadas suavemente en un *shaker* termostatzado a 37 °C durante 1 h, cubiertas de la luz. Luego de este período, las placas fueron irradiadas también a 37 °C por 6, 9 y 12 h con el arreglo de LED de 525 nm construido para este propósito. Placas idénticas fueron analizadas en paralelo en la oscuridad. Finalmente, se agregó 500  $\mu\text{L}$  de PBS a cada *well* y de allí se sembraron 20  $\mu\text{L}$  de cada muestra en placas Petri con agar MH aplicando la técnica de la microgota. Todas las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 h y luego se realizó el recuento de UFC/mL.

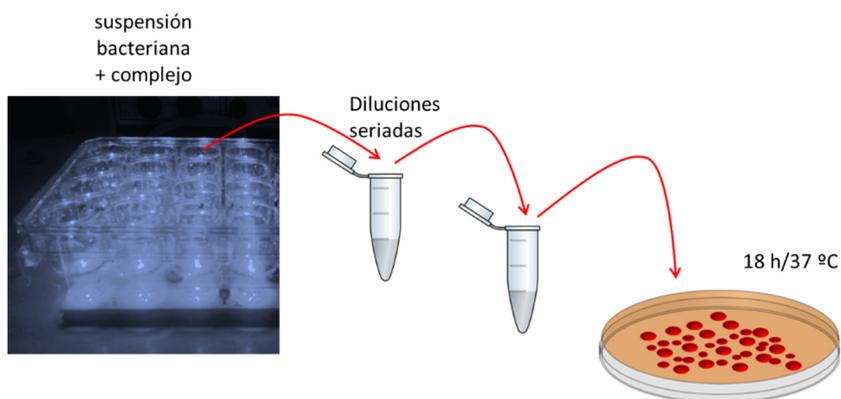


Figura 7e. Placa *multiwell* y esquema de siembra de las curvas de muerte.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A medida que aumentó el tiempo de irradiación, el recuento de *S. aureus*, y de *E. coli* resistente a los antibióticos disminuyó. Se observó una reducción en el crecimiento ( $< 1$  unidad logarítmica) de ambas cepas luego de 9 h de irradiación, y una inhibición completa en las muestras tratadas con B-AuNP e irradiadas por 12 h. La reducción de más de 3 unidades logarítmicas en las UFC en comparación con el control, prueban el efecto bactericida en una cepa Gram-positiva (Figura 7f A) y una Gram-negativa (Figura 7f B).

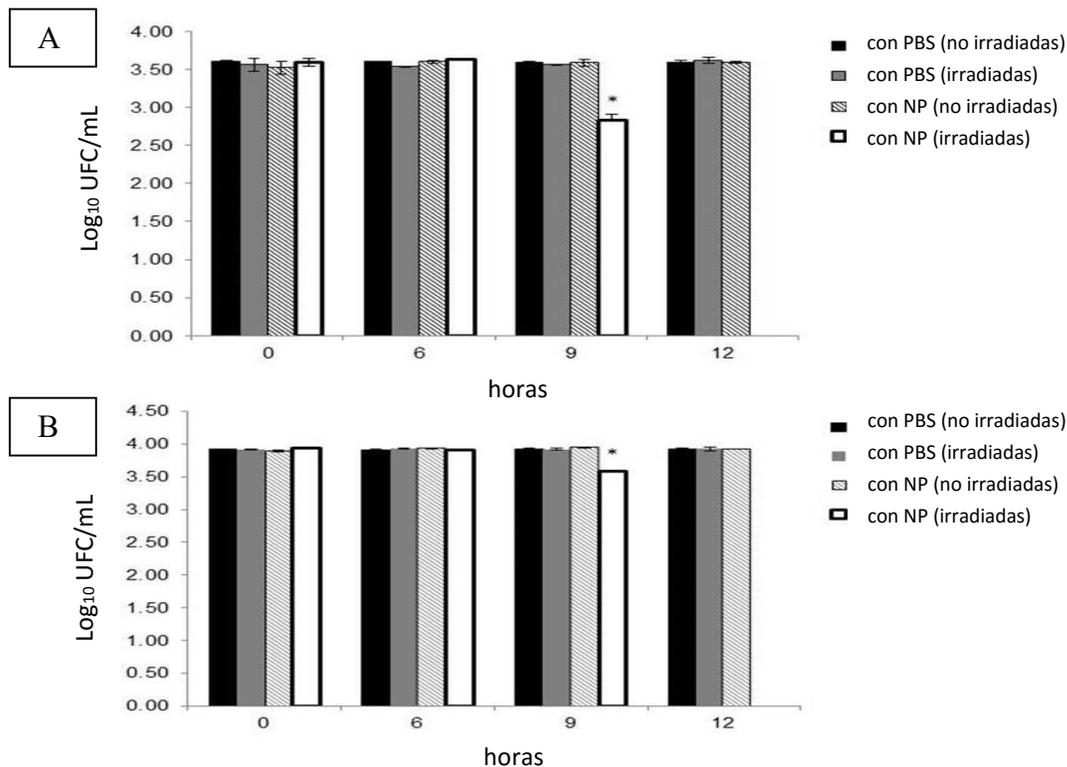


Figura 7f. Efecto fotoantibacteriano de B-AuNP en *S. aureus* ATCC 29213 (A) y *E. coli* ATCC 35218 productora de BLEE (B). Los resultados de los triplicados son mostrados con su correspondiente desviación estándar ( $\pm$  SD). Se notan diferencias estadísticamente significativas entre las muestras control y las tratadas con B-AuNP e irradiadas a 525 nm (\* $p < 0.05$ )

Si bien el mecanismo por el cual actúan las AuNP no está completamente dilucidado, al igual que el de la mayoría de los nanomateriales con efecto bactericida, es altamente probable que se deba al daño producido a la membrana (observado por TEM) por la interacción electrostática entre AuNP y las superficie celular. Estas alteraciones estructurales fueron observadas por Yanping, X *et al.* (2011) en bacterias tratadas con ZnNP.<sup>16</sup> Estas nanopartículas, al igual que las AuNP, provocaron la formación de irregularidades y vacuolas en la membrana, comprometiendo su permeabilidad y favoreciendo la fuga de componentes internos.

## CONCLUSIONES PARCIALES

- *Las AuNP demostraron alto potencial como FS contra cepas bacterianas de referencia y clínicas.*
- *Se notó la necesidad de disminuir el tiempo que necesitan ser irradiadas para lograr el efecto bactericida.*

---

## BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> Pusey, Wm. J. *Cutaneous Dis.* 1900; 18: 302-318
- <sup>2</sup> Metzzenbaum, Myron *Clin. International* 1905; 04 (14): 21-31
- <sup>3</sup> Giménez RE, Vargová V, Rey V, Turbay MB, Abatedaga I, Morán Vieyra FE, Paz Zanini VI, Mecchia Ortiz JH, Katz NE, Ostatná V, Borsarelli CD. *Free Radic Biol Med.* 2016; S0891-5849 (16) 00065-4. Epub
- <sup>4</sup> Mukherjee S, Chowdhury D, Kotcherlakota R, Patra S. *Int J Pharm.* 2013; 454 (1): 249-58
- <sup>5</sup> Milanesio ME, Spesia MB, Cormick MP, Durantini ES. *Photodiag. Photodyn Ther.* 2013; 10 (3): 320-7
- <sup>6</sup> Mocan L, Ilie I, Matea C, Tabaran F, E Kalman, Iancu C, Mocan T. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 1453-61
- <sup>7</sup> Sperandio FF, Huang YY, Hamblin MR *Pat Antiinfect Drugs Discov* 2013; 8 (2): 108-20. Review
- <sup>8</sup> Vatansever F, de Melo WC, Avci P, D Vecchio, Sadasivam M, Gupta A, Chandran R, Karimi M, . Parizotto NA, Yin R, Tegos GP, Hamblin MR. *Microbiol Rev.* 2013; 37 (6): 955-89
- <sup>9</sup> Jos A., Pichardo S., Puerto M., Sanchez E., Grilo A., Camean A.M. *Toxicol in vitro* 2009; 23 (8): 1491-1496
- <sup>10</sup> Mateo D; Morales P; Avalos A, Haza A. *Acta Toxicol. Argent.* 2013; 21 (2): 102-109
- <sup>11</sup> Reglamento nº 1907/2006 del Parlamento – USA 2006
- <sup>12</sup> A Low, Bansal V. *Biomed Imaging Interv J.* 2010; 6 (1): e9
- <sup>13</sup> McGilvray KL, Decan MR, Wang D, Scaiano JC. *J. Am. Chem. Soc.* 2006; 128: (50): 15980-15981
- <sup>14</sup> J. Kimling , M. Maier , B. Okenve , V. Kotaidis , H. Ballot , and A. Plech J. *Phys. Chem. B.* 2006; 110 (32): 15700–15707
- <sup>15</sup> Wolfgang Haiss, Nguyen T. K. Thanh, Jenny Aveyard, and David G. Fernig. *Analytical Chemistry.* 2007; 70 (11): 4215-4221
- <sup>16</sup> Yanping X, Yiping H, Peter LI, Tony J, Xianming S. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77 (7): 2325-2331

## 8. NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS Asp@Ag@AuNP

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Sintetizar nanopartículas bimetálicas con núcleo de oro y cubierta de plata.*
- *Caracterizar las nanopartículas core-shell.*
- *Estudiar su potencial fotoantibacteriano.*
- *Evaluar su biocompatibilidad con células eucariotas.*

Hay tres motivos que incentivaron la síntesis de estas nanopartículas bimetálicas con núcleo de oro, cubiertas de plata y estabilizadas con aspartamo (Asp@Ag@AuNP):

- Las nanopartículas de oro mostraron que al ser irradiadas pueden generar un efecto fototérmico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano <sup>1,2</sup>
- Las nanopartículas de plata (AgNP) tienen excelentes propiedades antimicrobianas, incluso mejores que los iones de Ag<sup>+</sup> <sup>3,4</sup>
- Ciertos péptidos, como el LL37, son interesantes estabilizantes de nanopartículas metálicas porque no interfieren en la capacidad bactericida y son biocompatibles <sup>5</sup>

En base a estas observaciones se planteó la hipótesis de que las Asp@Ag@AuNP presentarían una actividad bactericida aún más marcada que las AuNP, ya que al efecto fototérmico del núcleo de oro se le sumaría la capacidad antimicrobiana de la cubierta de plata. <sup>6, 7, 8</sup> La cubierta del edulcorante es necesaria para prevenir la oxidación de la Ag<sup>0</sup> en medio acuoso y mantener la estabilidad de los nanoestructurados. Cabe mencionar que el aspartamo es un edulcorante artificial económico y muy fácil de reemplazar por otras moléculas de interés biológico si así se desea. Además, su toxicidad es nula en los niveles propuestos. <sup>9,10</sup>

## 8.1 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE Asp@Ag@AuNP

### 8.1.1 Síntesis de Asp@Ag@AuNP

#### METODOLOGÍA

El crecimiento de las nanopartículas *coreshell* se llevó a cabo a partir de semillas de C-AuNP <sup>11</sup> (~12 nm), según el procedimiento descrito en la literatura previamente <sup>12</sup> pero reemplazando el citrato con un agente más biocompatible: el aspartamo, por las razones que se mencionaron anteriormente. Brevemente, las C-AuNP se obtuvieron a partir de la irradiación durante 15 min de una placa *multiwell* que contenía 2,5 mL de una solución acuosa de HAuCl<sub>4</sub> (0,33 mM) y I-2959 (1 mM) en una relación estequiométrica de 1:3 en cada *well*. Posteriormente, la placa se mantuvo 24 h en la oscuridad antes de proceder a la funcionalización con plata. Se probaron varias concentraciones de AgNO<sub>3</sub> (1760, 880, 440, 220, 110 μM) hasta obtener nanopartículas que tuvieran una carga metálica de oro del núcleo igual que la de plata de la cubierta. Para ello, una solución acuosa de AgNO<sub>3</sub> (110 μM), aspartamo (4 μM) (nulo 8b) y I-2959 (110 μM) fue purgada con N<sub>2</sub> por 45 min, utilizando una cubeta de cuarzo de 0,01 cm de base y 5,00 cm de altura (con cuello angosto). A continuación, 1 mL de semillas de C-AuNP fue agregado con una jeringa y luego la cubeta sellada fue irradiada por 15 min con luz UVA. Luego de este periodo de irradiación, el color de la solución pasa de rosado a naranja o amarillo oscuro como se observa a continuación.

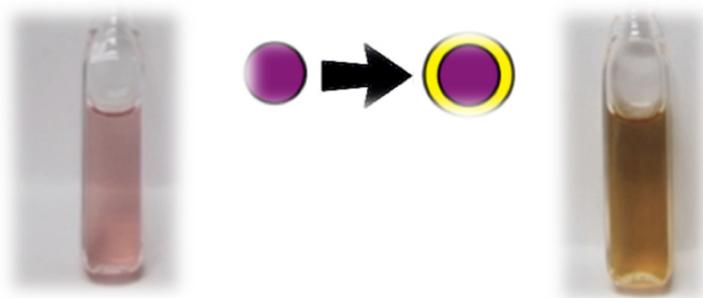


Figura 8a. Síntesis de Asp@Ag@AuNP

Las nanopartículas de Ag utilizadas a modo comparativo se sintetizaron por reducción de nitrato de plata (>99 % AgNO<sub>3</sub>) con borohidruro de sodio (99% NaBH<sub>4</sub>) que fueron adquiridos de Aldrich Chemicals. Brevemente, se añadió 15 ml de volumen de nitrato de plata (0,5 mM) a 15 ml

de solución de borohidruro de sodio (3,0 mM). Luego, bajo agitación continua, se agregó el edulcorante (4  $\mu$ M). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente durante 2 h, después de las cuales se observó que tomaba un color amarillo brillante atribuible a las AgNP. Esta solución coloidal fue dejada en la oscuridad durante aproximadamente 2 días para una mayor estabilización.

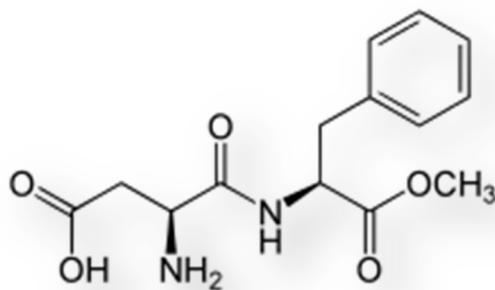


Figura 8b. Estructura de aspartamo.

### 8.1.2 Espectrofotometría electrónica

#### METODOLOGÍA

Los espectros de absorción electrónica de las soluciones acuosas de nanopartículas fueron tomados utilizando un espectrofotómetro *Shimadzu UV-2600*.

#### RESULTADOS

La formación final de Asp@Ag@AuNP (50:50) se evidencia en los cambios en los espectros mostrados en la Figura 8c. Después de la irradiación con UVA, la banda correspondiente a la absorción del plasmón de Au a 525 nm sufre un corrimiento hacia el azul; al mismo tiempo, una nueva banda correspondiente a la resonancia del plasmón de Ag aparece con un máximo a 405 nm. La intensidad final de ambos picos es consistente con cantidades similares de cada metal. Es más, esta relación se mantiene a lo largo del tiempo, como se observa en los espectros tomados hasta 10 días después de la síntesis. En resumen, el análisis de los espectros UV-visibles muestra la formación de las nanopartículas *coreshell* en oposición a las nanopartículas individuales o las

aleaciones. En esos casos, no se observaría el corrimiento del plasmón inicial (AuNP individuales) o habría una sola banda entre los máximos mencionados (aleaciones).<sup>13</sup>

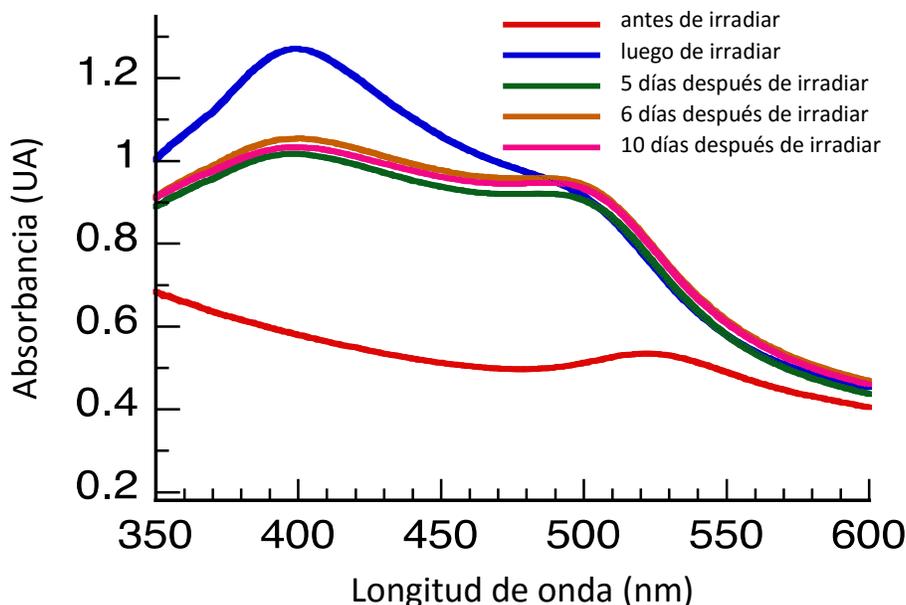


Figura 8c. Espectros de absorción para Asp@Ag@AuNP, tomados antes de la irradiación (rojo), justo después (azul), a los 5 días (verde), 6 días (amarillo) y 10 días después (rosado).

### 8.1.3 Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)

#### METODOLOGÍA

La estructura y tamaño de las Asp@Ag@AuNP se estableció mediante imágenes de TEM analizadas con el *software Image J (Image Analysis and Processing in Java)*. Este software permite medir manualmente el diámetro de cada nanopartícula observada en las imágenes y promediarlos. En cada imagen se observaron de 15 a 20 nanopartículas, por lo cual se necesitaron más de 30 imágenes para obtener un  $n = 548$  que sea estadísticamente significativo.

Para obtener la concentración conveniente para la técnica, se depositaron 2 gotas de las nanopartículas coloidales sobre el *grid*, dejando secar adecuadamente entre cada una.

## RESULTADOS

Las imágenes obtenidas, como la del ejemplo de la Figura 8d, revelan claramente que las Asp@Ag@AuNP son nanopartículas esféricas polidispersas. El centro oscuro de cada nanopartícula se atribuye al núcleo de oro y la región más clara que lo rodea, a la cubierta de plata. Lo observado contribuye a identificar la formación de las estructuras de *coreshell* deseadas.

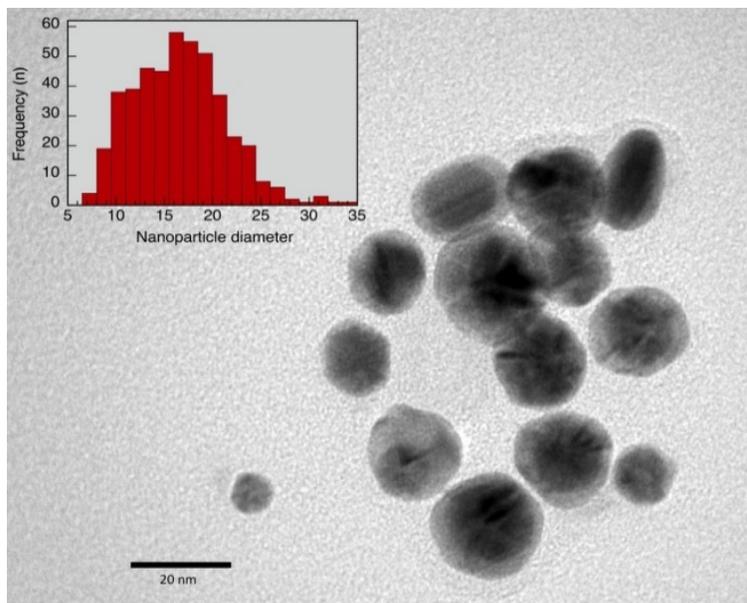


Figura 8d. Imagen de TEM de las Asp@Ag@AuNP e histograma correspondiente (n = 548).

### 8.1.4 Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS)

#### METODOLOGÍA

El análisis EDS es un procedimiento estándar para identificar y cuantificar la composición elemental de áreas de muestra hasta con tamaño tan pequeño como de algunos micrómetros cúbicos. El material es bombardeado con electrones y los rayos X producidos son medidos con el correspondiente espectroscopio. Los elementos presentes en la muestra se pueden identificar gracias a que cada uno tiene una longitud de onda característica.

## RESULTADOS

El análisis de EDS de Asp@Ag@AuNP, tras la integración de las áreas bajo los picos (Figura 8e), indica una composición atómica relativa de  $45,8 \pm 1,6$  % de Ag y  $54,2 \pm 1,7$  % de oro (Tabla 8a), similar a la relación establecida entre el  $\text{HAuCl}_4$  necesario para crear las semillas de ( $110 \mu\text{M}$ ) y el  $\text{AgNO}_3$  ( $110 \mu\text{M}$ ) agregado. El espectro de EDS muestra, además, la presencia de trazas de carbón e iones cloruro que probablemente son residuos del producto secundario ácido 4-hidroxiethoxibenzoico (HEBA) y la sal  $\text{HAuCl}_4$ .

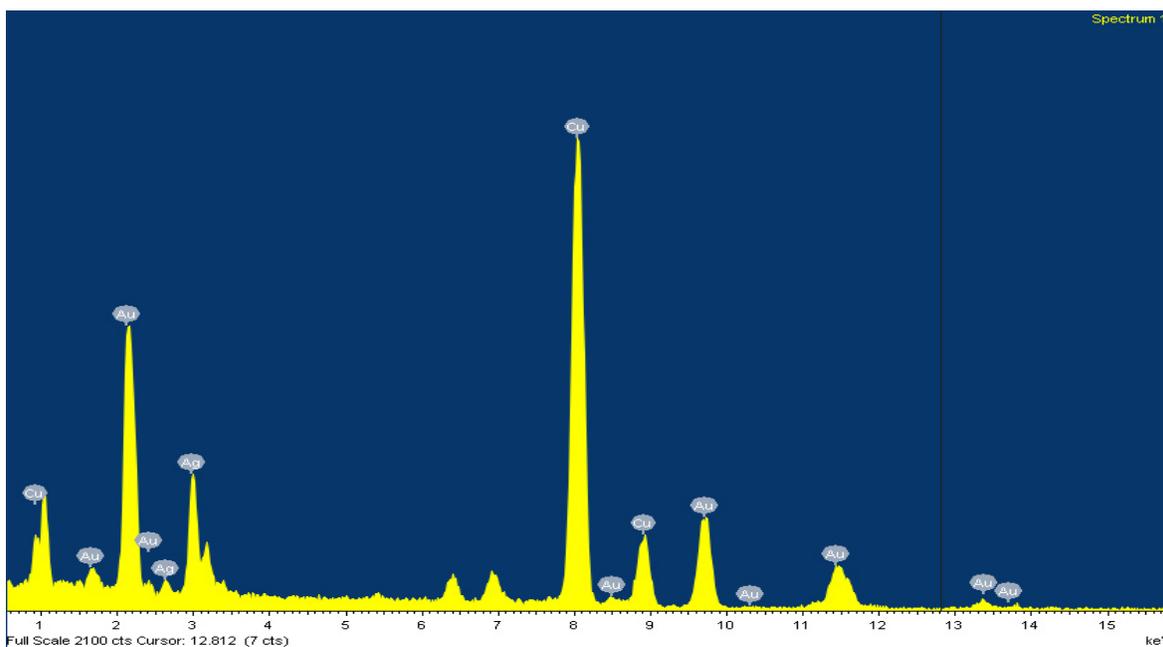


Figura 8e. Espectro EDS de Asp@Ag@AuNP

Tabla 8a. Datos de EDS de Asp@Ag@AuNP.

Elemento	Área del pico	Área Sigma	Factor k	Abs Corr	% Peso	% Atómico
Ag L	8755	276	1.245	1,002	31,29	45,40
Au L	12380	261	1.937	1,000	68,71	54,60
Total					100,00	

## 8.2 MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA (TEM) EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

La metodología empleada fue la misma aplicada en suspensiones bacterianas con AuNP. Se analizó el efecto de las Asp@Ag@AuNP en suspensiones de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 35218. Cabe mencionar que no pudo realizarse en la cepa clínica de *Staphylococcus epidermidis* SE19 ya que fue provista por el Hospital de Niños de Ottawa – Canadá (CHEO).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Analizando las imágenes TEM (Figura 8f), se evidenciaron distintos comportamientos frente a las nanopartículas entre *S. aureus* y *E. coli*. Luego de 1 h de incubación, las Asp@Ag@AuNP se localizaron alrededor de la membrana de los cocos. Al contrario, en los bacilos se encontraron pequeños agregados de las nanopartículas en el interior. A pesar de esta diferencia, ambas cepas presentaron irregularidades en la integridad de sus membranas.

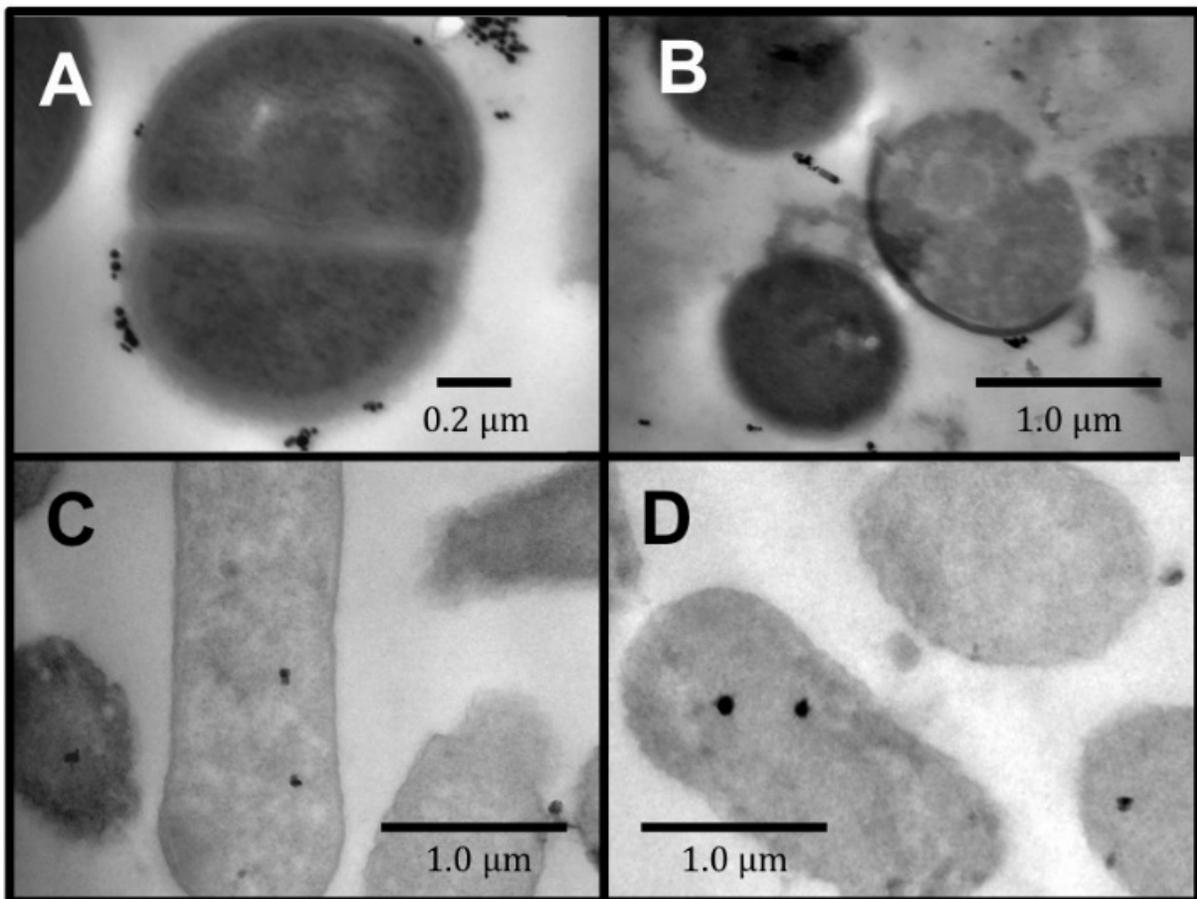


Figura 8f. Imágenes de TEM de *S. aureus* (A y B) y *E. coli* (C y D) luego de 1 h de incubación con Asp@Ag@AuNP a 37 °C.

Las nanopartículas se unen específicamente a la pared de *S. aureus* probablemente debido a la interacción electrostática con el peptidoglicano de esta cepa Gram-positiva como se propone también en el trabajo de Zhou *et al.* (2012).<sup>14</sup> Estos investigadores encontraron resultados similares utilizando nanopartículas de oro y de plata esféricas, de tamaño promedio entre 20 y 30 nm. Por otro lado, el ingreso de las Asp@Ag@AuNP en *E. coli* indicaría la intervención de algún tipo de mecanismo de captación, como ocurre con las AgNP y los poros de membrana. Por último, se propone que el daño estructural que ambas cepas presentan en la pared, aún sin ser irradiadas, sería provocado por el efecto bactericida de la cubierta de Ag. Resultados similares fueron encontrados por Mukherjee, *et al.* (2014).<sup>15</sup>

\* Las imágenes TEM fueron tomadas en un equipo Zeiss LEO 906E con la colaboración de la Dra. Cristina Maldonado en el Centro de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Córdoba.

### **8.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE Asp@Ag@AuNP**

#### **8.3.1 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)**

##### METODOLOGÍA

La CIM para las Asp@Ag@AuNP fue determinada por el ensayo de microdilución para las dos cepas testeadas con AuNP (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 35218 productora de BLEE) y en otra cepa clínica que provoca infecciones dérmicas (*Staphylococcus epidermidis*), previamente a los experimentos con irradiación. Para ello, dos placas *multiwell* idénticas fueron preparadas. Una de las placas fue irradiada con LED de longitud de onda 530 nm montados en un panel proveído por LuzChem Research Inc. y otra fue cubierta con papel aluminio para resguardar las muestras de la luz. Ambas fueron mantenidas 18 h a 37°C con agitación constante. Las densidades ópticas (DO) iniciales de las muestras y a diferentes tiempos fue medida empleando un lector de placas *multiwell*.

A continuación se presenta un ejemplo de la disposición usada en la placa *multiwell* (Figura 8g). Los *wells* coloreados de azul contenían 200 µL de agua estéril, para evitar la evaporación de las muestras de interés contiguas. El experimento se centraba entre B3 y G8 donde se observó que la luz incidía de manera homogénea. La solución *stock* de las nanopartículas probadas (50 µM) fue agregada en la fila G (*Wells* coloreados de negro) y a partir

de ella se realizaron diluciones seriales con un factor de  $\frac{1}{2}$  hasta la B. Las concentraciones testeadas fueron desde 1,56 a 25,00  $\mu\text{M}$ . Esas concentraciones fueron elegidas en base a la hipótesis de que las Asp@Ag@AuNP tendrían una CIM similar a otras nanopartículas bimetálicas de oro y plata.<sup>16</sup> El volumen final de cada *well* fue de 200  $\mu\text{L}$ .

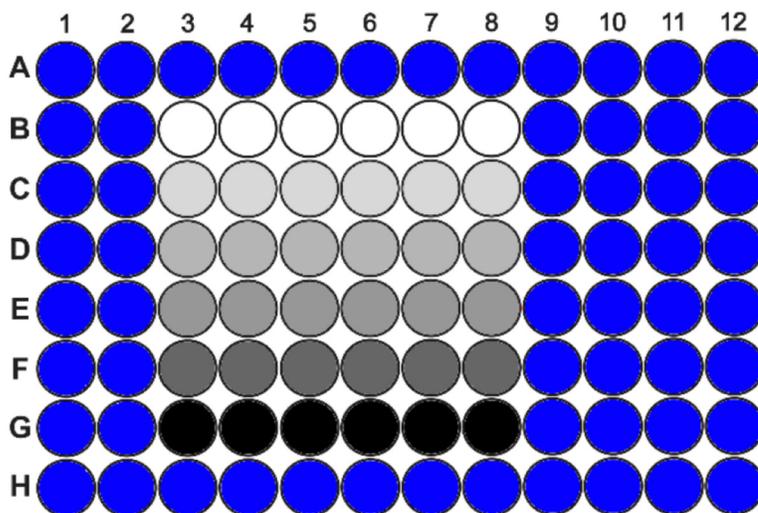


Figura 8g. Disposición modelo de las muestras en la placa *multiwell* de forma tal que se evite la evaporación de las muestras a lo largo del tiempo y que la incidencia de la luz sea homogénea sobre los *wells* que las contienen.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos para cada cepa se exhiben en la Figura 8h con sus correspondientes desviaciones estándar (DS).

El valor de la CIM para muestras tratadas con Asp@Ag@AuNP irradiadas fue menor (6,25  $\mu\text{M}$ ) a la CIM de las no irradiadas. Es decir, se necesita una cantidad menor de Asp@Ag@AuNP para inhibir el crecimiento bacteriano cuando éstas son expuestas a la luz adecuada. Paralelamente, se midió la OD en inóculos bacterianos sin nanopartículas a modo de control, y se observó normal crecimiento aún en la placa que fue irradiada (diferencia menor a 0,1 unidades de OD). Teniendo en cuenta los valores descriptos previamente,<sup>17</sup> se nota claramente que es necesaria una concentración considerablemente menor de Asp@Ag@AuNP en comparación a AuNP para lograr el efecto bactericida (99,9 % de muerte).

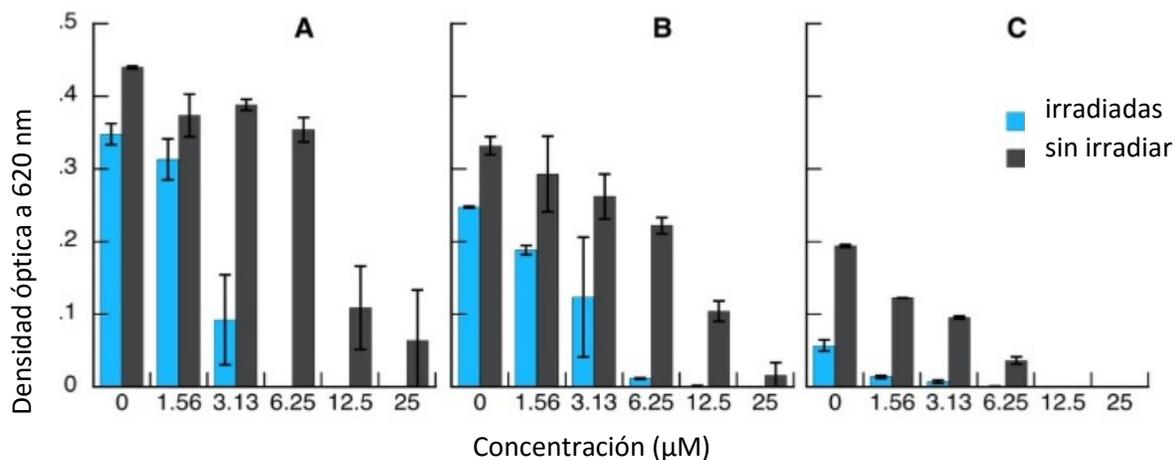


Figura 8h. Efecto antimicrobiano de Asp@Ag@AuNP medido a través de la DO a 620 nm para inóculos bacterianos de *E. coli* (A), *S. aureus* (B) y *S. epidermidis* (C). Las barras azules corresponden a los resultados de las muestras irradiadas y las barras negras a las que fueron mantenidas en la oscuridad.

### 8.3.2 Estudio cinético de la actividad fotoantimicrobiana de Asp@Ag@AuNP

#### METODOLOGÍA

Se hicieron curvas de muerte a las CIM de Asp@Ag@AuNP para cada cepa, según la metodología detallada anteriormente. Los controles fueron realizados en muestras sin irradiar y sin nanopartículas.

## RESULTADOS

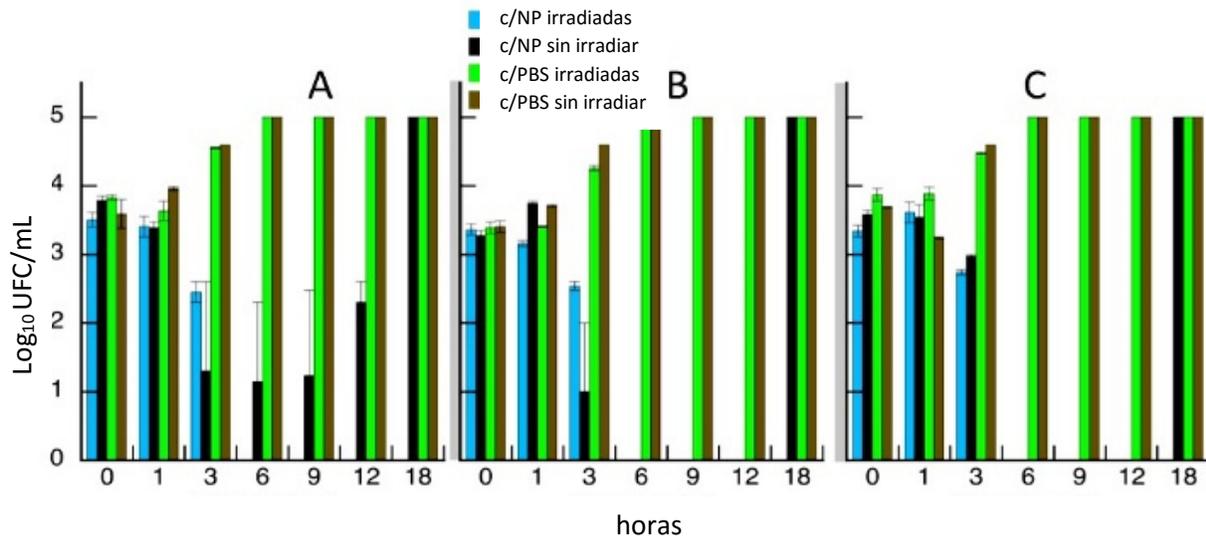


Figura 8i. Curvas de muerte para Asp@Ag@AuNP (a concentraciones CIM) graficadas como el logaritmo decimal de UFC de *E. coli* (A), *S. aureus* (B) y *S. epidermidis* (C) a diferentes tiempos (0, 1, 3, 6, 9 y 18 h) bajo irradiación (barras celestes) y en la oscuridad (barras negras). Los controles sin nanopartículas también fueron realizados bajo irradiación (barras verdes) y en la oscuridad (barras marrones)

Primero, se destaca que no se observaron diferencias significativas en el crecimiento bacteriano de los controles realizados. De hecho, en las muestras sin nanopartículas de todas las cepas (irradiadas y no irradiadas) se mantiene constante la población (aproximadamente 5 unidades logarítmicas de UFC/mL) a lo largo de 18 h. Es necesario mencionar que no se observó un crecimiento exponencial marcado, esto se debe a que los experimentos se realizaron en PBS por las interferencias que producen los medios líquidos de cultivo en la solubilidad de las nanopartículas

En segundo lugar, es importante mencionar la particular tendencia que presentaron las muestras tratadas con Asp@Ag@AuNP y mantenidas en la oscuridad. En *E. coli* se observó una disminución en el crecimiento hasta  $t = 6$  h; sin embargo, desde  $t = 9$  hasta  $t = 18$  h, se produjo

un marcado crecimiento (más de 4 unidades logarítmicas de UFC/mL). No se observó crecimiento bacteriano en *S. aureus* y *S. epidermidis* a  $t = 6$  h. Sin embargo, una significativa cantidad de colonias apareció a  $t = 18$  h (diferencia  $> 3$  unidades logarítmicas). Debido a este curioso efecto, los experimentos fueron repetidos en tres semanas diferentes y extendidos hasta  $t = 24$  h y las tendencias permanecieron sin cambios.

En tercer lugar y en contraste con las muestras cubiertas de la luz, las placas que fueron irradiadas y contenían Asp@Ag@AuNP no presentaron colonias a  $t = 6$  h. Este efecto bactericida se mantuvo hasta  $t = 18$  h como muestran los gráficos para todas las cepas.

## DISCUSIÓN

El crecimiento en el control sin nanopartículas e irradiado demuestra que no hay un efecto directo de la luz sobre estas células procariotas, como se esperaba ya que se está utilizando una longitud de onda en el rango del espectro visible.

Por otro lado, una notable disminución en el crecimiento de las suspensiones bacterianas con Asp@Ag@AuNP mantenidas en la oscuridad se atribuye al conocido efecto bactericida de la Ag. La aparición de UFC a  $t = 18$  h sugiere que la inhibición del crecimiento a  $t = 6$  h no fue completo, y ese porcentaje (menor al 0,01 %) de población bacteriana creció posteriormente. Probablemente ese porcentaje de bacterias no inhibidas tenga diferentes características que el inóculo inicial pero eso no fue motivo de estudio en el presente trabajo. Se concluye que las Asp@Ag@AuNP por sí solas no son capaces de inducir una inhibición completa del crecimiento bacteriano, (la cubierta de plata parece perder su estabilidad y capacidad antimicrobiana a lo largo del tiempo) sino que es necesario complementar el efecto bactericida de la cubierta de Ag con el efecto fototérmico producido por la excitación lumínica del núcleo de Au.

La capacidad bactericida de la plata a nivel nanométrico fue reportada en varias ocasiones,<sup>18</sup> pero el mecanismo exacto por cual las nanopartículas de plata causan el efecto antimicrobiano no se conoce claramente. Existen varias teorías al respecto. Una de ellas postula que las nanopartículas de plata tienen la capacidad de anclarse a la pared celular de las bacterias y posteriormente penetrar en ellas, lo que provoca cambios estructurales y funcionales, como el incremento de la permeabilidad, y en consecuencia la muerte celular.<sup>19</sup> Otra teoría sostiene que

el daño es generado principalmente por la formación de radicales libres.<sup>20</sup> También se ha propuesto que puede haber liberación de iones de plata por las nanopartículas, y estos iones pueden interactuar con los grupos tioles de muchas enzimas vitales e inactivarlos.<sup>21</sup> Por otro lado, la plata es un ácido suave y reacciona con el azufre y fósforo de las moléculas constitutivas de la bacteria como proteínas y ADN, que son bases suaves, interfiriendo con el normal funcionamiento celular.<sup>22</sup>

También se ha encontrado que las nanopartículas pueden influenciar la transducción de señales en bacterias. Por ejemplo, se observó desfosforilación en los residuos de tirosina de las bacterias Gram-negativas y alteraciones en el perfil de fosfotirosina peptídicas. Estos cambios conducen a una señal de inhibición de la transducción y por lo tanto la detención del crecimiento.

En el caso de las nanopartículas *coreshell* presentadas, la cubierta de plata tendría un rol importante en la disminución del tiempo requerido para alcanzar la inhibición completa del crecimiento. Esta acción sinérgica entre los dos metales (plata y oro) junto a la estabilidad conferida por la funcionalización de la superficie con aspartamo, convierten a este nuevo nanomaterial en un eficiente antibacteriano.

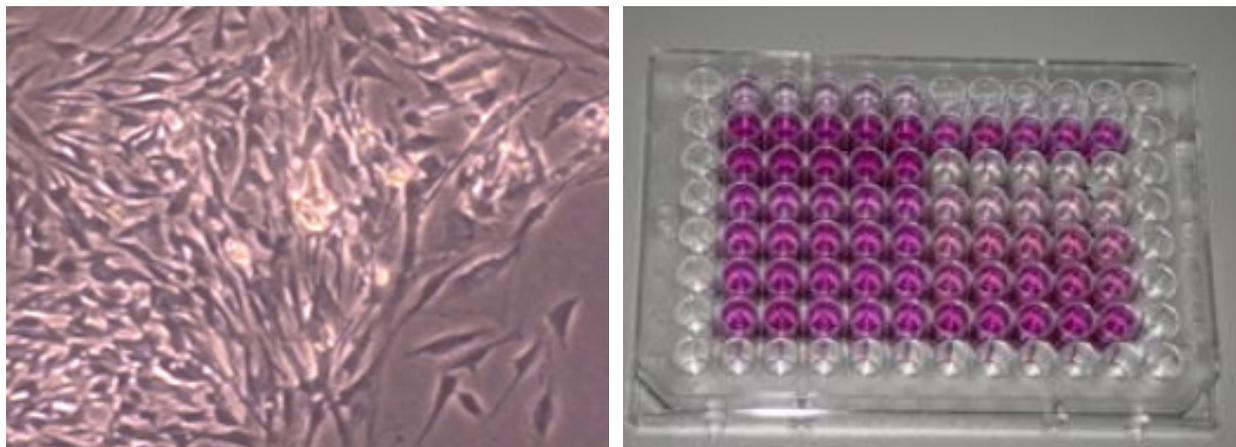
### **8.3.3 Estudios de citotoxicidad en células eucariotas**

#### **METODOLOGÍA**

La toxicidad de las nanopartículas y de sus componentes individuales fue testeada en fibroblastos dérmicos humanos (Balb/3T3 clone A31 - ATCC CCL-163) a través del ensayo con la sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS).

Para este experimento se utilizaron fibroblastos maduros de la línea Balb/3T3 clon A31 (ATCC CCL-163 (cultivados en placas *multiwell*) los cuales fueron incubados con las nanopartículas de interés (C-AuNP 2 mM y Asp@Ag@AuNP 6,25 y 12,5  $\mu$ M), con AgNP (1 mM) a modo comparativo y con aspartamo (4 mM) como control, en las concentraciones empleadas para los ensayos microbiológicos (volumen final de 200  $\mu$ L) durante 14 h. Después fueron lavados y cubiertos nuevamente con medio de cultivo. Por último, se agregó 20  $\mu$ L del reactivo de MTS (1 M) en cada *well* y se dejó reaccionar 4 h antes de proceder a la lectura de la absorbancia a 490

nm. Las muestras se analizaron por cuadruplicados y como control se procesaron fibroblastos sin tratar en paralelo.



Fotografías 8a y 8b. Fibroblastos maduros vistos al microscopio y placa *multiwell* empleada para el experimento luego de la reacción con MTS.

## RESULTADOS

No se observaron diferencias significativas en la proliferación celular para ninguna de las muestras tratadas a diferentes concentraciones de nanopartículas ni para el control.

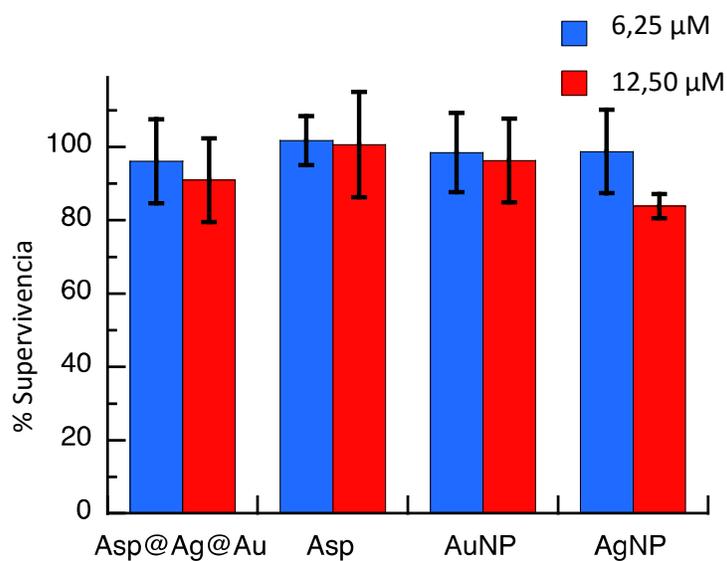


Figura 8j. Viabilidad celular de fibroblastos humanos incubados con C-AuNP y Asp@Ag@AuNP, AgNP y aspartamo, informada en porcentaje (%) respecto del control sin tratar.

## DISCUSIÓN

La viabilidad presentada por este linaje celular a lo largo del ensayo indicaría que los materiales propuestos como fotoantibacterianos no son tóxicos para células eucariotas; si bien deberían realizarse posteriores ensayos en otro tipo de células para confirmar esta hipótesis.

Existen reportes en la literatura que coinciden con la biocompatibilidad del oro en tamaño nanométrico.<sup>23</sup> Sin embargo, debido a la relativamente baja tasa de eliminación de la sangre y los tejidos, su acumulación puede conducir a problemas de salud.<sup>24</sup> Por lo tanto, son necesarios futuros experimentos sobre la biodistribución y excreción de las AuNP antes de ser usadas clínicamente.

Por otro lado, la ligera disminución en el porcentaje de sobrevivencia presentado por las muestras tratadas con AgNP podría deberse a la liberación de iones  $\text{Ag}^+$ , como se observa en los experimentos realizados por Bartlomiejczyk *et al.* (2013).<sup>25</sup> Estos experimentos describen que los iones de plata pueden ser liberados de AgNP, y la acción antibacteriana de estos iones ya fue reportada.<sup>26</sup> Sin embargo, la mayoría de los científicos consideran que sólo son parcialmente responsables de los efectos antibacterianos de AgNP.<sup>27, 28, 29</sup> Se postula que las propiedades de AgNP, de manera similar a los de otras nanopartículas, es el resultado de las características físicoquímicas únicas relacionadas con su pequeño tamaño: propiedades tales como la energía superficial, carga y solvatación son relevantes para sus interacciones con biomoléculas y células.<sup>30, 31</sup> Un concepto importante de la actividad *in vivo* de nanopartículas es la denominada corona.<sup>32</sup> Estos autores indican que: las superficies de las nanopartículas en un ambiente biológico son modificadas por la adsorción de biomoléculas tales como proteínas y lípidos, lo que lleva a una interfaz biomolecular que puede ser dividida en dos coronas: una "blanda" y otra "dura" con tiempos de intercambio cortos y largos, respectivamente. Esta hipótesis concibe que las propiedades de las AgNP varían dependiendo del entorno biológico temporal, por lo tanto, el intercambio de componentes de corona puede tener lugar mientras que la partícula se desplaza dentro de la célula. El concepto corona también explica las diferencias entre nanopartículas aparentemente similares, ya que incluso pequeños cambios en su forma, tamaño o recubrimiento puede modificar radicalmente la composición de la corona.<sup>33</sup> El impacto de las

propiedades de la corona en la respuesta celular a un tratamiento de nanopartículas no es todavía suficientemente comprendido.

Por lo expuesto, es que la toxicidad de cada tipo particular de nanopartícula debe ser evaluado individualmente, incluso si sus componentes por separado no son nocivos. En el experimento de biocompatibilidad realizado se observa que la cubierta de plata de las nanopartículas *coreshell* no produce alteraciones en la sobrevivencia celular.

A su vez, la ausencia de efecto del aspartamo sobre el desarrollo de los fibroblastos comprueba que el mismo es una opción biocompatible y segura para estabilizar las nanopartículas bimetálicas. La toxicidad del aspartamo ha sido evaluada previamente por numerosos estudios, y los resultados han sido controvertidos. Si bien algunos de los más recientes encontraron efectos agudos y crónicos del consumo de este edulcorante,<sup>34</sup> ha sido aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) en dosis muchos más altas que las empleadas en estos experimentos (50 mg/kg peso corporal/día). La FDA aprobó el aspartamo por primera vez en 1981 como edulcorante de mesa, en la goma de mascar, para el desayuno frío, como base para ciertos alimentos (es decir, bebidas, café instantáneo y té, gelatinas, pudines, y rellenos, y los productos lácteos y coberturas). En 1983 la FDA aprobó el uso de aspartamo en bebidas carbonatadas y sin gas, y en 1996, la FDA lo aprobó para su uso como un "edulcorante de uso general". No es estable al calor y pierde su dulzor cuando se calienta, por lo que normalmente no se utiliza en productos horneados. Debido a la controversia en dichas aprobaciones de la FDA, el aspartamo es una de las sustancias más exhaustivamente estudiadas en el suministro de alimentos humanos, con más de 100 estudios que avalan su seguridad. Actualmente, los científicos de la FDA han revisado los datos científicos con respecto a la seguridad del aspartamo en los alimentos y llegado a la conclusión de que es seguro para la población en general bajo ciertas condiciones. Sin embargo, las personas con una enfermedad hereditaria rara conocida como fenilcetonuria tienen dificultades para metabolizar la fenilalanina, un componente del aspartamo, y deben controlar su ingesta de fenilalanina de todas las fuentes, incluyendo el aspartamo. Por eso, las etiquetas de los alimentos y las bebidas que contienen aspartamo deben incluir una declaración que informa a las personas con fenilcetonuria que el producto contiene fenilalanina. Pero su biocompatibilidad ha sido reconfirmada.<sup>35</sup> Esto

sugiere que la utilización del aspartamo para la síntesis de nanopartículas (tanto como reductor y estabilizante) tiene un prometedor futuro en los ensayos biológicos.

### CONCLUSIONES PARCIALES

- *Se estableció un método de síntesis de nanopartículas core-shell con núcleo de oro, cubierta de plata y estabilizadas con una molécula biocompatible, pequeña y fácil de desplazar como el aspartamo.*
- *Se ha logrado reducir el tiempo de irradiación necesario para lograr el efecto bactericida.*
- *Las Asp@Ag@AuNP no son tóxicas para las células eucariotas testeadas, demostrando que serían compatibles para pruebas in vivo.*

\* Estos ensayos de citotoxicidad fueron llevados a cabo bajo la supervisión del Dr. Mauricio Baptista en la Universidad de San Pablo - Brasil

---

### BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61 (4): 250-81
- <sup>2</sup> Baffou G, Quidant R. *Laser & Photonics Reviews* 2013; 7: 171-187
- <sup>3</sup> Kalishwaralal K, BarathManiKanth S, Pandian SR, Deepak V, Gurunathan S. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010; 79 (2): 340-4
- <sup>4</sup> Mukherjee S, Chowdhury D, Kotcherlakota R, Patra S, Vinothkumar B, Bhadra MP, Sreedhar B, Patra CR. *Theranostics.* 2014; 4 (3): 316-35
- <sup>5</sup> Vignoni, M; de Alwis WH; Simpson, MJ; Phopase J, Mah TF; Griffith M, Alarcon EI, Scaiano JC. *Nanoscale* 2014; 6: 5725-5728
- <sup>6</sup> McGilvray, KL, Fasciani C, Bueno-Alejo CJ, Schwartz-Narbonne R, Scaiano JC. *Langmuir* 2012; 28: 16148-16155
- <sup>7</sup> Gonzalez, CM, Liu Y, Scaiano JC. *J. Phys. Chem. "C"* 2009; 113: 11861-11867
- <sup>8</sup> Khaing Oo MK, Yang Y, Hu Y, Gomez M, Du H, Wang H. *ACS Nano* 2012; 6 (3): 1939-47
- <sup>9</sup> Magnuson BA, Burdock GA, Doull J, Kroes RM, Marsh GM, Pariza MW, Spencer PS, Waddell WJ, Walker R, Williams GM. *Crit Rev Toxicol.* 2007; 37 (8): 629-727
- <sup>10</sup> Butchko HH, Stargel WW, Comer CP, Mayhew DA, Benninger C, Blackburn GL, de Sonnevile LM, Geha RS, Hertelendy Z, Koestner A, Leon AS, Liepa GU, McMartin KE, Mendenhall CL, Munro IC, Novotny EJ, Renwick AG, Schiffman SS, Schomer DL, Shaywitz BA, Spiers PA, Tephly TR, Thomas JA, Trefz FK. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2002; 35 (2): S1-93
- <sup>11</sup> McGilvray KL, Decan MR, Wang D, Scaiano, JC. *J. Am. Chem. Soc.* 2006; 128: 15980-15981
- <sup>12</sup> McGilvray KL, Fasciani C, Bueno-Alejo CJ, Schwartz-Narbonne R, Scaiano JC, Langmuir 2012; 28: 16148-16155
- <sup>13</sup> Scaiano JC, Billone P, Gonzalez CM, Maretti L, Marin ML, McGilvray KL, Yuan N. *Pure Appl. Chem.* 2009; 81: 635-647
- <sup>14</sup> Zhou H, Kong Y, Cirillo JD. *Nanobiotechnology.* 2012; 6; 10:19
- <sup>15</sup> Mukherjee E Alwis A. *Theranostics* 2014; 4: 316-335.
- <sup>16</sup> Vignoni M, de Alwis Weerasekera H, Simpson MJ, Phopase J, Mah TF, Griffith M, Alarcon EI, Scaiano JC. *Nanoscale* 2014; 6: 5725-5728
- <sup>17</sup> Silvero MJ, Argüello GA, Becerra MC. *J. Nanopharm. and Drug Delivery* 2015; 2 (2): 148-152
- <sup>18</sup> 4. Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. *J. Biomed. Mater.* 2008; 52: 662-668
- <sup>19</sup> Sondi I, Salopek-Sondi B. *J. Colloid Interface Sci.* 2004; 275: 177-182
- <sup>20</sup> Shrivastava, S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P, Dash D. *Nanotechnology* 18: 1-9
- <sup>21</sup> Feng, QL, Wu, J, Chen, GQ, Cui, FZ, Kim, TN, Kim, JO. *J. Biomed. Mater.* 2008; 52: 662-668

- 
- <sup>22</sup> Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, Yacaman MJ. *Nanotechnology* 2005; 16: 2346–2353
- <sup>23</sup> Shah M, Badwaik VD, Dakshinamurthy R. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014; (1):344-62. Review.
- <sup>24</sup> Zhang X. *Cell Biochem Biophys*. 2015 Epub PubMed PMID: 25663504.
- <sup>25</sup> Bartłomiejczyk T, Lankoff A, Kruszewski M, Szumiel I. *Env. Med.* 2013; 20 (1): 48-54
- <sup>26</sup> Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH, Park YH. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74: 2171-2178
- <sup>27</sup> Foldbjerg R, Dang DA, Autrup H. *Arch Toxicol*. 2011; 85: 743-750. 18
- <sup>28</sup> Kawata K, Osawa M, Okabe S. *Environ Sci Technol*. 2009; 43: 6046-6051. 19
- <sup>29</sup> Kim S, Choi JE, Choi J, Chung KH, Park K, Yi J, Ryu DY. *Toxicol In Vitro* 2009; 23: 1076-1084
- <sup>30</sup> Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. *Proc Natl Acad Sci*. 2008; 105: 14265-14270
- <sup>31</sup> Monopoli MP, Bombelli FB, Dawson KA *Nat Nanotechnol*. 2011; 6: 11-12
- <sup>32</sup> Monopoli MP, Walczyk D, Campbell A, Elia G, Lynch I, Baldelli BF, Dawson KA. *J Am Chem Soc*. 2011; 133(8): 2525-2534
- <sup>33</sup> Walczyk D, Bombelli FB, Monopoli MP, Lynch I, Dawson KA. *J Am Chem Soc*. 2010; 132: 5761-576
- <sup>34</sup> Paolini M, Vivarelli F, Sapone A, Canistro D. *Carcinogenesis*. 2016 Epub PubMed PMID: 26912665.
- <sup>35</sup> Additional Information about High-Intensity Sweeteners Permitted for use in Food in the United States.  
<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm397725.htm> 2016

## 9. ESTUDIO DEL MECANISMO DE MUERTE CELULAR

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Detectar y cuantificar, especies reactivas del oxígeno (ERO) como consecuencia de la excitación del plasmón de las Asp@Ag@AuNP en cepas bacterianas de referencia.*
- *Evaluar el daño macromolecular que causarían estas ERO en proteínas bacterianas.*

### 9.1 DETECCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ERO)

#### METODOLOGÍA

La producción de ERO es detectada cualitativamente por microscopía de fluorescencia utilizando la sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) (concentración final 1  $\mu$ M) en suspensiones de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* productora de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) tratadas con Asp@Ag@AuNP e irradiadas a 525 nm durante 4 h. Las muestras, sin ningún procedimiento de fijación, luego de la adición de la sonda fueron inmediatamente observadas en el microscopio de fluorescencia.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectó la producción máxima de ERO después de 2 y 3 h de irradiación, respectivamente. Esto sugiere que el estrés oxidativo sería una de las causas principales de muerte en bacterias utilizando este tipo de fotosensibilizador, por lo que se procedió a estudiar cuantitativamente la producción de ERO y el daño molecular.

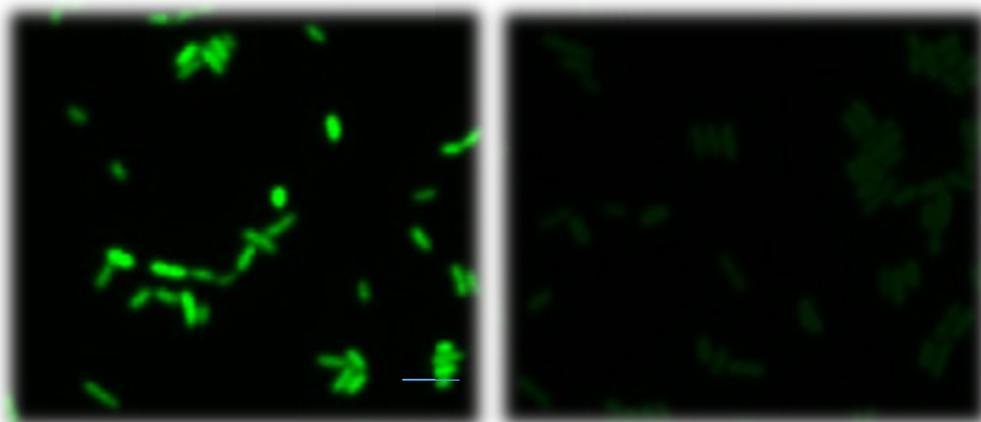


Figura 9a. *E. coli* BLEE luego de 3 h de irradiación con NP (izquierda) y sin NP (derecha).

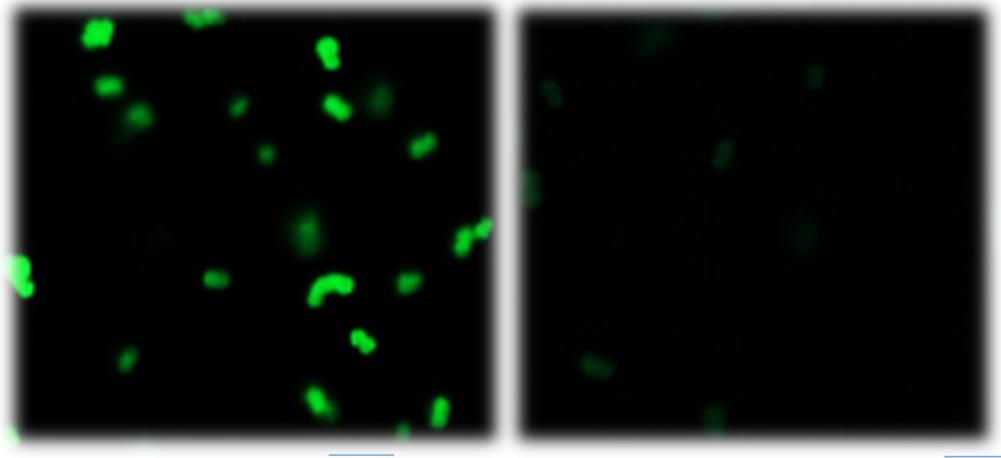


Figura 9b. *S. aureus* luego de 2 h de irradiación con NP (izquierda) y sin NP (derecha).

\* Las imágenes fueron tomadas con la colaboración de la Dra. Pilar Crespo en el Centro de Investigación de Bioquímica Clínica – FCQ - Universidad Nacional de Córdoba.

## 9.2 CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ERO) Y NITRÓGENO (ERN)

### METODOLOGÍA

Se escogió una sonda pre-fluorescente: 1,2,3- dihidrorodamina para detectar la posible producción de ERO y ERN totales, debido a su alta sensibilidad. Este colorante difunde pasivamente a través de la mayoría de las membranas celulares donde se oxida a 1,2,3 rodamina catiónica que genera una señal fluorescente verde a 536 nm.<sup>1</sup> Reacciona con el anión superóxido indirectamente, con peróxido de hidrógeno en presencia de peroxidasas y también con peroxinitrito, el anión formado cuando el óxido nítrico reacciona con el superóxido. Por lo cual no se detectó un radical específico sino más bien un conjunto de radicales indicadores de estrés oxidativo en suspensiones bacterianas ( $10^9$  UFC/mL) de tres cepas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (cepa clínica) productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y en *Pseudomonas aeruginosa* (cepa clínica) tratadas en relación 1:1 con Asp@Ag@AuNP (6,25  $\mu$ M) y (AuNP 2mM).

Se preparó una solución *stock* de la sonda en DMSO (20 mmol/L) que se conservó a -20 °C, luego se realizaron diluciones frescas en *buffer* PBS (pH 7,4 – 1mmol/L). Se agregaron 20 µL de esta solución a 200 µL de muestra. La incubación se realizó durante 2, 4 y 6 h a 37 °C (bajo irradiación a 525 nm y en oscuridad).

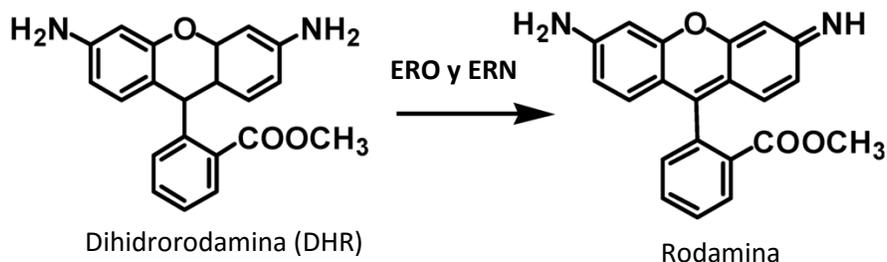
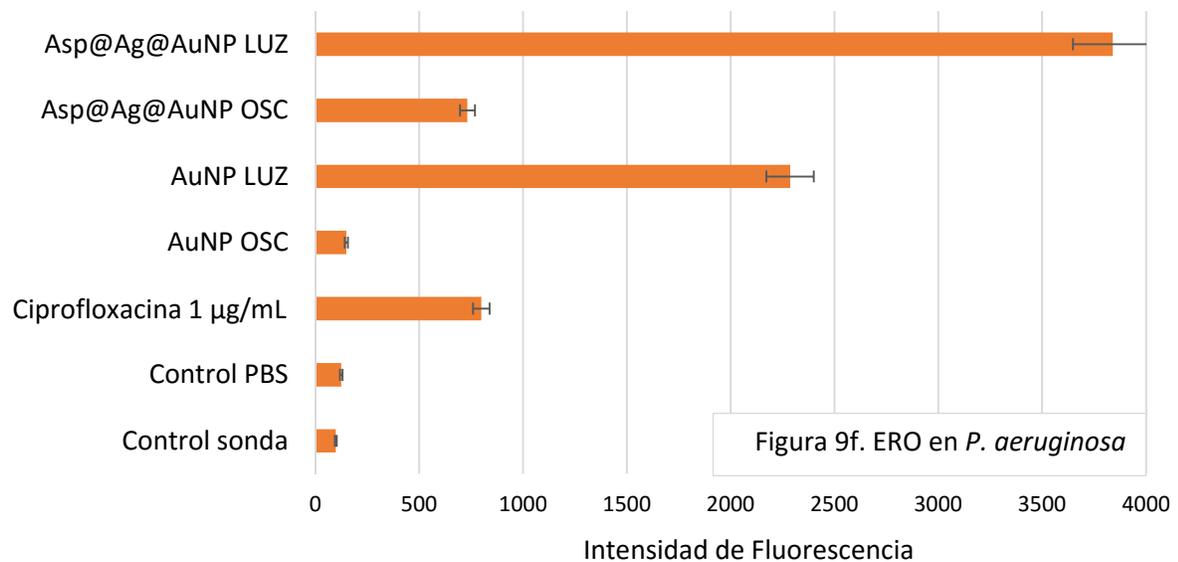
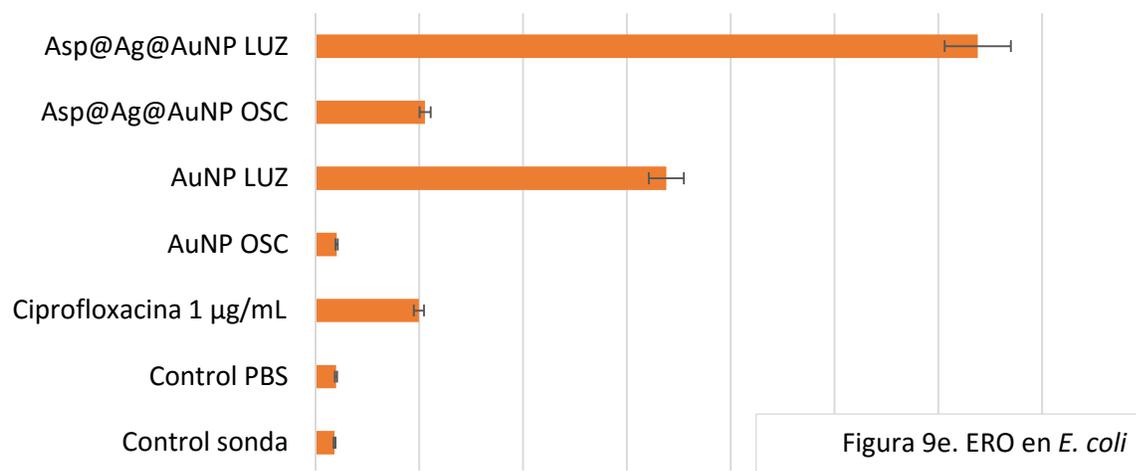
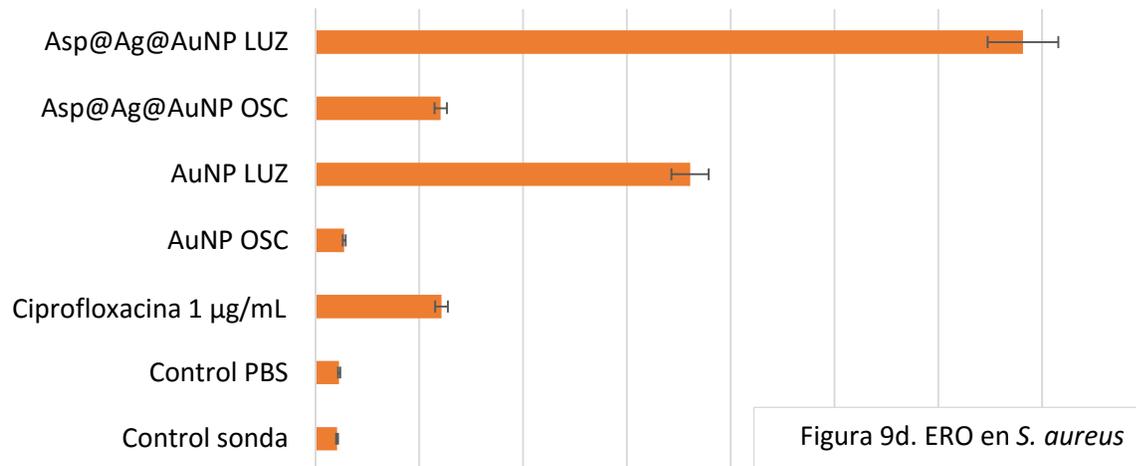


Figura 9c. Estructura de la DHR y su producto oxidado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La máxima producción de ERO se detectó a las 4 h en las suspensiones tratadas con las nanopartículas en sus correspondientes CIM, por lo tanto se presentan a continuación esos resultados por triplicado con sus correspondientes desviaciones estándar. (Figuras 9d, e y f)

La tendencia en la generación de ERO y ERN fue similar para las tres cepas, si bien *P. aeruginosa* mostró mayor producción total en comparación a *S. aureus* y *E. coli*. Las Asp@Ag@AuNP excitadas indujeron aproximadamente el doble de ERO y ERN que las AuNP excitadas, y éstas a su vez generaron casi tres veces más ERO y ERN que un antibiótico de uso clínico en su CIM (ciprofloxacina 1µg/mL). En las suspensiones bacterianas que contenían las nanopartículas *coreshell* y no fueron irradiadas, se observó también un leve incremento en la cantidad de ERO respecto al control con *buffer* que podría deberse al efecto de la Ag.



### 9.3 DETECCIÓN DE PRODUCTOS PROTEICOS DE OXIDACIÓN AVANZADA (AOPP)

#### METODOLOGÍA

Los AOPP son utilizados actualmente como marcadores de estrés oxidativo en plasma, ya que se ha documentado la vulnerabilidad de las proteínas a las especies reactivas del oxígeno (ERO). Por ejemplo, la oxidación de un residuo aminoácido como tirosina, conduce a la formación de ditirosina, agregación de proteína, entrecruzamiento y fragmentación.<sup>2,3</sup> Estos productos, en presencia de ioduro de potasio absorben luz de longitud de onda 340 nm y pueden ser medidos espectrofotométricamente. Se estudió la generación de AOPP utilizando Asp@Ag@AuNP y AuNP (en sus correspondientes CIM) en suspensiones bacterianas de *S. aureus* (ATCC 29213) y *E. coli* (clínica) productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Las mediciones se realizaron a t = 1, 2, 4, 6 y 8 h. La curva de calibración se realizó con Cloramina T y las proteínas totales fueron detectadas con el reactivo de Bradford.<sup>4</sup> Los resultados finales de AOPP fueron expresados como la relación entre Equivalentes  $\mu\text{M}$  de Cloramina T/mg proteínas y como porcentaje (%) de incremento de AOPP en las muestras irradiadas (4 h) respecto a las que fueron mantenidas en la oscuridad.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cantidad total de AOPP aumentó progresivamente en las muestras de *S. aureus* y *E. coli* BLEE sometidas a la Terapia Fotodinámica Antibacteriana (PACT) con Asp@Ag@AuNP y AuNP, hasta alcanzar el máximo a las 4 y 6 h de irradiación, respectivamente, como se observa en las Figuras 9g, h, i y j. Estos tiempos son similares a los reportados previamente para antibióticos de uso clínico.<sup>5</sup>

Se puede decir que el advenimiento de  $\text{O}_2$  en la atmósfera fue uno de los primeros grandes eventos de contaminación ocurrieron en la tierra. La reacción entre el hierro, muy abundante en la atmósfera primitiva reductora, y oxígeno resultaron en la formación de superóxido y radicales hidroxilo nocivos, que afectan a todas las macromoléculas biológicas (ADN, lípidos y proteínas). Desde ese entonces los organismos vivos tuvieron que construir mecanismos para protegerse contra ese estrés oxidativo. Si bien son efectivos en condiciones normales, cuando la cantidad de ERO producida es elevada, se produce una oxidación

irreversible. La cuantificación de proteínas oxidadas es, por lo tanto, una medida indirecta de los niveles de ERO que se han generado como producto de la PACT aplicada.

Cabe mencionar que es el primer reporte de AOPP producidas en bacterias por PACT con NP, por lo que la técnica fue adaptada del ensayo que normalmente se realiza en células eucariotas para evaluar el daño oxidativo. En ellos se observó que ceftazidima (CAZ), piperacilina (PIP), cloranfenicol (CMP), y ciprofloxacina (CIP) son capaces de oxidar macromoléculas en tres cepas *S. aureus*, *E. coli*, y *P. aeruginosa*.<sup>5</sup> Otro trabajo describe que las ERO que produce ciprofloxacina en *S. aureus* oxidan los lípidos a malondialdehído (MDA). Es más, se ha encontrado que este producto de peroxidación lipídica puede interferir con la superóxido dismutasa (SOD), y perturbar los mecanismos antioxidantes celulares. Esta reducción de las defensas contra el estrés oxidativo posteriormente lleva a un ambiente pro-oxidante.<sup>6</sup> Esto puede ser la causa de la falta de respuesta que se aprecia con la adición de SOD a ensayos de oxidación de lípidos. Además, una vez formados, tanto los productos oxidados de lípidos como los AOPP ocasionan lesiones premutagénicas en el ADN, como la oxidación de la columna vertebral del ADN con graves consecuencias para las células huésped.<sup>7</sup> Los datos experimentales señalan también aumentos del principal marcador de estrés oxidativo en ADN (8-oxodG) en cepas sensibles como consecuencia del tratamiento con ciprofloxacina. Dicho aumento fue mayor en las cepas sensibles al antibiótico que en la resistente. Esto se atribuyó a que la capacidad antioxidante en la bacteria resistente es mayor que en la cepa sensible.

En nuestro caso, la cantidad del indicador de daño macromolecular medido, AOPP, observada es más del doble del basal tanto para una cepa sensible a antibiótico (Figura 9h) como para una que es resistente (Figura 9h). Esto sugiere que los mecanismo de defensa son sobrepasados ampliamente por las ERO generadas durante las horas de PACT. Estos resultados prueban la ventaja de esta terapia frente a bacterias resistentes a antibióticos.

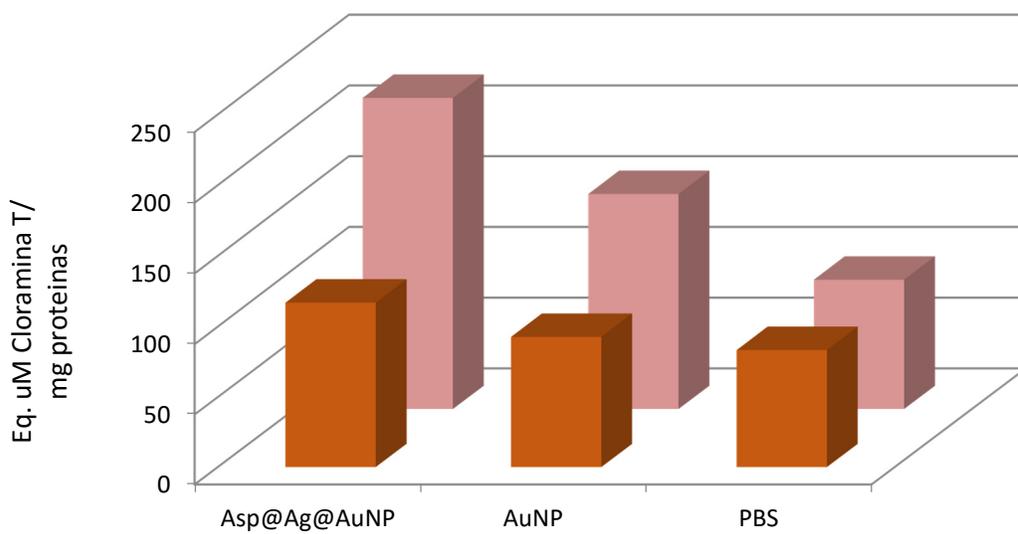


Figura 9g. Generación de AOPP EN *S. aureus* 29213

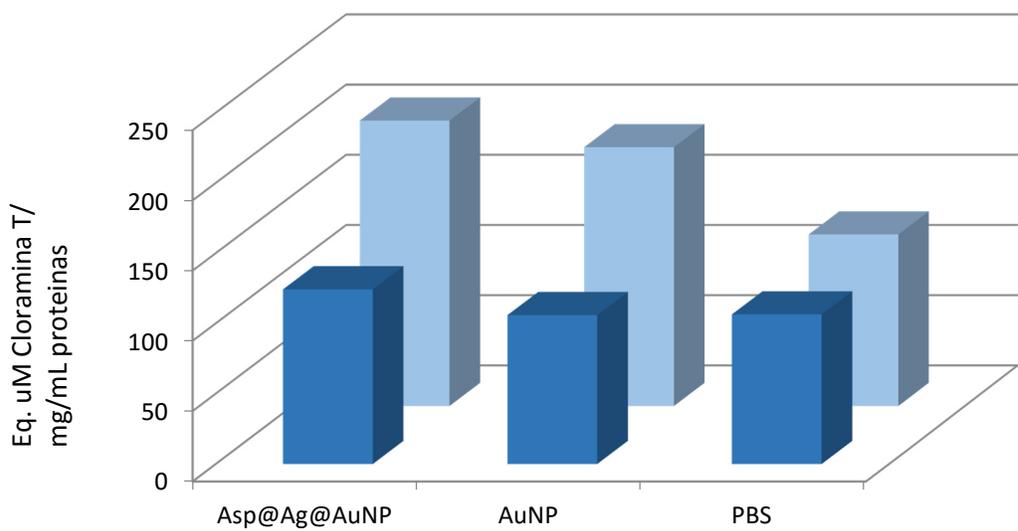
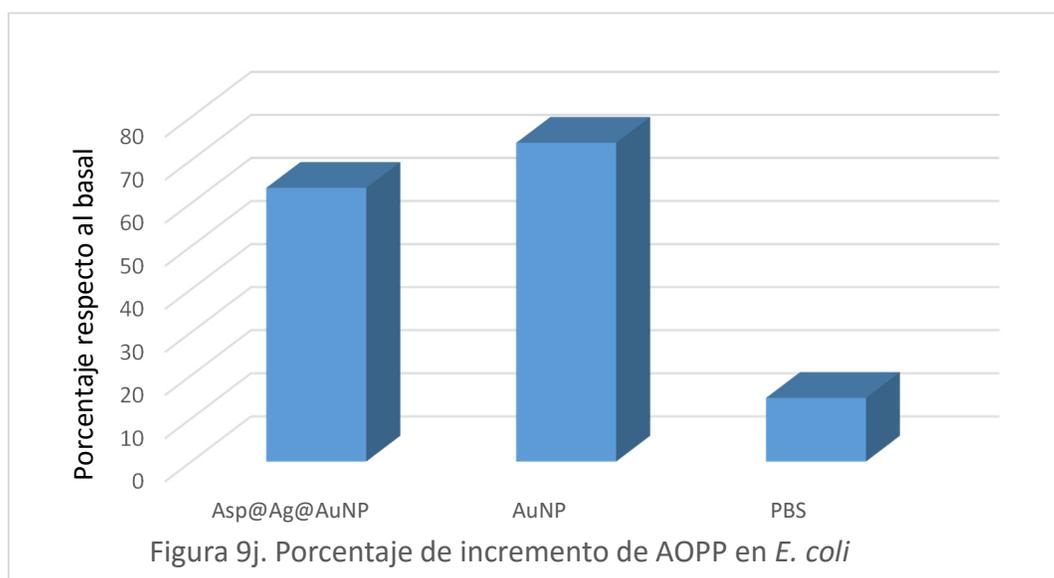
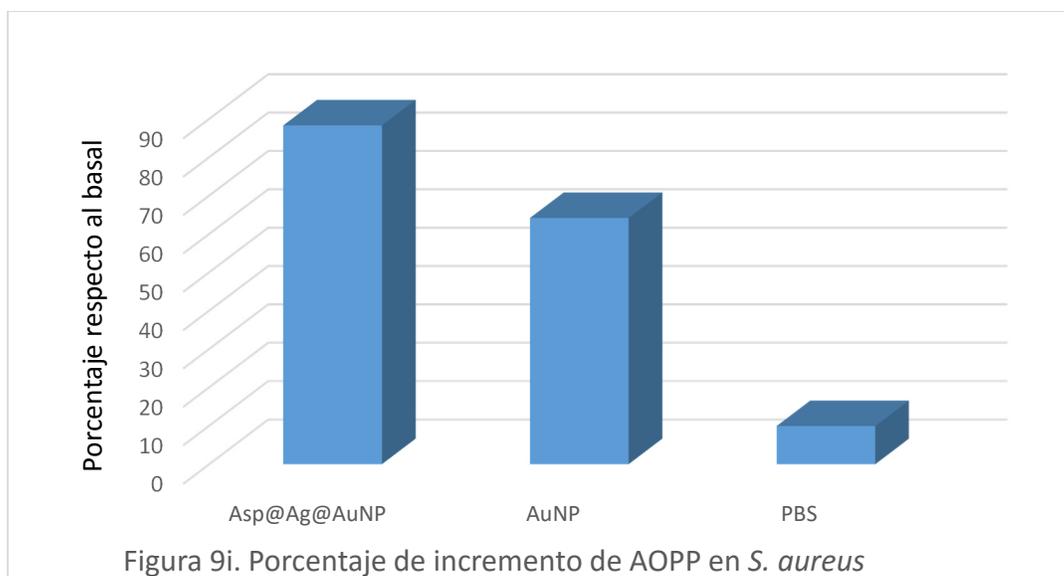


Figura 9h. Generación de AOPP EN *E. coli* BLEE



Teniendo en cuenta que la inhibición total del crecimiento en *S. aureus* y *E. coli* BLEE se observó 2 h después de detectar el máximo de AOPP, se podría establecer una relación directa entre la producción de ERO provocado por la PACT con nanopartículas, la oxidación de macromoléculas y el efecto bactericida logrado.

### CONCLUSIONES PARCIALES

- *Se han detectado altos niveles de ERO en las suspensiones bacterianas tratadas con PACT con las nanopartículas coreshell.*

- Estos altos niveles de ERO provocaron daño irreversible en las proteínas que forman parte esencial de las células bacterianas, indicando que los mecanismo de defensa no son capaces de contrarrestar dicho estrés oxidativo.
- El mecanismo de muerte propuesto (Figura 9k) sería producto de la combinación de la gran cantidad de ERO generada tras la excitación del núcleo de oro de las Asp@Ag@AuNP y el efecto bactericida de la cubierta de plata.

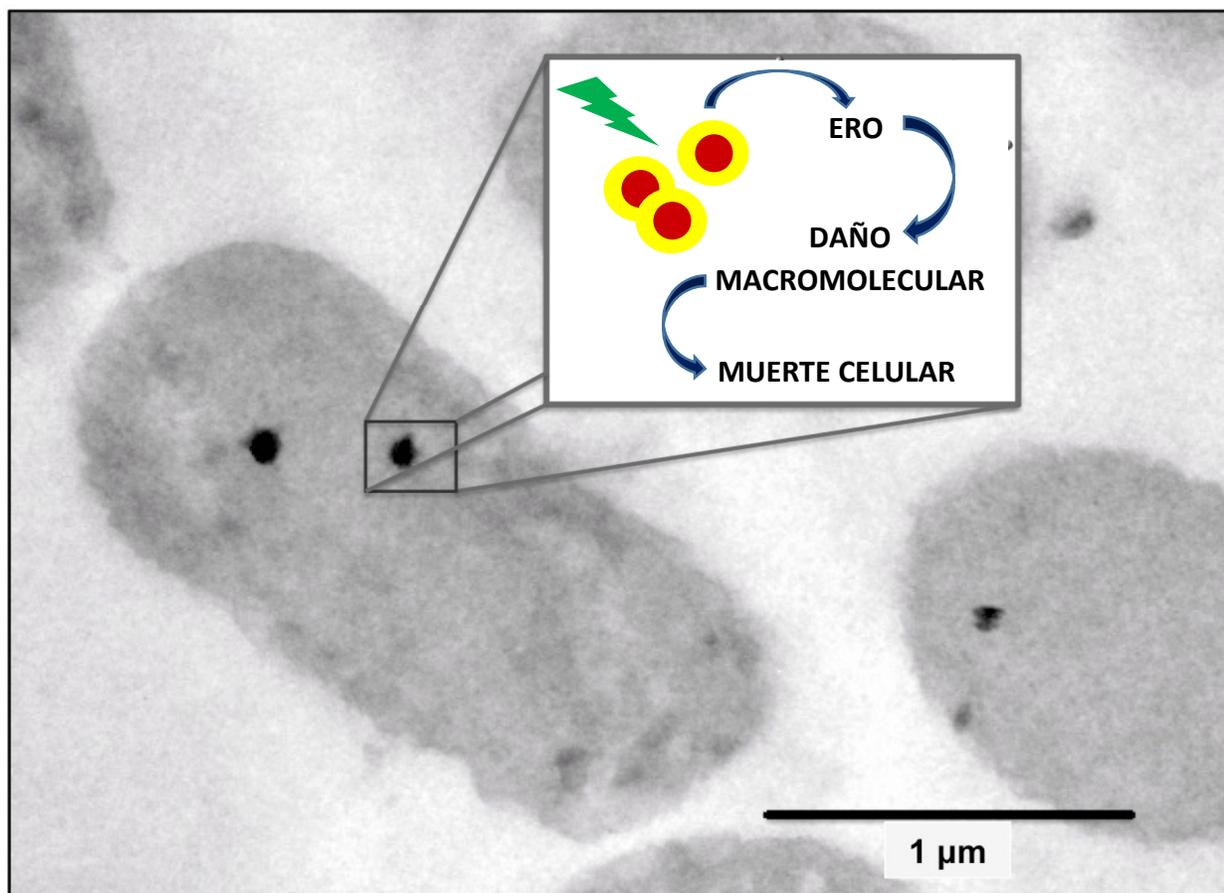


Figura 9k. Mecanismo de muerte celular propuesto para PACT con Asp@Ag@AuNP.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- <sup>1</sup> Baracca A, Sgarbib A, Solainib G, Lenaza G. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. Volume 2003; 1606: 137–146
- <sup>2</sup> Fialova L, Kalousova M, Soukupova J, Malbohan I, Krofta L, Mikulikova L, Horejsova H, Stipek S, Zima T. *Sb Lek*. 2003; 104 (1): 95-102
- <sup>3</sup> Witko-Sarsat V, Gausson V, Descamps-Latscha B. *Kidney Int Suppl*. 2003; (84): S11-4. *Review*
- <sup>4</sup> Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook – Versión 2 – USA 2014
- <sup>5</sup> Páez PL, Becerra MC, Albesa I. *Cell Biochem Biophys*. 2011; 61 (3): 467-72
- <sup>6</sup> Lee MH, Park JW. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 35: 1093–1102
- <sup>7</sup> Plastaras JP, Riggins JN, Otteneder M, MarnettL J. *Chem Res Toxicol* 2000; 13: 1235–1242

---

## 10. BIBLIOTECA DE NANOPARTÍCULAS “DULCES”

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Obtener nanopartículas de oro, de plata y coreshell con núcleo de oro y cubierta de plata estabilizadas con otros edulcorantes para evaluar si estas cubiertas afectan su capacidad antimicrobiana o biocompatibilidad con células eucariotas.*
- *Caracterizar las nanopartículas obtenidas.*
- *Estudiar la estabilidad de las nanopartículas coreshell estabilizadas con edulcorantes en medios biológicos y soluciones utilizadas en ensayos in vitro.*
- *Evaluar la actividad fotoantibacteriana en agentes causales de infecciones dérmicas.*

En base a los prometedores resultados microbiológicos obtenidos con Asp@Ag@AuNP, otros edulcorantes fueron testeados como estabilizadores: sucralosa (artificial-Figura 10a) y glucosamina (natural-Figura 10b).

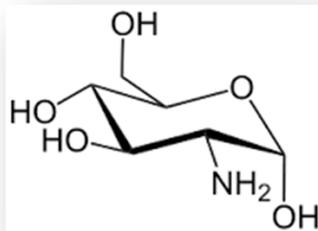


Figura 10a. Estructura de la glucosamina.

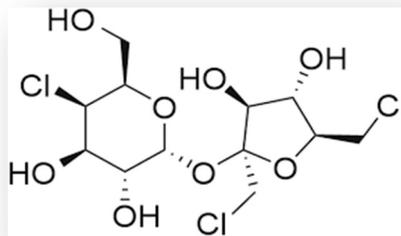


Figura 10b. Estructura de la sucralosa

## **10.1 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS ESTABILIZADAS CON EDULCORANTES**

### **10.1.1 Síntesis de Asp@AgNP, Glu@AgNP y Suc@AgNP \*\***

Se sintetizaron tres suspensiones de nanopartículas de plata utilizando un protocolo <sup>1</sup> con modificaciones menores que tiene al NaBH<sub>4</sub> como el agente reductor y el aspartamo, la glucosamina y la sucralosa como los estabilizadores. Antes de la síntesis de NP, todos los artículos de vidrio se limpiaron por inmersión en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:3). Inicialmente, se preparó una solución de 15 ml que consiste de NaBH<sub>4</sub> 3,0 mM y aspartamo, glucosamina y sucralosa 1,0 mM, 1,5 mM y 1,5 mM, respectivamente. La síntesis de AgNP se inició con la adición de 15 ml de AgNO<sub>3</sub> 0,5 mM a la mezcla de la reacción anterior con agitación continua durante 2 h, luego de las cuales se observó un color amarillo brillante atribuible a la formación de AgNP. Las soluciones fueron dejadas en la oscuridad 24 h para mayor estabilización.

### **10.1.2 Síntesis de de Asp@AuNP, Glu@AuNP y Suc@AuNP \*\***

Se sintetizaron tres suspensiones coloidales de AuNP reducidas y estabilizadas con aspartamo, la glucosamina y la sucralosa, con modificaciones menores en el protocolo previamente publicado por Qin *et al.* (2008) a temperatura ambiente. <sup>2</sup> Se preparó 50 ml de una solución conteniendo aspartamo (10 mM), glucosamina (10 mM) y la sucralosa (50 mM). El pH se ajustó a 11, mediante la adición de 0,1 M y 1,0 M de NaOH. Finalmente, se añadió 200 µL de solución HAuCl<sub>4</sub> (50 mM) a la solución acuosa de edulcorante bajo agitación continua. Al principio, la solución permaneció incolora pero con el tiempo se convirtió lentamente en roja, lo que indica la formación de AuNP. La que contenía aspartamo tardó 12 h, la que tenía glucosamina: 1 h, y la que tenía sucralosa sólo 10 min. Las soluciones fueron dejadas en la oscuridad durante 24 h para mayor estabilización.

### **10.1.3 Síntesis de Glu@Ag@Au y Suc@Ag@AuNP**

Las nanopartículas de núcleo de oro, cubierta de plata y rodeadas de glucosamina (Glu@Ag@AuNP) y sucralosa (Suc@Ag@AuNP), fueron sintetizadas de la misma forma que sus análogas con el edulcorante aspartamo, pero variando la concentración de edulcorantes hasta

lograr una eficiente estabilización. Finalmente se eligió 2  $\mu\text{M}$  y 6  $\mu\text{M}$  como concentraciones finales para glucosamina y sucralosa, respectivamente.

#### 10.1.4 Espectrofotometría de absorción electrónica

##### METODOLOGÍA

Para evaluar la estabilidad de las nuevas nanopartículas, se tomaron espectros UV-visibles de las soluciones coloidales de Glu@Ag@AuNP y Suc@Ag@AuNP en PBS (pH 7,4) y en distintos medios de cultivo: Luria Bertani (LB), Medio Mínimo Mineral (M9) y Mueller Hinton (MH). Los espectros fueron tomados con un espectrofotómetro *Shimadzu UV-2600* en la Universidad de Ottawa – Canadá.

##### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 10c A se observan los máximos a 393, 391 y 394 nm para Asp@AgNP, Glu@AgNP y Suc@AgNP respectivamente.

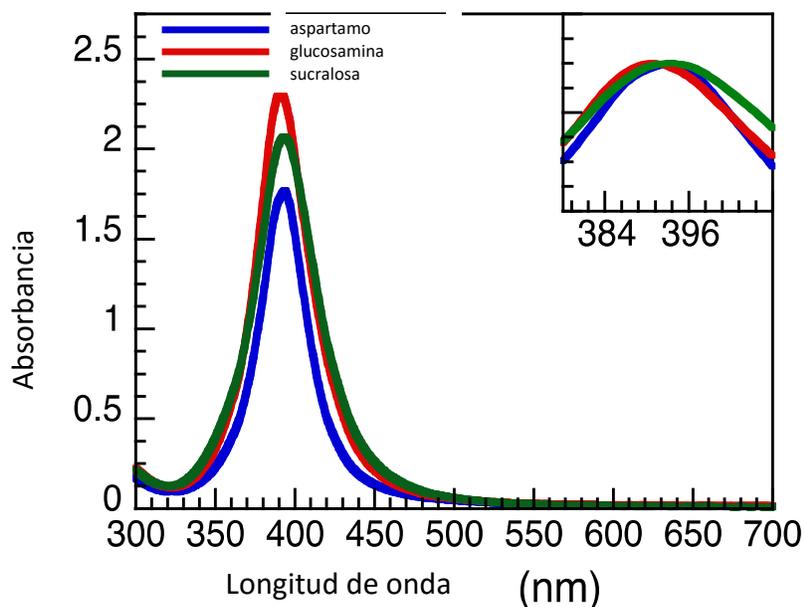


Figura 10c A. Espectros acuosos de nanopartículas “dulces” de plata.

En contraste con las AgNP, las AuNP se sintetizaron sin  $\text{NaBH}_4$ . Partiendo de  $\text{HAuCl}_4$  como precursor, el oro se redujo y se estabilizó con los edulcorantes. Esta propuesta se basó en el hecho de que los estabilizadores utilizados sirven como agentes reductores suaves, debido al hecho de que contienen grupos funcionales como  $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ . El hecho de que el precursor de oro se puede reducir a temperatura ambiente por los edulcorantes, mientras que la sal de plata requiere  $\text{NaBH}_4$  puede explicarse por sus potenciales de reducción correspondientes. El potencial de reducción más alto de  $\text{Au}^{3+}$  ( $E^0 = 1,000$ ) en comparación con el de  $\text{Ag}^+$  ( $E^0 = 0,799$ ), indica que se reduce más fácilmente. También hay que señalar que  $\text{Suc@AuNP}$  se formaron considerablemente más rápido, lo que puede ser atribuido a la formación del complejo entre el cloro y el oro catiónico. Después de dejar que las soluciones coloidales se estabilicen, se observaron los máximos a 520, 522 y 518 nm para  $\text{Asp@AuNP}$ ,  $\text{Glu@AuNP}$  y  $\text{Suc@AuNP}$  respectivamente (Figura 10c B).

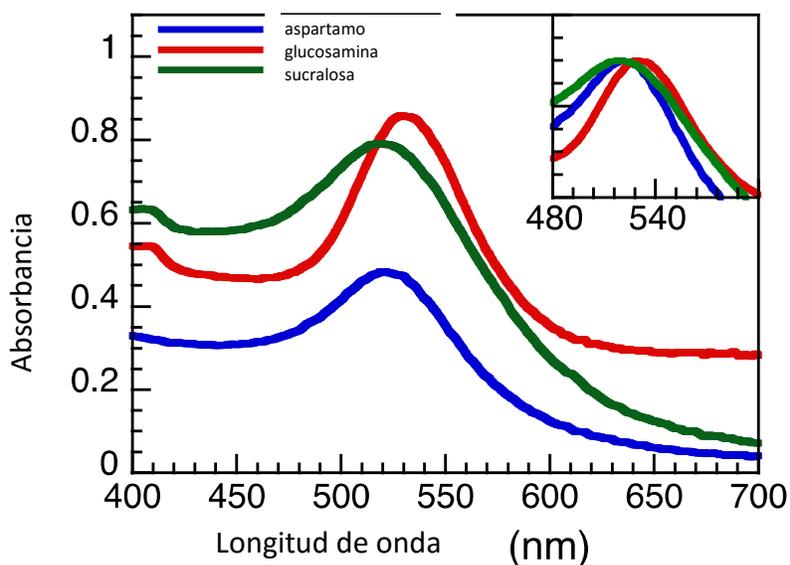


Figura 10c B. Espectros acuosos de nanopartículas “dulces” de oro.

En las soluciones de las nanopartículas bimetalicas se observan los dos máximos correspondientes a la plata y el oro en intensidades similares, ya que la composición fue 50:50. (Figura 10c C). Los picos se encontraron a 390/501, 406/509, 402/533 nm para  $\text{Asp@Ag@AuNP}$  (sintetizadas previamente),  $\text{Glu@Ag@Au}$  y  $\text{Suc@Ag@AuNP}$ , respectivamente.

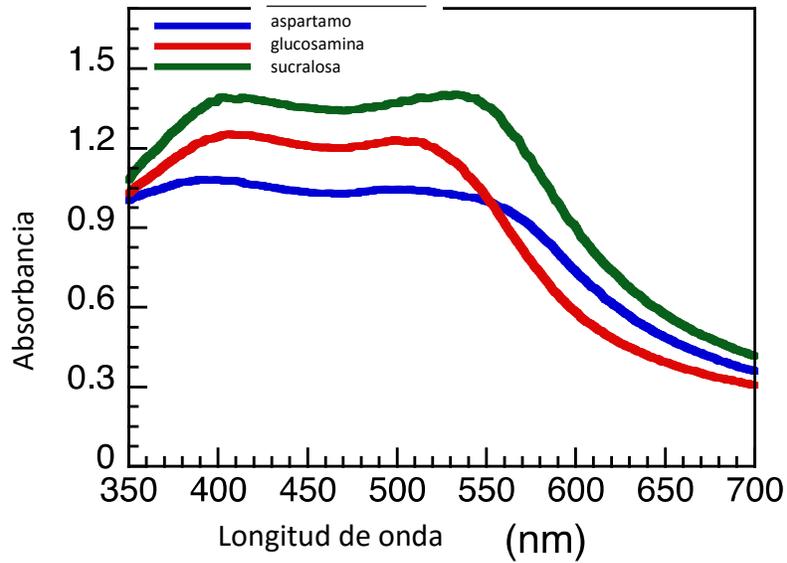
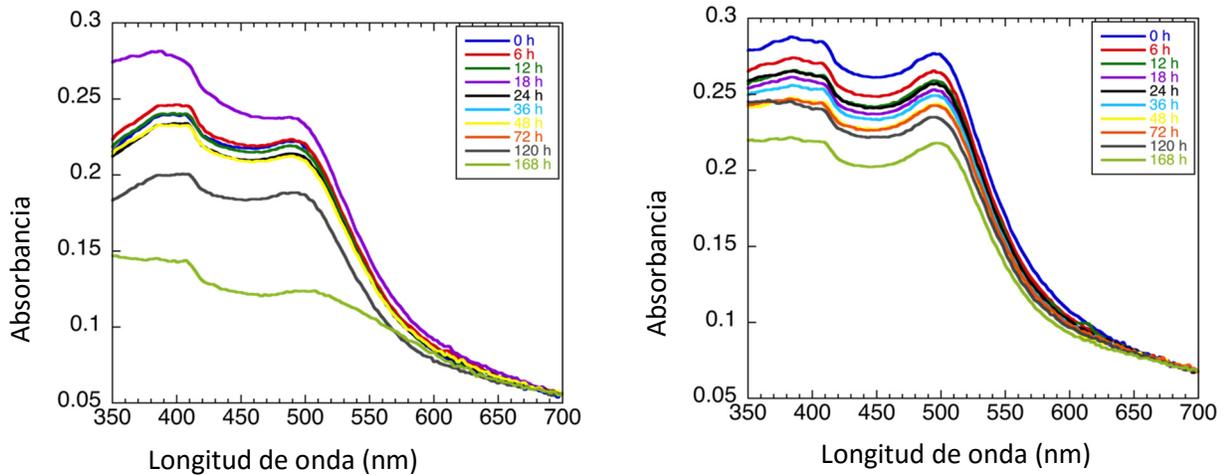


Figura 10c C. Espectros acuosos de nanopartículas “dulces” bimetálicas.

La estabilidad en los medios de cultivo LB, M9 y MH (como se observa en las Figuras 10 d y e) no se mantuvo por más de 48 h, por lo cual los experimentos microbiológicos fueron realizados en solución *buffer* fosfato (pH 7,4) al 12,5 %, en el cual ambas nanopartículas fueron estables durante 3 días, tiempo adecuado para realizar los experimentos microbiológicos.



Figuras 10 d y e. Espectros de Glu@Ag@AuNP y Suc@Ag@AuNP en distintos medios biológicos.

Tabla 10a. Tiempo que toma perder 20 % de la absorbancia inicial a 390 y 530 nm para Ag y Au respectivamente (cuadruplicados de síntesis diferentes).

Muestra	Agua	12,5% salina	12,5% PBS	25% LB	25% M9	75% DMEM	75% KBM
Glu@AgNP	> 168 h	11h	41 h	6 h	6 h	4 h	> 168 h
Suc@AgNP	> 168h	8 h	33 h	9 h	7 h	4 h	> 168 h
Asp@AgNP	> 168 h	> 72h	> 72 h	> 72 h	> 72 h	> 72 h	> 168 h
Glu@AuNP	> 168 h	> 168 h	> 72 h	6 h	> 72 h	> 72 h	> 168 h
Suc@AuNP	> 168 h	> 168 h	> 168 h	> 72 h	> 72 h	> 72 h	> 168 h
Asp@AuNP	> 168 h	> 168 h	> 168 h	6 h	> 72 h	> 72 h	> 168 h
Glu@Ag@AuNP	> 72 h	> 72 h	> 72 h	> 72 h	> 72 h	> 72 h	> 168 h
Suc@Ag@AuNP	> 72 h	> 72 h	> 72 h	> 72 h	> 72 h	> 72 h	> 168 h
Asp@Ag@AuNP	> 72 h	> 72 h	> 72 h	> 72 h	> 72 h	> 72 h	> 168 h

### 10.1.5 Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)

Las imágenes TEM de las nanopartículas de oro y plata revelan que son esféricas y monodispersas, los datos promedios se informan en la Tabla 10b. Aquí se muestran las imágenes de las nanopartículas bimetálicas, Suc@Ag@AuNP (Figura 10f-A) y Glu@Ag@AuNP (Figura 10f-B), las cuales demuestran que también son nanopartículas esféricas, con un diámetro promedio de  $16,0 \pm 4,1$  nm (n total = 349) y  $10,7 \pm 2,1$  nm (n total = 400), respectivamente.

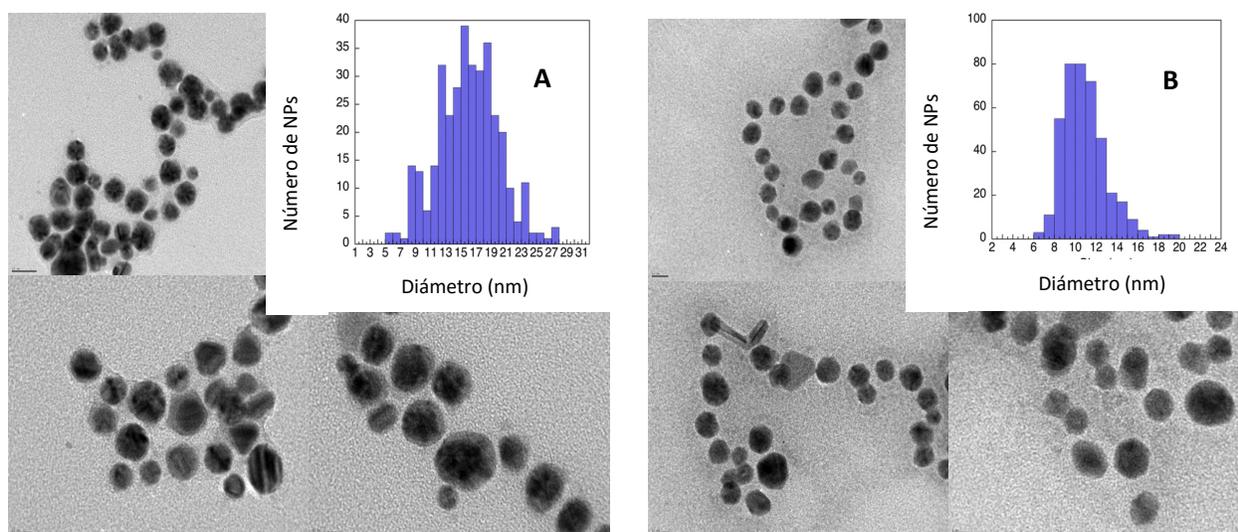


Figura 10f. Imágenes TEM e histogramas de Suc@Ag@AuNP (A) y Glu@Ag@AuNP (B).

### 10.1.6 Resumen de datos obtenidos para la biblioteca de nanopartículas “dulces”

La Tabla 10b presenta los datos obtenidos por TEM, *Dispersive Light Scattering* (DLS)\*\* y medición de potencial  $\zeta$ \*\* obtenidos para las 9 nanopartículas propuestas.

Tabla 10b. Datos promedios de triplicados para las 9 nanopartículas preparadas, con sus respectivas desviaciones estándares.

Nanopartícula	Edulcorante estabilizador		
	Aspartamo	Glucosamina	Sucralosa
<b>AgNP</b>			
Diámetro TEM (nm)	11,8 ± 4,4	28,3 ± 9,9	8,7 ± 2,3
Diámetro DLS (nm)	En curso	56,9 ± 0,1	22,3 ± 0,3
Potencial $\zeta$ (mV)	-57,9 ± 1,2	En curso	-37,0 ± 1,8
<b>AuNP</b>			
Diámetro TEM (nm)	12,4 ± 4,0	16,5 ± 5,2	6,8 ± 1,5
Diámetro DLS (nm)	26,1 ± 2,4	42,0 ± 0,3	16,7 ± 0,2
Potencial $\zeta$ (mV)	-47,3 ± 1,5	-47,4 ± 1,5	-26,6 ± 1,5
<b>AuNP@Ag</b>			
Diámetro TEM (nm)	17,8 ± 4,3	10,7 ± 2,1	16,0 ± 4,1
Diámetro DLS (nm)	66,3 ± 1,0	47,4 ± 0,3	70,3 ± 1,0
Potencial $\zeta$ (mV)	-43,1 ± 0,3	-35,8 ± 0,9	-42,8 ± 0,9

Los tamaños obtenidos a partir de mediciones DLS son mayores a los de TEM porque toman en cuenta al agente estabilizador. Ambas medidas (TEM y DLS) confirman que la sucralosa produjo las partículas más pequeñas de plata y oro. Teniendo en cuenta que se utilizó la misma cantidad de  $\text{NaBH}_4$ , se puede pensar que la sucralosa podría tener un efecto sinérgico durante el proceso de reducción o durante la etapa de coalescencia del crecimiento de las AgNP. También es importante tener en cuenta que los valores de potencial  $\zeta$  por encima y por debajo  $\pm 20$  mV se consideran soluciones coloidales estables, ya que la mayor repulsión de Coulomb inhibe la agregación.

Como se ve en la Tabla 10b, el análisis llevado a cabo en todos los nueve nanomateriales presenta cargas electronegativas inferiores a -20 mV confirmando su estabilidad por la repulsión electrostática.

## 10.2 ESTUDIO CINÉTICO DE LA ACTIVIDAD FOTOANTIMICROBIANA DE Glu@Ag@AuNP y Suc@Ag@AuNP

### METODOLOGÍA

El procedimiento fue el mismo que el empleado para el estudio de los efectos de Asp@Ag@AuNP.

Las concentraciones empleadas fueron equivalentes a la CIM encontrada para las nanopartículas estabilizadas con aspartamo, ya que se esperaba que el efecto fotoantimicrobiano fuera independiente de la molécula utilizada para la cubierta externa. En este caso, se evaluó el comportamiento en el tiempo de suspensiones de cepas clínicas de *Staphylococcus epidermidis* y de *Pseudomonas aeruginosa*, provistas por el Hospital de Niños de Ottawa (CHEO).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las muestras que contenían Glu@Ag@AuNP que no fueron irradiadas (Figuras 10g y 10i) se observó el efecto antibacteriano propio de la cubierta de Ag (barras grises). El recuento en los controles sin nanopartículas se mantuvo constante (barras negras). Las nanopartículas que fueron “activadas” por la luz (Figuras 10h y 10j) lograron una inhibición total del crecimiento para ambas cepas (barras naranjas); mientras que los inóculos irradiados, pero sin tratar, no mostraron alteraciones (barras marrones).

En las suspensiones bacterianas que contenían las nanopartículas *coreshell* estabilizadas con sucralosa y mantenidas en la oscuridad, no se observó el efecto bactericida de la cubierta de plata (barras grises). En las que contenían Suc@Ag@AuNP que fueron irradiadas (Figura 10j), se logró el efecto bactericida, tanto en *S. epidermidis* como en *P. aeruginosa*, pero a tiempos ligeramente más largos que en las que tenían Glu@Ag@AuNP (8 h-Figura 10 j en lugar de 6h-Figura 10h, barras naranjas). Los controles bajo irradiación y en oscuridad, sin nanopartículas, no mostraron cambios en función del tiempo.

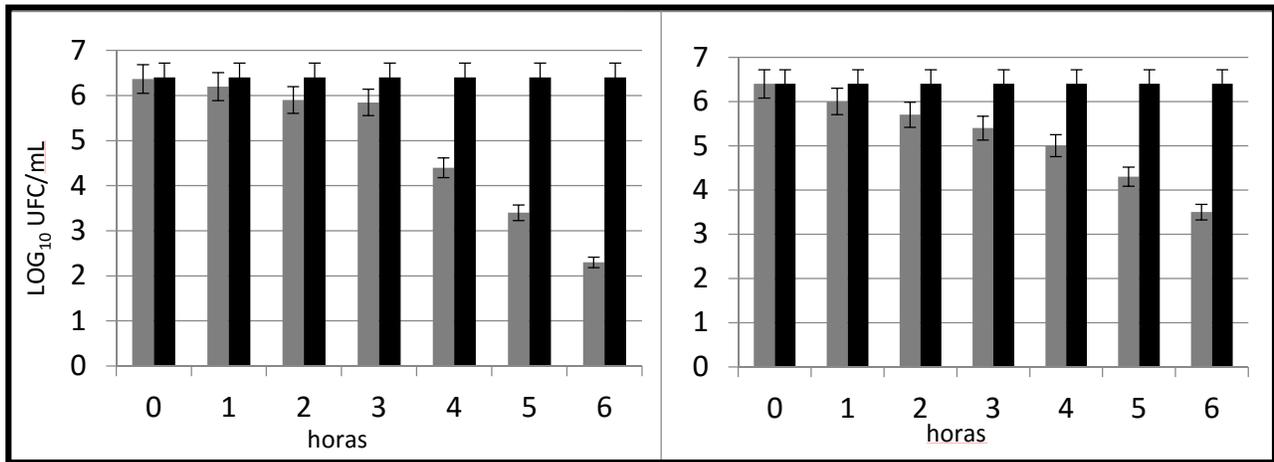


Figura 10g. *S. epidermidis* (izquierda) y *P. aeruginosa* (derecha) con Glu@Ag@AuNP (sin irradiar)

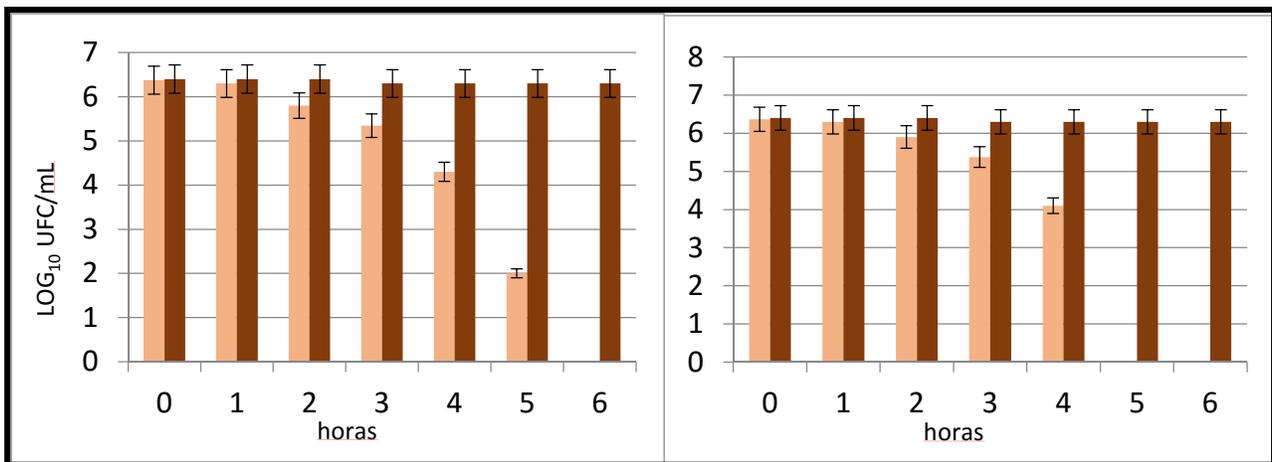


Figura 10h. *S. epidermidis* (izquierda) y *P. aeruginosa* (derecha) con Glu@Ag@AuNP (irradiadas)

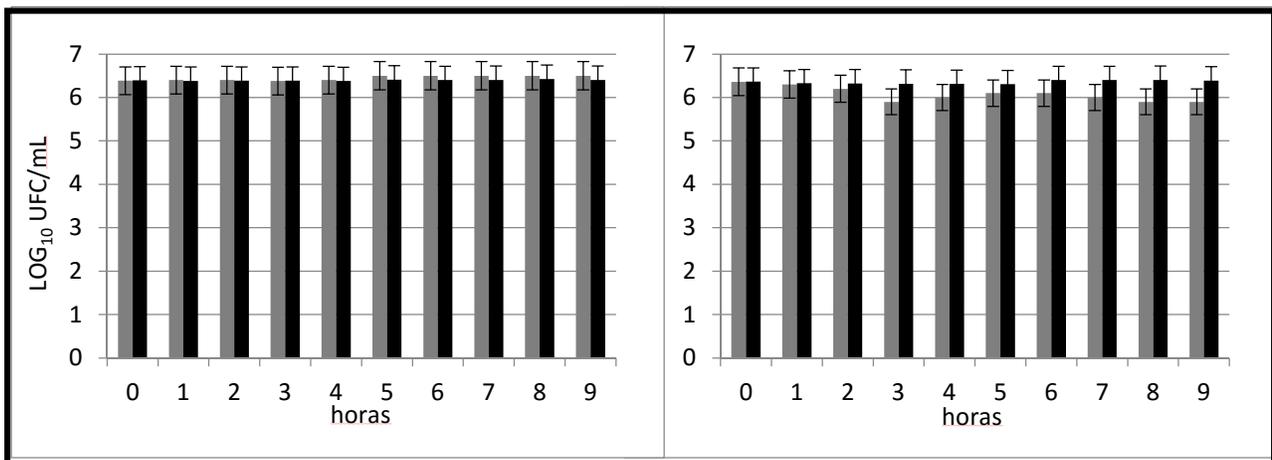


Figura 10i. *S. epidermidis* (izquierda) y *P. aeruginosa* (derecha) con Suc@Ag@AuNP (sin irradiar)

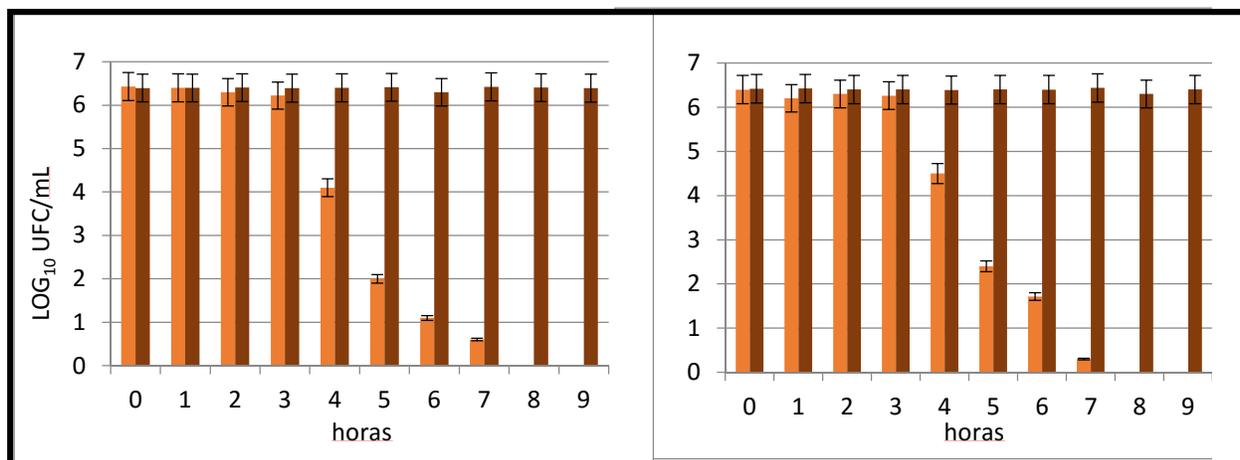


Figura 10j. *S. epidermidis* (izquierda) y *P. aeruginosa* (derecha) con Suc@Ag@AuNP (irrad.)

La similitud entre los resultados hallados en *S. epidermidis* y en *P. aeruginosa* sugiere que el efecto fotoantimicrobiano no se ve influenciado por las diferencias características de cada cepa. La primera es un coco Gram-positivo que normalmente requiere un medio nutritivo para crecer, y la segunda es un bacilo Gram-negativo que se reproduce incluso en agua o superficies.

Por un lado, en los resultados obtenidos con Glu@Ag@AuNP (al igual que con Asp@Ag@AuNP) se nota que el efecto antimicrobiano de la plata no es suficiente para lograr una inhibición completa del crecimiento, sino que es necesaria la irradiación y excitación del plasmón del núcleo de oro. Por otro lado, en las muestras en oscuridad incubadas con Suc@Ag@AuNP no se observó la esperada disminución en el crecimiento, producto de la Ag. Esto sugiere que la estabilización con sucralosa interfiere de alguna manera en el mecanismo por el cual se lograba dicha inhibición.

En condiciones normales, la sucralosa se absorbe mal, y la mayor parte pasa a través del canal digestivo sin cambios. En el hombre, menos de 5% de la dosis oral se biotransforma a un conjugado glucurónico y se elimina por la orina. A su vez, más de 100 estudios en estas especies demuestran que la sucralosa es segura. <sup>3</sup> La sucralosa, al contrario de la sacarosa por ejemplo, no favorece el crecimiento de cepas bacterianas orales. Young DA *et al.* (1990). <sup>4</sup> describe que ninguno de los diez microorganismos probados parece tener la capacidad de producir ácido a partir de la sucralosa. Estos resultados difieren de otros trabajos que mostraron que la sucralosa

es anti-acidogénica cuando se prueba en combinación con sacarosa.<sup>5</sup> Es posible que las diferencias en los resultados dependan de los medios de cultivo utilizados y las cepas, que eran distintas, por lo cual no se pueden comparar con seguridad. Son necesarios más estudios, en condiciones controladas, para esclarecer la influencia de la sucralosa en el crecimiento bacteriano y en el mecanismo de acción de las nanopartículas estabilizadas con ella.

### CONCLUSIONES PARCIALES

- *Se sintetizó y caracterizó una librería de nanopartículas de plata, de oro y bimetálicas estabilizadas con edulcorantes biocompatibles, que resultaron suficientemente estables en PBS, DMEM y KBM para realizar ensayos microbiológicos y celulares.*
- *Estas nanopartículas demostraron mantener el efecto bactericida sin importar cuál era el edulcorante estabilizador, lo que prueba que es producto de la excitación del núcleo de oro y la cubierta de plata, como se propuso en el CAPITULO 9.*

\*Experimentos realizados bajo la supervisión del Dr. Scaiano en la Universidad de Ottawa – Canadá.

\*\* Las síntesis 10.1.1 y 10.1.2 fueron realizadas con la colaboración del estudiante Has De Alwis. Las mediciones por DLS y del potencial  $\zeta$  fueron realizadas enteramente por él y se mencionan en la presente tesis a modo comparativo.

---

### **BIBLIOGRAFÍA**

- <sup>1</sup> Shekhar A, Soumyo M, Mukherji S. *RSC Adv.*, 2014; 4, 3974-3983
- <sup>2</sup> Quin BM, Laaksonen T, Ruiz V, Liljeroth P. *Chem. Soc. Rev* 2008; **37**: 1836–1846
- <sup>3</sup> Grice HA. *Food and Chemical Toxicology*. 1990; 10: 265-286
- <sup>4</sup> Young DA, Bowen WH. *J Dent Res*. 1990; 69 (8): 1480-1484
- <sup>5</sup> Drucker DB. *Arch Oral Biol*. 1983; 28: 833-837

---

## 11. CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECCIONES

### 11.1 RESUMEN DE AVANCES EN EL DESARROLLO DE NUEVOS FOTOSENSIBILIZADORES

En la presente tesis doctoral se han diseñado, sintetizado y caracterizado una biblioteca de nanopartículas diferentes: de oro (AuNP por tres métodos distintos), de AgNP, y bimetálicas Ag@AuNP con aspartamo, glucosamina y sucralosa, y un complejo homoléptico de Cr (III) con propiedades fotoquímicas necesarias para ser empleados como fotosensibilizadores (FS) en Terapia Fotodinámica. Sin embargo, luego de los estudios fisicoquímicos, microbiológicos y celulares realizados, se concluye que las Asp@Ag@AuNP serían las más convenientes para la Terapia Fotodinámica Antibacteriana (PACT) porque presentan las siguientes cualidades:

- síntesis rápida y sencilla
- solubilidad y estabilidad adecuadas en medios biológicos
- absorción en rango visible del espectro electromagnético
- efecto bactericida al cabo de pocas horas de irradiación tanto en cepas bacterianas de referencia como en cepas clínicas
- bajas probabilidades de producir resistencia en los microorganismo dado el mecanismo de acción propuesto a través de la generación de grandes cantidades de especies reactivas del oxígeno

Es importante mencionar, que las B-AuNP obtenidas a partir de la síntesis con borohidruro de sodio tienen las mismas características pero requieren 9 horas en lugar de 6 para lograr la inhibición completa del crecimiento bacteriano.

### 11.2 RESUMEN DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS

Numerosas técnicas de síntesis orgánica e inorgánica se utilizaron para la obtención del complejo del Cr (III) y las nanopartículas, desde reacciones a reflujo, por extracción con Soxhlet, en atmósfera “seca” en el interior de una *glove box*, sin solventes en un reactor de microondas y fotoquímicamente iniciadas dentro de un fotoreactor. Por otro lado, para la caracterización de los nuevos FS, se realizaron mediciones de espectros de absorción electrónica, espectros

infrarrojos y de resonancia magnética (de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ). Además, en particular para la descripción de las nanopartículas presentadas en la biblioteca se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM), como así también la espectroscopía de energía dispersa (EDS) y medición de potencial  $\zeta$ . Entre las fuentes lumínicas de energía se han empleado láseres continuos, lámparas de UV y paneles LED contruidos especialmente para PACT. Para los ensayos microbiológicos, se han adaptado técnicas rutinarias de cultivo a las soluciones coloidales de nanopartículas y se han puesto a punto protocolos para la medición de daño macromolecular basándose en los utilizados para células eucariotas. También se han optimizado procedimientos de microscopía de fluorescencia para la detección de especies reactivas del oxígeno en suspensiones bacterianas, y microscopía electrónica de transmisión para la observación de la interacción de nanopartículas con las bacterias. Por último, las técnicas de cultivo celular fueron adaptadas para ser realizadas con la irradiación necesaria por la PACT.

### 11.3 PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS

#### INVESTIGACIÓN

- *"TUNING PLASMON TRANSITIONS AND THEIR APPLICATIONS IN ORGANIC PHOTOCHEMISTRY"* Scaiano JC, Netto-Ferreira JC, Alarcon E, Billone P, Bueno Alejo CJ, Crites CO, Decan M, Fasciani C, González-Béjar M, Hallett-Tapley G, Grenier M, McGilvray KL, Pacioni NL, Pardoe A, René-Boisneuf L, Schwartz-Narbonne R, Silvero MJ, Stamplescokie KG, and Wee TH – *J. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*. 2011; 83 (4): 913-930
- *"PLASMON-MEDIATED CATALYTIC OXIDATION OF SEC-PHENETHYL AND BENZYL ALCOHOLS"* Hallett-Tapley G, Silvero MJ, González-Béjar M, Grenier M, Netto-Ferreira JC, Scaiano JC. *Journal of Physical Chemistry – ACS* – 2011; 115: 10784–10790
- *"SUPPORTED GOLD NANOPARTICLES AS EFFICIENT CATALYSTS IN THE SOLVENTLESS PLASMON MEDIATED OXIDATION OF SEC-PHENETHYL AND BENZYL ALCOHOL"* Hallett-Tapley G, Silvero MJ, Bueno Alejo C, González-Béjar M, McTiernan C, Grenier M, Netto Ferreira JC, Scaiano JC. *J. Phys. Chem. ACS*. 2013; 117 (23): 12279–12288
- *"FAST SYNTHESIS OF TRIS(N,N-DIIMINE)CHROMIUM(III) COMPLEX BY A MICROWAVE-*

ASSISTED APPROACH.” Silvero, MJ, Pelaez WJ, Garcia, PF, Argüello GA. *RSC Advance.*, 2014; 4: 15507-155010

- “PHOTODYNAMIC ANTIBACTERIAL CHEMOTHERAPY (PACT) AGAINST STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND ESCHERICHIA COLI USING GOLD NANOPARTICLES AND LED’S IRRADIATION” Silvero MJ, Argüello GA, Becerra MC. *J. Nanopharmaceutics Drug Delivery* 2014; 2: 1–5
- “BINDING OF  $[\text{Cr}(\text{phen})_3]^{(3+)}$  TO TRANSFERRIN AT EXTRACELLULAR AND ENDOSOMAL PHs: POTENTIAL APPLICATION IN PHOTODYNAMIC THERAPY”. Garcia PF, Toneatto J, Silvero MJ, Argüello GA. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1840 (9): 2695-701
- “ASPARTAME-STABILIZED GOLD-SILVER BIMETALLIC BIOCOMPATIBLE NANOSTRUCTURES WITH PLASMONIC PHOTOTHERMAL PROPERTIES, ANTIBACTERIAL ACTIVITY, AND LONG-TERM STABILITY”. Fasciani C, Silvero MJ, Anghel MA, Argüello GA, Becerra MC, Scaiano JC. *JACS.* 2014; 136 (50): 17394-17397

### EDUCACIÓN

- “METHYL RED: A CHAMELEON THAT REVEALS THE PARTITION BETWEEN TWO PHASES AS A FUNCTION OF PH. AN EXTRACTION EXPERIMENT” Silvero MJ, Malanca FE, Gómez CG, Fraire JC, Argüello GA. *Journal The Chemical Educator.* 2012: 17: 163-165

### **11.4 FUTUROS EXPERIMENTOS**

En el desarrollo del posdoctorado, en colaboración con el grupo del Dr. JC Scaiano (Co-Director), se sintetizarán las nanopartículas más estables y convenientes como FS para PACT: (Asp@Ag@AuNP) y B-AuNP.

Posteriormente, se profundizará la investigación de la interacción entre nanopartículas y bacterias mediante la evaluación de la respuesta al estrés oxidativo originado al ser excitadas. Existen diversos sistemas antioxidantes, pero la primera línea de defensa contra las ERO es el sistema enzimático integrado por tres enzimas principales: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. La actividad de cada enzima será medida individualmente y la capacidad antioxidante total, que incluye también los mecanismos de protección no enzimáticos (glutatión,

ascorbato, compuestos fenólicos, carotenos, etc.), será evaluada mediante la técnica “Ferrous Reduction Antioxidant Potency” (FRAP).

Por otro lado, se realizarán ensayos *in vivo* para analizar la biodistribución de nanopartículas luego de su administración tópica, oral y parenteral a animales de experimentación. Se utilizarán ratas Wistar hembras de dos meses de edad, mantenidas en el Bioterio del Dpto. de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC-IFEC-CONICET. Los animales serán administrados con las nanopartículas desarrolladas durante la tesis doctoral, con una dosis no superior a la CIM encontrada para cada tipo en particular (oscila entre 12 y 100  $\mu\text{M}$ ) por vía intraperitoneal y oral, y luego serán sacrificados a diferentes tiempos (12, 24, 48 h) para determinar la distribución de las nanopartículas en sangre y en diferentes órganos, como cerebro, hígado, bazo, riñón y corazón. Estos estudios permitirán avanzar aún más en la aplicación clínica de estos FS en particular y de la PACT en general.

## ANEXO

### A.1 PANELES LED (525 nm y 400 nm) CONSTRUIDOS *ad hoc*

Cada panel cuenta con 24 *Light Emitting Diodes* (LED) de 10 mm, ubicados de forma que cada uno emita (525 o 400 nm) directamente bajo un *well*.



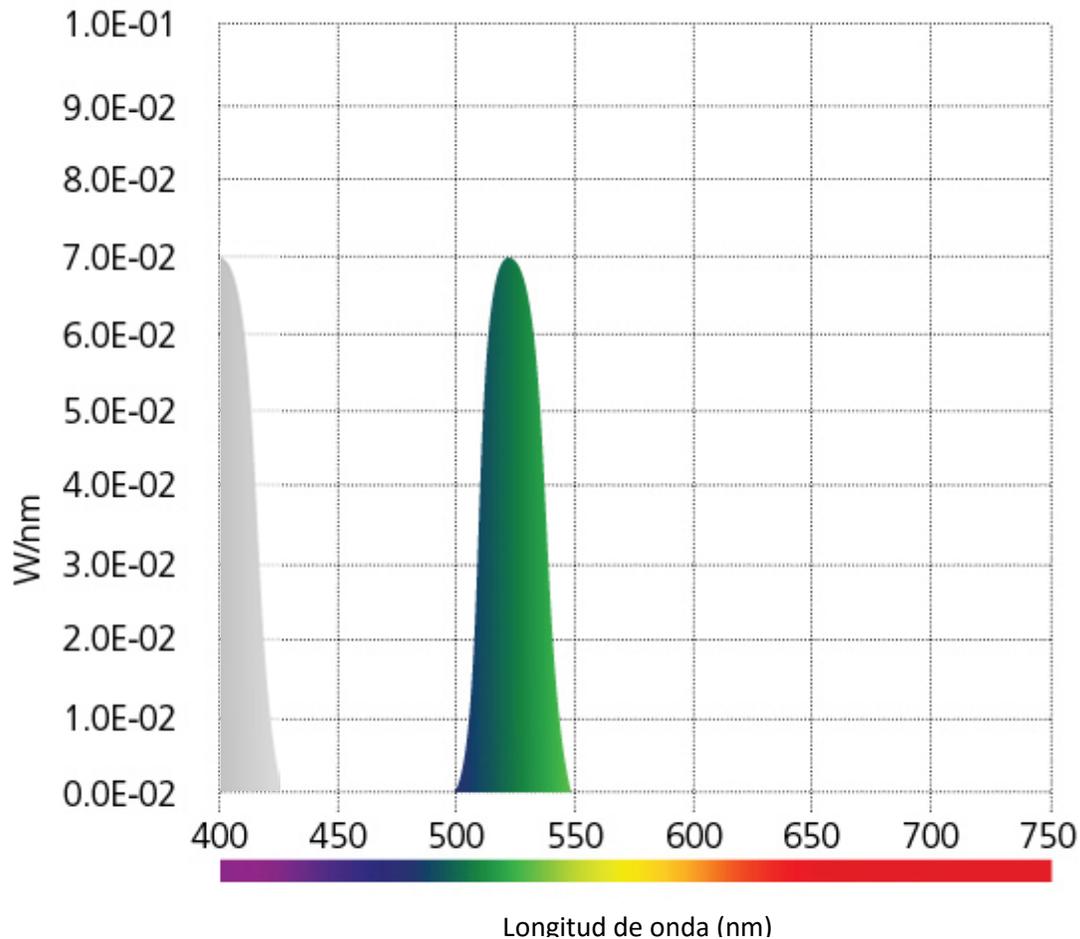
Funcionan conectados a una fuente eléctrica que le proporciona 18 V.



Este arreglo permite irradiar el *wellplate* de forma homogénea y sin generar calor adicional al de la estufa de incubación. La temperatura entre los LED fue medida con un termómetro de mercurio LED y no se observó aumento significativo respecto a los 37 ° C. La

temperatura en las muestras líquidas fue seguida con un termómetro infrarrojo, y la misma se mantuvo estable en los controles pero subió 0,3 °C en las muestras que contenían nanopartículas con oro. Esto puede ser una señal macroscópica del efecto fototérmico producto de la excitación del plasmón a su longitud de onda de resonancia: 525 nm.

Una fuente de irradiación selectiva permite atribuir los efectos observados en la muestra solamente a la absorción fotosensibilizador. Por el contrario, cuando se utiliza una fuente de luz blanca (como una lámpara fluorescente, incandescente o el sol), lo observado podría ser producto de la interacción electromagnética con moléculas biológicas; por ejemplo en el caso de la destrucción del ADN por los rayos UV solares.<sup>1</sup>



## A.2 GLOVE BOX CONSTRUIDA *ad hoc*

La caja seca se armó a partir de una pecera de vidrio, a la cual se le agregaron 2 llaves una que se conectó a una bomba de vacío y otra a un tubo  $N_2$ . Además se le realizaron dos orificios para introducir las manos. El sistema se selló con silicona y su eficiencia fue comprobada al mantener seco (color púrpura) el sólido extremadamente higroscópico  $CrCl_3 \cdot 3THF$



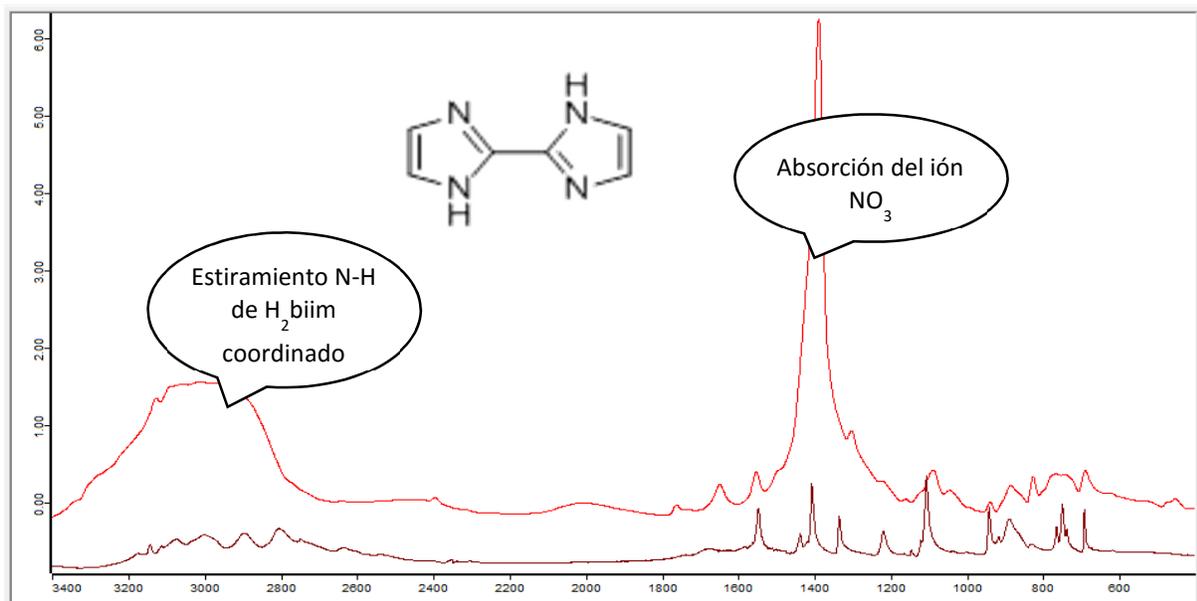


En su interior se colocaron recipientes con  $\text{CaCl}_2$  y con sales de cobalto para comprobar visiblemente el contenido de humedad.

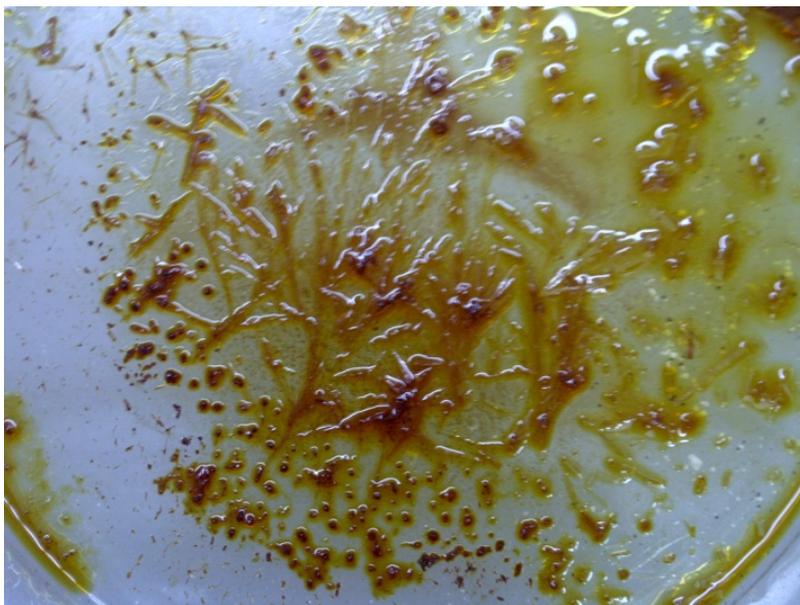


### A.3 COMPLEJO [Ag(H<sub>2</sub>biim)]NO<sub>3</sub>

El espectro IR de [Ag(H<sub>2</sub>biim)]NO<sub>3</sub> muestra el estiramiento característico N-H (3141-2810 cm<sup>-1</sup>) del H<sub>2</sub>biim y la absorción del ión nitrato (1360 cm<sup>-1</sup>), indicando que el sólido es un complejo que involucra ambos. <sup>2</sup>

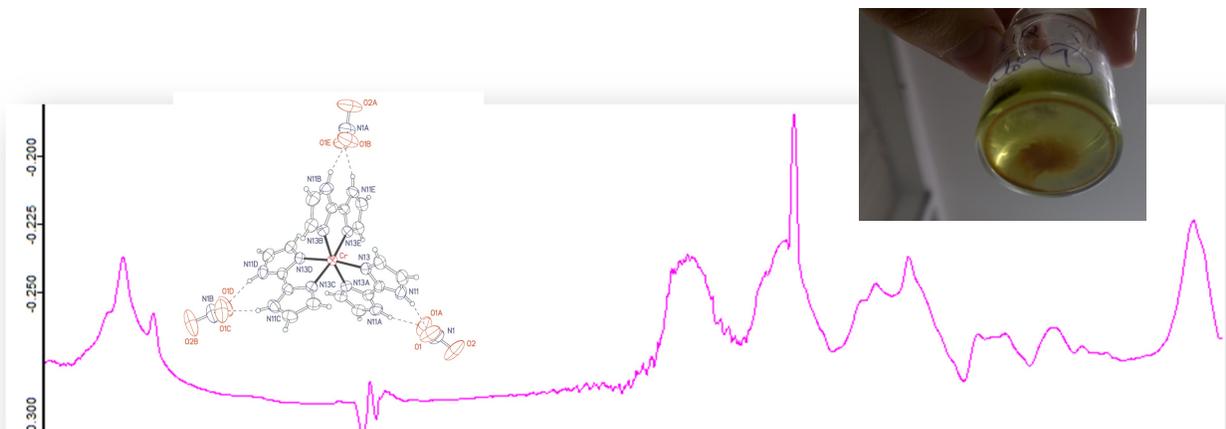


Cristales “dorados columnares” del complejo en proceso de formación:



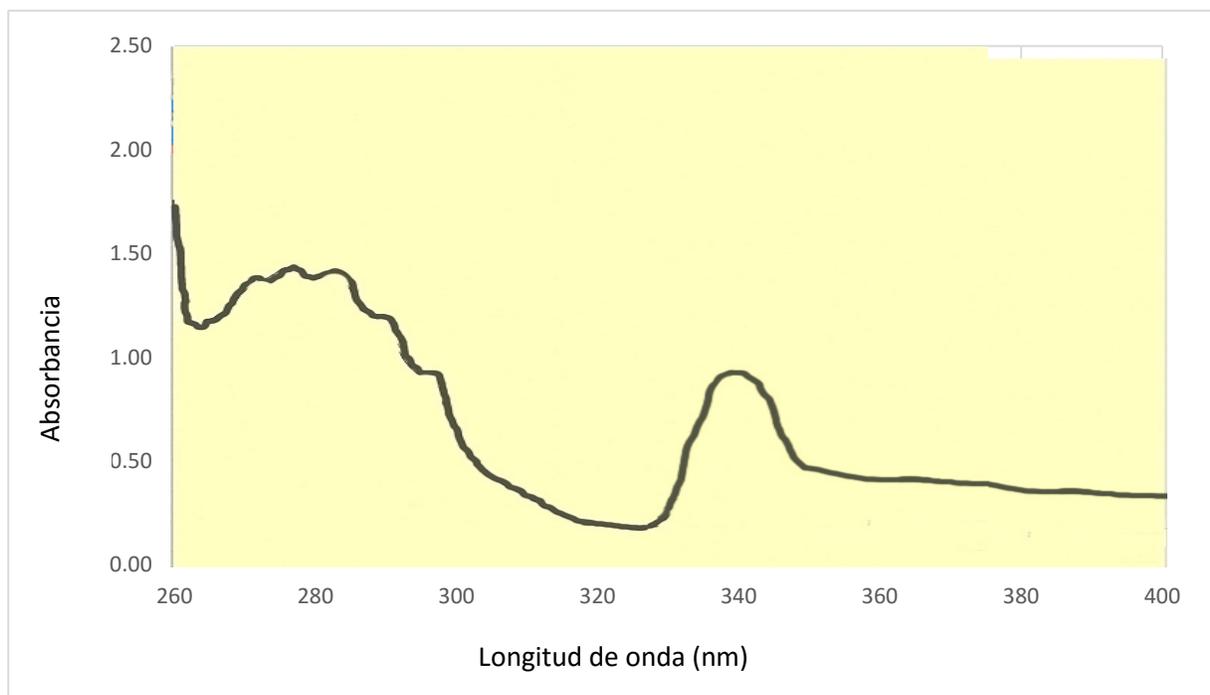
#### A.4 COMPLEJO Cr(H<sub>2</sub>biim)NO<sub>3</sub>

El espectro IR del complejo final del Cr (III) mostrando la interacción del Cr-N (505 cm<sup>-1</sup>).



Espectro de absorción electromagnética del complejo Cr(H<sub>2</sub>biim)NO<sub>3</sub> en DMSO 10%, en el cual se observa evidencia de las transiciones internas del 2,2' bisimidazol: 275, 283, 288 y 296 nm y del Cr (III) coordinado: 340 nm. Los coeficientes de absorción determinados son los siguientes:

$$\epsilon_{275\text{nm}} = 52315 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}; \epsilon_{340\text{nm}} = 29381 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}; \epsilon_{400\text{nm}} = 21333 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$



---

**BIBLIOGRAFÍA**

<sup>1</sup> Sharpe M. *J. Environ. Monit.* 2002; 4: 511–516

<sup>2</sup> Sowwan M, Haj MA, Faroun M, Hawash Z, Ghabboun J, Rida A, Karmi A, Sultan W, Hussein GA. *J. of Nanomaterials* 2010; article ID 706920