



Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

COMPUESTOS NATURALES FOTOSENSIBILIZANTES COMO POTENCIALES AGENTES ANTIFÚNGICOS SOBRE BIOFILMS

Farm. Juliana Marioni

Córdoba, Argentina

2017.

Directora de Tesis: Dra. Susana C. Núñez Montoya

Co-Directora de Tesis: Dra. María G. Paraje

Comisión Asesora: Dra. Andrea M. Smania

Dr. Juan E. Argüello



Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

COMPUESTOS NATURALES FOTOSENSIBILIZANTES COMO POTENCIALES AGENTES ANTIFÚNGICOS SOBRE BIOFILMS

Farm. Juliana Marioni

Córdoba, Argentina

2017.

Directora de Tesis: Dra. Susana C. Núñez Montoya

Co-Directora de Tesis: Dra. María G. Paraje

Comisión Asesora: Dra. Andrea M. Smania

Dr. Juan E. Argüello

*A mis padres y hermano,
por su amor y apoyo incondicional*

Agradecimientos

Este trabajo de tesis doctoral, es un esfuerzo en el cual han contribuido distintas personas, directa e indirectamente, a lo largo de todos estos años. Por ello, me gustaría tener unas palabras de agradecimiento a las siguientes personas:

A mi directora de tesis, Dra. Susana Núñez Montoya, por su dedicación, por brindarme todo el tiempo necesario para discutir resultados y aclarar dudas, por su valiosa guía y paciencia. Su experiencia y educación han sido cualidades motivadoras todos estos años para mi formación académica y personal. Gracias de corazón.

A la Dra. Ma. Gabriela Paraje, por abrirme las puertas de su laboratorio, por transmitirme sus conocimientos y experiencias, por todas sus ideas, consejos y discusiones, por su dedicación a mejorar mi formación.

A los miembros de mi comisión de tesis: Dra. Andrea M. Smania y Dr. Juan E. Argüello, por sus aportes recibidos durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Cabrera, por su responsabilidad y sabiduría que también ayudaron a mi formación.

Al Dr. Santiago Nonell, por haberme permitido realizar una pasantía en su Laboratorio de Fotoquímica del Instituto Químico de Sarriá, poniendo a mi disponibilidad el equipamiento e infraestructura, y principalmente por haber hecho que mi estadía en Barcelona haya sido tan agradable..

A la Dra. Adriana Casas, por permitirme trabajar en su laboratorio perteneciente al Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP- CONICET), por estar dispuesta a enseñar y transmitir sus conocimientos.

A mis compañeras de Farmacognosia, por su predisposición y compañerismo que hacen tan ameno el día a día. Por aguantarme y escucharme estos años de alegría y de llanto. A las grandes amigas que encontré allí, Dani y Pame, gracias por los buenos momentos vividos,

por su apoyo y palabras de aliento que nunca faltan. Por estar siempre que las necesité.

Al grupo de microbiología, desde los que me ayudaron en mis comienzos hasta los que están actualmente, por el buen humor y alegría que transmiten, por estar siempre dispuestas a darme una mano. Por su contención y en especial, por brindarme su amistad.

A Brenda, gracias por su predisposición y por esa energía avasallante que contagia.

A mis amigas, las de toda la vida, las de la facu, las que aparecieron en el momento indicado, Carla, Vengi, Juli, Lau, Clari, Euge, Meli, Lali, se merecen muchas y buenas palabras por tanto compartido, lo cual no tiene precio. Gracias por estar pendientes de mis cosas. Por acompañarme en las buenas y en las malas, por que a pesar de las distancias su amistad es incondicional.

A Gastón, por escucharme y aconsejarme. Agradezco su compañía en los momentos más difíciles y en los de felicidad.

A toda mi familia, abuelos, tías, primos, por compartir y disfrutar cada uno de mis logros.

A mi hermano, por compartir la vida, por enseñarme tanto y estar siempre presente.

Todo esto no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mis padres, que me han dado todo y más. Me han inculcado valores, me han enseñado que todo se puede, con paciencia, perseverancia y respeto. Gracias por su amor. Gracias, gracias por tanto!

Resumen

En las últimas décadas, la incidencia de las infecciones fúngicas invasivas por patógenos oportunistas ha aumentado, asociada con altas tasas de morbi-mortalidad. *Candida tropicalis* se ha informado como uno de los patógenos más comúnmente aislado, presentando alta capacidad de formación de biofilms. Esta forma de crecimiento de las levaduras estaría involucrada en la generación de resistencia a la mayoría de todos los antifúngicos utilizados en la actualidad. En este contexto, la Terapia Fotodinámica antimicrobiana (TFDa) se presenta como una alternativa, ya que busca inactivar microorganismos mediante una foto-oxidación biológica mediada por especies reactivas de oxígeno (ERO).

El objetivo de esta tesis doctoral fue identificar compuestos naturales fotosensibilizadores, con efecto antifúngico sobre biofilms de *C. tropicalis*, aplicando protocolos de inactivación fotodinámica *in vitro*.

Se evaluó la fotoinactivación *in vitro* de biofilms de *C. tropicalis* por la acción de extractos y antraquinonas (AQs) aisladas de una planta fototóxica, *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae). Asimismo, se estudió si el efecto observado está relacionado con el estrés oxidativo y nitrosativo como consecuencia de los mecanismos fotosensibilizantes. Para ello, se evaluó la generación de ERO y especies reactivas del nitrógeno, así como las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas del sistema biológico estudiado.

Se demostró que el efecto antibiofilm de los extractos bajo la acción de la luz está relacionado con el alto contenido de AQs fotosensibilizadoras. A su vez, las principales AQs presentes en el extracto fotoactivo, rubiadina y 1-metil éter de rubiadina, exhibieron un significativo efecto antibiofilm sólo bajo irradiación, el cual fue dependiente de la cepa de *C. tropicalis* estudiada (cepa clínica CRF6 y cepa de referencia NCPF 3111). Estas AQs produjeron 63,5 y 47 % de reducción (%R), respectivamente, sobre el biofilm de la cepa de referencia, y ambas generaron un 82,1 - 81,8 %R sobre el biofilm de la cepa clínica. A su vez, se estableció que este efecto fue mediado por un marcado desbalance oxidativo y nitrosativo, siendo rubiadina más activa que su derivado metilado. Esto se observó tanto sobre la cepa de referencia como sobre la cepa clínica, ya que para alcanzar los porcentajes de reducción arriba mencionados, fueron necesarias menores concentraciones de rubiadina.

La evaluación de los mecanismos fotodinámicos Tipo I (producción de radical anión superóxido, $O_2^{\bullet-}$) y Tipo II (generación de oxígeno singlete, 1O_2) indicó que la

reducción del biofilm de *C. tropicalis* por ambas AQs bajo irradiación, está mediado principalmente por un significativo aumento en la producción de $O_2^{\bullet-}$ (Tipo I). Si bien se observó la producción de 1O_2 en biofilms, su participación en la fotoinactivación sería insignificante.

Asimismo, como consecuencia de la elevada generación de $O_2^{\bullet-}$ se detectó un incremento en los niveles de óxido nítrico. Probablemente como una respuesta a esta ERO, generando un estrés nitrosativo que también estaría involucrado en el efecto antibiofilm.

La activación de las defensas antioxidantes (enzimáticas y no enzimáticas) del biofilm estaría contrarrestando el estrés oxidativo y nitrosativo, produciendo una importante reducción en la biomasa, sin lograr la erradicación de los mismos.

Por otro lado, se pudo incrementar el efecto antibiofilm de 1-metil éter de rubiadina sobre la cepa de referencia (62,9 %R) con períodos consecutivos de irradiación (15 min de luz) durante la incubación (0, 3, 6, 24, 27 y 30 h), dado que alcanzó un mayor porcentaje de acumulación en el biofilm respecto a rubiadina a las 3 h de incubación (22,4 % vs 1,22 %).

A su vez, se demostró que cada AQ podría utilizarse combinada con Anfotericina B (AMB), ya que al ser irradiadas potenciaron la actividad de este antifúngico sobre biofilms de *C. tropicalis*. De esta forma, las AQs podrían usarse en concentraciones por debajo de la Concentración Inhibitoria Mínima fotoactiva, lo cual permitiría disminuir los efectos secundarios de AMB. Similar potenciación se observó cuando ambas AQs fueron combinadas entre sí y fotoestimuladas. Incluso se potenció aún más la actividad antibiofilm de las combinaciones cuando se aumentó la frecuencia de irradiación, específicamente para 1-metil éter de rubiadina se logró un 82 %R. Por lo tanto, el desbalance de los sistemas de defensa antioxidante junto con la TFDa, podría ser una nueva estrategia para mejorar la actividad de los agentes antifúngicos como AMB, convirtiéndose en una alternativa para el desarrollo de tratamientos antifúngicos más eficaces.

En conclusión, ambas AQs naturales, rubiadina y 1-metil éter de rubiadina, lograron fotoinactivar biofilms de *C. tropicalis*, ya sea solas o combinadas con AMB. Por lo tanto, poseen potencial aplicación en TFDa para el tratamiento de infecciones generadas por biofilms de *C. tropicalis*.

Abstract

In the last decades, the incidence of invasive fungal infections by opportunistic pathogens has increased, associated with high rates of morbidity and mortality. *Candida tropicalis* has been reported as one of the most commonly isolated pathogens, presenting high capacity for biofilm formation. This form of yeast growth would be involved in generating resistance to most of all antifungal currently agents used in therapy. In this context, antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) is presented as an alternative, since it can inactivate microorganisms by means a biological photo-oxidation mediated by reactive oxygen species (ROS).

The aim of this thesis was to identify natural photosensitizing compounds with antifungal effect against *C. tropicalis* biofilms, by applying *in vitro* protocols of photodynamic inactivation.

It was assessed the *in vitro* photoinactivation of *C. tropicalis* biofilms by the action of extracts and anthraquinones (AQs) isolated from a photo-toxic plant, *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (*Rubiaceae*). In addition, it was evaluated whether the observed effect was related to oxidative and nitrosative stress as a consequence of photosensitizing mechanisms. For this, the generation of reactive oxygen species and reactive nitrogen species, as well as the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses of the biological system were studied.

It was shown that the antibiofilm effect of extracts under light action is related to the high content of photosensitizing AQs. Moreover, the main AQs present in the photoactive extract, rubiadin and rubiadin 1-methyl ether, exhibited a significant antibiofilm effect under irradiation, which was dependent on *C. tropicalis* strain studied (a clinic strain CRF6 and a reference strain NCPF 3111). They produced a 63.5 and 47 percentage of reduction (%R), respectively on the reference strain biofilms (NCPF), and both AQs generated an 82.1 - 81.8 %R on the clinical strain biofilms. In addition, it was established that this effect was mediated by a marked oxidative and nitrosative imbalance, with rubiadin being more active than its methylated derivative. This was observed in the reference strain as well as in the clinical strain, since less concentrations of rubiadin were required to achieve the above mentioned reduction percentages.

The evaluation of the photodynamic mechanisms Type I (production of superoxide anion radical, $O_2^{\bullet-}$) and Type II (generation of singlet oxygen, 1O_2) indicated that the reduction of the *C. tropicalis* biofilms by both AQs under irradiation is mainly mediated by a significant increase in the production of $O_2^{\bullet-}$ (Type I). Although the 1O_2 production was observed in biofilms, its participation in photoinactivation would

seem to be insignificant.

In addition, as a consequence of the high $O_2^{\bullet-}$ generation, an increase in nitric oxide levels was detected. Probably as a response to this ERO, generating a nitrosative stress that would also be involved in the antibiofilm effect.

Activation of the antioxidant (enzymatic and non-enzymatic) defenses of the biofilm would be counteracting the oxidative and nitrosative stress, producing a significant reduction in the biomass, without achieving the eradication of the same ones.

On the other hand, it was possible to increase the antibiofilm effect of rubiadin 1-methyl ether against the reference strain (62.9 %R), by applying consecutive irradiation periods (15 min light) during incubation (0, 3, 6, 24, 27 and 30 h). This was possible because this AQ reaches a higher accumulation percentage in the biofilm compared to rubiadin at 3 h of incubation (22.4 % vs. 1.22 %).

Furthermore, each AQ could be used in combination with Amphotericin B (AMB), since when irradiated they potentiate the activity of this antifungal on *C. tropicalis* biofilms. Thus, they could be used in concentrations below the Minimum Inhibitory Photoactive Concentration, which would decrease the side effects of AMB. A similar potentiation was observed when both AQs were combined with each other and photo-stimulated. Even the antibiofilm activity of the combinations was further potentiated when the frequency of irradiation was increased, specifically for rubiadin 1-methyl ether that achieved 82 %R. Therefore, the imbalance of antioxidant defense systems together with aPDT could be a new strategy to improve the activity of antifungal agents like AMB, becoming an alternative for the development of more effective antifungal treatments.

In conclusion, two natural AQs, rubiadin and rubiadin 1-methyl ether, were able to photoinactivate biofilms of *C. tropicalis*, either alone or in combination with AMB. Therefore, they have potential application in aPDT for the treatment of infections generated by *C. tropicalis* biofilms.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	I
I- INTRODUCCIÓN.....	1
I.1- Infecciones fúngicas	3
I.2- Candidiasis	4
I.3- Biofilms como factor de resistencia	5
I.4- Nuevas terapias antimicrobianas	9
I.4.1- Combinación de antifúngicos	9
I.4.2- Terapia fotodinámica antimicrobiana	10
I.5- Fotosensibilizadores	12
I.5.1- Estados electrónicos y energéticos de un fotosensibilizador	13
I.5.2- Mecanismos fotosensibilizantes	15
A- Mecanismo fotosensibilizante o fotodinámico Tipo I	15
B- Mecanismo fotosensibilizante o fotodinámico Tipo II	16
I.6- Fotosensibilización y defensas antioxidantes	17
I.7- Agentes fotodinámicos usados en la práctica clínica	19
I.8- Productos naturales como fotosensibilizadores	22
I.9- Una planta fototóxica: <i>Heterophyllaea pustulata</i> Hook. f. (<i>Rubiaceae</i>)	22
I.9.1- Estudio fitoquímico.....	23
I.9.2- Caracterización fotofísica, fotoquímica y fotobiológica de antraquinonas	24
II- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	4
II.1- Hipótesis.....	29
II.2- Objetivos	29
II.2.1- Objetivo general	29
II.2.2- Objetivos específicos.....	29
III- MATERIALES Y MÉTODOS	30
III.1- METODOLOGÍAS USADAS EN EL ANÁLISIS FITOQUÍMICO.....	33
III.1.1- Recolección e identificación del material vegetal	33
III.1.2- Preparación del material vegetal	33
III.1.3- Obtención de extractos.....	33
III.1.4- Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en extractos: Cromatografía líquida de alta resolución	34

A- Ensayo analítico de HPLC-UV-Vis	34
B- Validación del método analítico de HPLC-UV-Vis	36
C- Ensayo analítico de HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF.....	37
III.1.5- Métodos de separación y purificación de antraquinonas.....	38
A- Cromatografía en columna.....	38
B- Cromatografía en capa fina preparativa	38
III.1.6- Métodos de identificación de antraquinonas.....	39
A- Cromatografía en capa fina analítica: Co-cromatografía.....	39
B- Espectrofotometría Ultravioleta-Visible	40
C- Espectrometría de Masa	40
D- Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	40
E- Espectroscopía Infrarroja	40
III.2- ENSAYO DE CITOTOXICIDAD	41
III.2.1- Efecto citopático	41
III.2.2- Viabilidad celular: Ensayo de captación de Rojo Neutro	41
III.3- METODOLOGÍAS USADAS EN EL ESTUDIO FOTOMICROBIOLÓGICO:	43
III.3.1- Identificación de cepas microbianas y condiciones de cultivo.....	43
III.3.2- Ensayo de formación de biofilms.....	43
III.3.3- Sistema de irradiación	44
III.3.4- Optimización de las condiciones de irradiación: tiempo y distancia de irradiación	45
III.3.5- Determinación de la concentración inhibitoria mínima fotoactiva en levaduras planctónicas.....	45
III.3.6- Determinación de la actividad antibiofilm: Fotoinactivación de biofilms fúngicos	47
A- Extractos de <i>H. pustulata</i>	48
B- Antraquinonas aisladas de <i>H. pustulata</i>	48
III.3.7- Estudio del estrés celular en la fotoinactivación de biofilms de <i>Candida</i> spp.....	48
A- Determinación de anión superóxido en biofilms: Ensayo de azul de nitro tetrazolium	49
B- Reacción de Griess: Determinación del radical óxido nítrico en biofilms	50
III.3.8- Estudio de la capacidad antioxidante del biofilm	51

A- Medición cuantitativa de la actividad de la enzima superóxido dismutasa.....	51
B- Determinación de la capacidad antioxidante total del sistema: FRAP...	52
III.3.9- Estudio de la estructura de biofilms: Microscopía Confocal de Exploración LÁSER	53
A- Observación y cuantificación de biofilms	53
B- Observación y cuantificación de especies reactivas del oxígeno intracelular.....	53
III.3.10- Efecto de secuestrantes/desactivantes de especies reactivas del oxígeno sobre la fotoinactivación de biofilms	55
III.3.11- Estudio de incorporación de antraquinonas en biofilms de <i>Candida</i> por HPLC-UV-Vis.....	55
III.3.12- Efecto de la variación en la frecuencia de irradiación sobre la actividad antibiofilm de antraquinonas: Tratamiento de irradiación.....	57
III.3.13- Ensayo de combinación con irradiación	57
III.4- METODOLOGÍAS USADAS EN EL ESTUDIO FOTOQUÍMICO Y FOTOFÍSICO....	59
III.4.1- Preparación de las muestras	59
III.4.2- Preparación de células planctónicas y biofilms de <i>Candida</i>	59
III.4.3- Espectros de absorción y de fluorescencia de las antraquinonas.....	60
III.4.4- Absorción de los estados transitorios de las antraquinonas	60
III.4.5- Determinación de oxígeno singlete	61
A- Medición con sonda fluorescente Singlet Oxygen Sensor Green	61
B- Cinética de fosforescencia de oxígeno singlete	62
III.5- METODO ESTADÍSTICO.....	64
IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	65
IV.1- SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES SOBRE BIOFILMS	67
IV.1.1- Clasificación de cepas de <i>Candida spp.</i> formadoras de biofilms.....	67
IV.1.2- Efecto de tiempo y distancia de irradiación sobre biofilms	68
IV.2- FOTOINACTIVACIÓN DE BIOFILMS DE <i>C. tropicalis</i> POR EXTRACTOS DE <i>H.</i> <i>pustulata</i> Y ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO	71
IV.2.1- Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de extractos de <i>H. pustulata</i> sobre biofilms de una cepa clínica de <i>C. tropicalis</i>	71
A- Cuantificación espectrofotométrica del biofilm con Cristal Violeta.....	71

B- Cuantificación del biofilms por Microscopia confocal de exploración LÁSER	73
IV.2.2- Producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno	75
A- Generación de radical anión superóxido	75
B- Producción de óxido nítrico	75
IV.2.3- Determinación de la activación de la enzima superóxido dismutasa y de la capacidad antioxidante total	77
A- Activación de la enzima superóxido dismutasa	77
B- Activación de la capacidad antioxidante total: Ensayo FRAP	78
IV.2.4- Generación de oxígeno singlete por los extractos de <i>H. pustulata</i>	80
IV.3- ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS EXTRACTOS DE <i>H. pustulata</i> ENSAYADOS SOBRE BIOFILMS.....	83
IV.3.1 – Análisis químico mediante HPLC-UV-Vis	83
A-Validación de la metodología de HPLC-UV-Vis.....	83
B- Análisis químico de los extractos de partes áreas de <i>H. pustulata</i> por HPLC-UV-Vis: Correlación entre su composición química y la actividad antibiofilm <i>in vitro</i>	88
IV.3.2 – Análisis químico mediante HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF.....	90
IV.4- SEPARACIÓN, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ANTRAQUINONAS	93
IV.4.1- Separación y purificación de rubiadina y 1-metil éter de rubiadina	94
IV.4.2- Identificación de rubiadina y 1-metil éter de rubiadina	95
IV.5- DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD DE LAS ANTRAQUINONAS.....	101
IV.6- ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA FOTOESTIMULADA DE ANTRAQUINONAS AISLADAS DE <i>H. pustulata</i> SOBRE BIOFILMS DE <i>C. tropicalis</i>	103
IV.6.1- Determinación de la CIM y CIM fotoactiva de las antraquinonas en levaduras planctónicas de <i>C. tropicalis</i>	103
IV.6.2- Actividad antibiofilm fotoestimulada de rubiadina y su derivado metilado	104
IV.6.3- Efecto de rubiadina sobre la generación de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno en el biofilm	107
IV.6.4- Efecto de rubiadina sobre mecanismos antioxidantes: activación de la enzima SOD y capacidad antioxidante total del biofilm	109
IV.6.5- Efecto de 1-metil éter de rubiadina sobre el estrés celular: Desbalance oxidativo y nitrosativo.....	110

IV.6.6- Cuantificación de la biomasa del biofilm y de la producción de especies reactivas del oxígeno intracelular por MCEL	114
IV.6.7- Generación de oxígeno singlete por antraquinonas en solución	116
IV.6.8- Incorporación de antraquinonas en biofilms de <i>Candida</i>	118
IV.7- ACCIÓN FOTOSENSIBILIZANTE <i>IN VITRO</i> DE ANTRAQUINONAS NATURALES SOBRE BIOFILM DE <i>C. tropicalis</i>	121
IV.7.1- Medidas espectroscópicas de antraquinonas.....	121
A- Espectros de absorción y fluorescencia	121
B- Absorción de estados transitorios	124
IV.7.2- Determinación de oxígeno singlete	128
IV.7.3- Efecto de secuestrantes/desactivantes de especies reactivas del oxígeno en la fotoinactivación de biofilms fúngicos.....	131
IV.8- OTRAS ESTRATEGIAS ANTIMICROBIANAS PARA OPTIMIZAR LA ACTIVIDAD ANTIBIOFILM DE ANTRAQUINONAS DE <i>H. pustulata</i>	139
IV.8.1- Aumento en la frecuencia de irradiación sobre la actividad antibiofilm de las AQs: Efecto sobre estrés oxidativo y nitrosativo del biofilm y respuesta de los mecanismos antioxidantes.....	139
IV.8.2- Ensayo de combinación con irradiación	144
A- Efecto antibiofilm de las combinaciones de antraquinonas entre sí y con AMB	144
B- Efecto de las combinaciones en el estrés oxidativo y nitrosativo del biofilm y respuesta de los mecanismos antioxidantes	149
C- Aumento en la tasa de irradiación sobre el efecto antibiofilm de las combinaciones de antraquinonas entre sí y con AMB	154
D- Efecto de las combinaciones con tratamiento de irradiación en el estrés oxidativo y nitrosativo del biofilm y respuesta de los mecanismos antioxidantes.....	156
V. CONCLUSIONES.....	161
VI. PROYECCIONES.....	165
VII. BIBLIOGRAFÍA	169
Artículos científicos publicados	183
ANEXO I: Preparación de soluciones	187

Abreviaturas

5-ALA	Ácido 5-aminolevulínico
9,10 DFA	9,10 difenil antraceno
ABC	Área bajo la curva
Acetona-d6	Acetona deuterada
AcOEt	Acetato de etilo
AMB	Anfotericina B
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
AQ/AQs	Antraquinona/s
AQ^{•-}	Radical anión de antraquinona
¹AQ*	Estado singlete excitado de antraquinona
³AQ*	Estado triplete excitado de antraquinona
AQ1	rubiadina
AQ2	1-metil éter de rubiadina
AQ3	soranjidiol
AQ4	1- metil éter de soranjidiol
AQ5	2-hidroxi-3-metil de antraquinona
AQ6	pustulina
ASG	Agar Sabouraud Glucosado
Ben	Benceno
CAT	catalasa
CC	Control Celular
CC₅₀	Concentración Citotóxica que reduce la viabilidad un 50 %
CIC	Contenido Intracelular
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CIMf	Concentración Inhibitoria Mínima fotoactiva
CIMS	Concentración Inhibitoria Mínima de células sésiles
CIMS-50	Concentración Inhibitoria Mínima que disminuye al 50 % las células sésiles
CIMS-80	Concentración Inhibitoria Mínima de células sésiles al 80 %
CLSI	“Clinical and Laboratory Standards Institute”
CSG	Caldo Sabouraud Glucosado
CSubT	Concentración Sub-Tóxica
CV	Cristal Violeta

δ	corrimiento químico
DAD	Detector de Arreglo de Diodos
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DCFH	2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DCFH-DA	2',7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMSO-d6	Dimetil sulfóxido deuterado
DO	Densidad Óptica
DOc	Densidad Óptica control
EC	Efecto Citopático
EM	Espectrometría de Masa
EPS	Exopolisacáridos
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
ERN	Especies Reactivas del Nitrógeno
ESI	"Electron Spray Ionization" (Ionización por electro spray)
EtOH	Etanol
FDA	"Food and Drug Administration" (Administración de drogas y alimentos)
FE	Fase Estacionaria
Fe⁺³-TPTZ	tripiridiltriazina férrica
Fe⁺²-TPTZ	tripiridiltriazina ferrosa
FICI	"Fractional Inhibitory Concentration Index" (Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional)
FM	Fase Móvil
FRAP	"Ferrous Reduction Antioxidant Potency"
FS	Fotosensibilizador
¹FS₀	Estado fundamental singlete del fotosensibilizador
¹FS*	Estado singlete excitado del fotosensibilizador
³FS*	Estado triplete excitado del fotosensibilizador
FS*	Radical del fotosensibilizador
FS⁻	Radical anión del fotosensibilizador
FS⁺	Radical catión del fotosensibilizador
GSH	Glutación peroxidasa
H	átomo de Hidrógeno
hν	Fotón de luz
Hex	hexano

H₂O-D	Agua destilada
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HpD	Derivados de hematoporfirina
HPLC-UV-Vis	“High Performance Liquid Chromatography” (Cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta-visible)
HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF	“HPLC with diode-array detector and Mass Spectrometry” (Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos y espectrometría de masa-masa)
IFI	Infección Fúngica Invasiva
IIH	Infección Intrahospitalaria
ISC	“Intersystem Crossing” (Cruce entre sistemas)
IR	Infrarrojo
J	constante de acoplamiento
λ	Longitud de onda
LOD	“Limit of Detection” (Límite de detección)
LOQ	“Limit of Quantitation” (Límite de cuantificación)
MC	Medio de crecimiento
MCEL	Microscopia Confocal de Exploración LÁSER
MCNC	Máxima Concentración No Citotóxica
MEM	Medio Esencial Mínimo
MeOH	Metanol
MeOH-HPLC	Metanol grado HPLC
MM	Medio de mantenimiento
MOPS	“3-(N-morpholino) propanesulfonic acid” (Buffer Morfolino Propano Sulfónico)
MS-MS	“In tandem Mass Spectrometry” (Espectrometría de masa en tándem)
MV	Material Vegetal
m/z	Relación masa carga
NBT	“Nitroblue Tetrazolium” (Azul de nitro tetrazolium)
NCPF	“National Collection of Pathogenic Fungi”
NO₂⁻	Ión nitrito
³O₂	Oxígeno molecular
¹O₂	Oxígeno singlete
O₂^{•-}	Radical anión superóxido
HO	Grupo hidroxilo

HO•	Radical hidroxilo
NO•	Radical óxido nítrico
ONOO•	Radical peroxinitrito
PBS	“Phosphate-Buffered saline” (Buffer Fosfato Salino)
PBS-d	Buffer Fosfato Salino deuterado
PN	Perinaftenona
Quer	Quercetina
QS	“Quorum Sensing”
R²	Coefficiente de correlación
R_f	Relación de frente
R o RH₂	Sustrato o solvente
RH-OO•	Radical peróxido de sustrato
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN-¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Protones
RMN-¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RN	Rojo Neutro
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute” (medio de cultivo)
RSD	“Relative Standard Deviation” (Desviación estándar relativa)
Sb	Desviación estándar de la intersección en y
SFB	Suero Fetal Bovino
SOD	Superóxido Dismutasa
SOSG	“Singlet Oxygen Sensor Green”
SubCIM/f	Sub Concentración Inhibitoria Mínima/ fotoactiva (CIM/2)
SupraCIM/f	Supra Concentración Inhibitoria Mínima/ fotoactiva (CIMx2)
TFD	Terapia Fotodinámica
TFDa	Terapia Fotodinámica antimicrobiana
Tiron	sal disódica del ácido 4,5-dihidroxi-1,3-benzenodisulfónico mono hidrato
TLC	“Thin Layer Chromatography” (Cromatografía en capa fina)
TLCp	Cromatografía en capa fina preparativa
TPTZ	Tripiridiltriazina
t_R	Tiempo de retención
UBB	Unidad de Biomasa de Biofilm
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visible

VC	Viabilidad Celular
Φ_{Δ}	Rendimiento cuántico de oxígeno singlete
Φ_f	Rendimiento cuántico de fluorescencia
%R	Porcentaje de reducción

I-INTRODUCCIÓN

I.1- Infecciones fúngicas

A partir de la década de los 80, se ha observado un incremento a nivel mundial en la incidencia y gravedad de las infecciones producidas por hongos. No sólo se han vuelto más frecuentes las micosis ocasionadas por especies patógenas primarias, sino también por oportunistas (Colombo *et al.*, 2011; Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012; Vandeputte *et al.*, 2012). Patógenos primarios como *Histoplasma capsulatum/duboisii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, entre otros, pueden establecer una infección naturalmente. Por el contrario, los patógenos oportunistas, pueden desarrollar infecciones cuando ocurren determinadas condiciones, tales como la inmunosupresión (Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012; Vandeputte *et al.*, 2012).

Antes, las micosis superficiales endémicas eran prevalentes, pero en los últimos años la frecuencia de las micosis sistémicas invasivas ha aumentado (Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012; Vandeputte *et al.*, 2012). En Latinoamérica, la incidencia de las infecciones fúngicas invasivas (IFI) ha incrementado, estimándose que es 3 a 15 veces mayor que la reportada en Europa y Norteamérica (Falagas *et al.*, 2010; Nucci *et al.*, 2010, Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012). Este tipo de infección es frecuente en pacientes inmunodeprimidos u hospitalizados (Permán & Salavert, 2012).

El incremento de las IFI ha sido reportado tanto a partir de hongos endémicos como oportunistas, acompañado con altas tasas de morbilidad y mortalidad (Nucci *et al.*, 2010, Permán & Salavert, 2012; Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012). Por un lado, el aumento de las IFI endémicas estaría probablemente relacionado con cambios en los hábitos de la población; como por ejemplo mayor número de migraciones, el turismo, y el crecimiento de la población, serían algunas de las condiciones que favorecerían a la diseminación de las especies fúngicas relacionadas con estas infecciones (Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012). En cambio, la mayor incidencia de las IFI oportunistas estaría asociada con un incremento de pacientes inmunocomprometidos, al uso de materiales biomédicos a largo plazo (catéteres, sondas), la intolerancia al fármaco antifúngico como consecuencia del tratamiento de la enfermedad subclínica subyacente (cáncer, diabetes), y el desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos debido al abuso de agentes antifúngicos y/o antibióticos de amplio espectro (Goldani & Mário, 2003; Nucci *et al.*, 2010; Permán & Salavert, 2012; Pfaller *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012).

Las IFI oportunistas incluyen candidiasis, criptococosis, trichosporonosis, aspergilosis y fusariosis, siendo las especies de *Candida* las levaduras con mayor frecuencia asociadas a infecciones intrahospitalarias (IIH) tanto superficiales como

sistémicas (Cornistein *et al.*, 2013, Nucci *et al.*, 2010; Perman & Salavert, 2012; Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012). Estas IFI prolongan la estancia hospitalaria del paciente, incrementando el consumo de recursos para su prevención, diagnóstico y tratamiento; por lo cual, generan un grave problema sanitario con un alto costo social y económico (Cornistein *et al.*, 2013, Pfaller & Diekema, 2007).

I.2- Candidiasis

La infección por *Candida* spp. implica una modificación en los mecanismos de defensa del hospedador y la transformación en el comportamiento del hongo comensal a patógeno oportunista. Esto involucra la adherencia de la levadura a la superficie, el cambio morfológico de levadura a hifa y posteriormente, la invasión de la mucosa que desencadena la respuesta inflamatoria de las células infectadas. El hospedador presenta así un papel fundamental en la protección frente a las micosis invasivas. La capacidad del hongo para producir infección dependerá en muchas ocasiones de la aptitud del hospedador para generar una respuesta inmunológica efectiva (Mayer *et al.*, 2013; Garcia-Vidal y Carratalà, 2012).

Candida albicans es el agente etiológico aislado con mayor frecuencia en las IIH invasivas, se observa un aumento de las especies de *Candida* no *albicans* (Goldani & Mário, 2003; Silva *et al.*, 2012). En Argentina, la incidencia de especies de *C.* no *albicans* fue mayor que la de *C. albicans* (54,52 vs 43,3 %), según un estudio retrospectivo durante el período 2006 a 2010 (Cornistein *et al.*, 2013). Dentro de estas especies se destacaron *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis* (Cornistein *et al.*, 2013; Falagas *et al.*, 2010; Nucci *et al.*, 2010, Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012). Las observaciones clínicas y experimentales sugieren que las tasas de morbilidad y mortalidad son más altas debido a las infecciones por *C. tropicalis* que a las infecciones por *C. albicans* (Kothavade *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012). En consecuencia, *C. tropicalis* se está convirtiendo en un patógeno emergente a nivel mundial.

Paralelamente al incremento de las Candidiasis invasivas, se han caracterizado varios mecanismos en las especies de *Candida* que les confieren resistencia a los fármacos antifúngicos (Morace *et al.*, 2014; Vandeputte *et al.*, 2012). Así, la resistencia a los fármacos sería uno de los factores relacionados a la generación de IFI. Se considera un fenómeno complejo, en donde los mecanismos desarrollados por las levaduras se basan principalmente en la reducción de la acumulación del fármaco dentro de la célula fúngica, la disminución de la afinidad del fármaco por su sitio de acción y las modificaciones del metabolismo para contrarrestar el efecto del fármaco.

Estos mecanismos pueden ocurrir a través de un incremento de las bombas de eflujo; alteración del sitio de acción, ya sea por mutación o desregulación de su expresión; modificación del metabolismo, como la alteración en la síntesis del ergosterol, entre otras (Vandeputte *et al.*, 2012; Spampinato & Leonardi, 2013).

Sin embargo, las infecciones crónicas se asocian con el desarrollo de biofilms, ya que este tipo de crecimiento exhibe una disminución en la susceptibilidad a los agentes antifúngicos. Por lo tanto, la formación de biofilms se considera un importante factor de virulencia (Ramage *et al.*, 2012; Sardi *et al.*, 2013, Vandeputte *et al.*, 2012). Éstos son comunidades microbianas adheridas irreversiblemente a una superficie, formadas por ambos morfotipos de células sésiles (levaduriforme e hifal) que crecen envueltas en una matriz extracelular rica en polisacáridos secretadas por ellas mismas (Ramage *et al.*, 2012; Sardi *et al.*, 2013; Vandeputte *et al.*, 2012). La mayoría de las levaduras formadoras de biofilms son las del género *Candida*. Otra levadura frecuentemente responsable de las infecciones por biofilms es *Cryptococcus neoformans*. También, los hongos filamentosos, y en particular los del género *Aspergillus*, pueden crecer como biofilms (Fanning & Mitchell, 2012, Vandeputte *et al.*, 2012).

Los biofilms se han informado como una de las causas importantes de infecciones nosocomiales, frecuentemente por el uso de dispositivos médicos al crecer adheridos a éstos (catéteres urinarios/vasculares, implantes, válvulas cardíacas, prótesis, entre otros) (Bizerra *et al.*, 2008; Kojic & Darouiche, 2004; Ramage *et al.*, 2012; Sardi *et al.*, 2013).

I.3- Biofilms como factor de resistencia

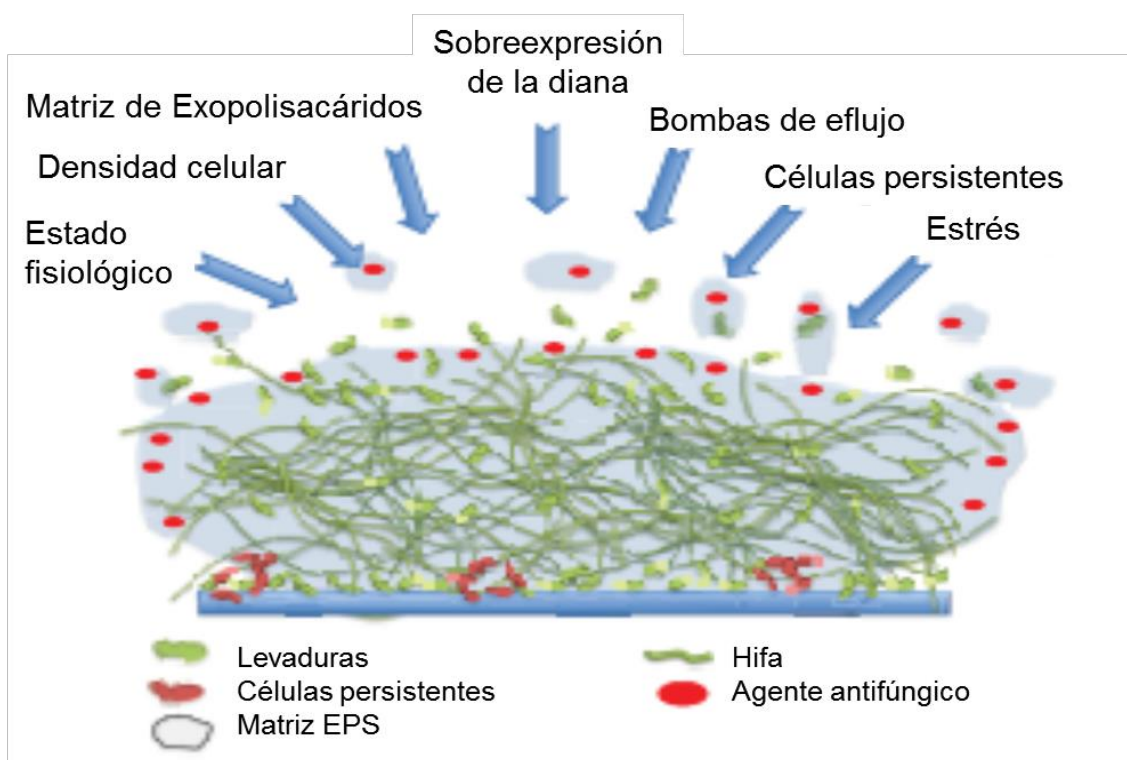
Los microorganismos en biofilms pueden ser hasta 1000 veces más resistentes que su contraparte planctónica, posiblemente debido a la naturaleza heterogénea del mismo (Delattin *et al.*, 2014; Ramage *et al.*, 2012, De Melo *et al.*, 2013). Se ha observado que los biofilms de levaduras son resistentes a casi todos los antifúngicos utilizados en la actualidad; por lo cual, además del tratamiento a menudo es necesario la extracción del dispositivo médico, siendo éste un procedimiento quirúrgico costoso y doloroso para los pacientes (Sardi *et al.*, 2013).

Es probable que la resistencia de los biofilms fúngicos a los agentes antimicrobianos sea el resultado de una combinación de múltiples y complejos factores, los cuales todavía permanecen poco claros (Ramage *et al.*, 2012, Silva *et al.*, 2012). Los mecanismos moleculares que podrían estar implicados en esta resistencia

son más complejos que en el crecimiento planctónico, y comprenden (Ramage *et al.*, 2012) (Fig. 1.1):

- a) El estado fisiológico y la velocidad de crecimiento de las células.
- b) La alta densidad celular dentro del biofilm.
- c) Los efectos de barrera de la matriz.
- d) La sobreexpresión de las moléculas dianas.
- e) La expresión de genes de resistencia, en particular las bombas de eflujo.
- f) La presencia de células persistentes.
- g) La respuesta modificada al estrés celular.

Figura 1.1 Esquema de mecanismos de resistencia de los biofilms fúngicos (Adaptada de Ramage *et al.*, 2012).



a) El estado fisiológico de las células sésiles se ha relacionado con diferentes respuestas de los biofilms a los antifúngicos. Se han estudiado varios factores como la respiración mitocondrial, la exposición a glucosa y hierro, cambios en el pH, temperatura, disponibilidad de oxígeno, entre otros, que alteran la arquitectura del biofilm y modifican la sensibilidad a los antifúngicos. En general, se ha establecido que estos factores generan gradientes de oxígeno y nutrientes, provocando una heterogeneidad fisiológica que condicionan la respuesta al tratamiento (Ramage *et al.*, 2012). Además, la velocidad de crecimiento

de las células en el biofilm afecta la actividad de los antifúngicos, ya que algunos fármacos logran la muerte del microorganismo en determinada fase de crecimiento del mismo (Tobudic *et al.*, 2012; De Melo *et al.*, 2013).

b) La densidad celular es un importante factor de resistencia dentro del biofilm de levaduras y hongos filamentosos, en particular para los azoles (Ramage *et al.*, 2012). En el interior del biofilm existe cooperación entre las células individuales a través de un proceso de comunicación conocido como quorum sensing (QS), que también permite coordinar su comportamiento (Mukherjee *et al.*, 2005; Ramage *et al.*, 2012). En los biofilms de *C. albicans*, una de las moléculas señalizadoras involucradas en el QS es el farnesol, que participa en el control de la morfología y crecimiento del biofilm. Esta regulación sucede como respuesta a la densidad celular, acumulándose el farnesol hasta una determinada concentración; cuando es lo suficientemente alta, puede inhibir la formación de la forma hifal, la capacidad de crecer como biofilms y la activación de genes involucrados en la resistencia a antifúngicos (Cao *et al.*, 2005; Ramage *et al.*, 2012). Además, una gran densidad celular implica mayores sitios blancos para la acción de antifúngicos.

c) La composición química de la matriz de exopolisacáridos (EPS) y su regulación pueden desempeñar un papel central en la resistencia. La composición de la misma en biofilms de *Candida* es compleja, contiene principalmente agua y carbohidratos derivados de glucosa y hexosamina. Además, posee proteínas, fósforo, ácido urónico, y ADN extracelular, cuyas proporciones varían según la especie de *Candida* (Al-Fattani & Douglas, 2006). Se ha demostrado también que algunos hidratos de carbono estarían involucrados en la resistencia del biofilm, secuestrando azoles, equinoncandinas y polienos (Al-Fattani & Douglas, 2006; Ramage *et al.*, 2012). Así, la matriz de EPS actuaría como una barrera para los fármacos.

d) La sobreexpresión de las moléculas dianas es otro mecanismo de resistencia de los hongos, como en el caso de los azoles, cuyo blanco de acción es la 14 α -demetilasa. Esta enzima, codificada por el gen ERG11, bloquea la biosíntesis de ergosterol que se traduce en una disminución de éste en las membranas, y en una acumulación de otros esteroides considerados tóxicos al inhibir el crecimiento del hongo. Sin

embargo, el gen ERG11 puede desarrollar mutaciones o estar sobreexpresado, afectando así la acción de los azoles, y también la de los polienos que tienen como blanco el ergosterol (Ramage *et al.*, 2012).

e) La resistencia del biofilm mediada por bombas de eflujo involucra a los transportadores dependientes de ATP y a los transportadores de la superfamilia de facilitadores mayores. Los primeros, utilizan varios sustratos, por lo que su sobreexpresión puede dar lugar a la resistencia cruzada de varias drogas; mientras que los segundos sólo confieren resistencia a los azoles (Mishra *et al.*, 2007; Ramage *et al.*, 2012). La codificación de los genes de las bombas está regulada durante las distintas etapas del desarrollo del biofilm y también luego de la exposición a los antifúngicos (Ramage *et al.*, 2012).

f) Las células persistentes también estarían involucradas en la resistencia, a pesar que sólo representan menos del 0,1 % de la población del biofilm (De Melo *et al.*, 2013). Estas células podrían adaptarse a un entorno adverso, a través de cambios en las etapas de crecimiento - latencia - proliferación para mantener la supervivencia (De Melo *et al.*, 2013). Así, son variantes fenotípicas altamente tolerantes a los antifúngicos (Tobudic *et al.*, 2012; De Melo *et al.*, 2013; Ramage *et al.*, 2012). La presencia de estas células ha sido descrita en biofilms de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* tratados con Anfotericina B (AMB) (Ramage *et al.*, 2012). Se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno (ERO) en altas concentraciones permiten el desarrollo de células persistentes, como ocurre con el miconazol (Delattin, *et al.*, 2014; Ramage *et al.*, 2012).

g) Es importante destacar que la respuesta al estrés también se ha propuesto como un mecanismo de resistencia en el biofilm (Arce Miranda *et al.*, 2011; Villegas *et al.*, 2013; Angel Villegas *et al.*, 2015; Peralta *et al.*, 2015). Los hongos patógenos están expuestos a una variedad de condiciones fisiológicas, incluyendo cambios de temperatura, estrés osmótico y estrés oxidativo, tales como los producidos en los fagosomas de neutrófilos. Los cambios producidos por estas condiciones generan diferentes respuestas que afectan el desarrollo del biofilm (Ramage *et al.*, 2012).

Además de la resistencia a los antifúngicos, el crecimiento de los biofilms ofrece una protección a la respuesta inmune del hospedador. Ésta respuesta es

menos efectiva sobre el biofilm de *Cándida* en comparación con las levaduras en estado planctónico. Las células mononucleares quedan atrapadas en los biofilms, y no se activarían de manera eficiente para fagocitar las células fúngicas que forman parte del biofilm (Nett & Andes, 2015).

Entre los antimicóticos usados actualmente, sólo hay unos pocos con limitada a buena eficacia contra biofilms fúngicos, tales como miconazol, equinocandinas y formulaciones lipídicas de AMB (Delattin *et al.*, 2014; Ramage *et al.*, 2012, Sardi *et al.*, 2013). En general, los tratamientos antibiofilms con estos fármacos antifúngicos, necesitan concentraciones que están fuera del rango terapéutico; y además, frecuentemente es necesario prolongar la duración del tratamiento en búsqueda de mejores resultados. Como consecuencia, se pueden generar graves efectos secundarios e interacciones con otros fármacos; y de este modo, además resultarían poco eficaces, pudiendo presentar baja seguridad en su uso.

Dado que la resistencia de los biofilms fúngicos estaría mediada por más de un mecanismo, se busca desarrollar nuevas estrategias para combatir a los agentes infecciosos. En los últimos años, se ha implementado la terapia antifúngica combinada, que implica el uso simultáneo de dos o más fármacos, la cual ha mostrado mejorar los resultados clínicos (Nett y Andes, 2015, Pianalto & Alspaugh, 2016; Scorzoni *et al.*, 2016).

Frente a la necesidad urgente de nuevos enfoques para tratar infecciones fúngicas asociadas a biofilms, la Terapia Fotodinámica antimicrobiana (TFDa) se presenta como una alternativa, ya que busca inactivar microorganismos mediante una foto-oxidación biológica mediada por ERO (Baltazar *et al.*, 2015; Hamblin, 2016; Wainwright *et al.*, 2017).

I.4- Nuevas terapias antimicrobianas

I.4.1- Combinación de antifúngicos

Las combinaciones de dos o más antifúngicos, y combinaciones de fármacos antifúngicos con productos naturales, se han evaluado como una alternativa a la monoterapia (Johnson *et al.*, 2004; Scorzoni *et al.*, 2016). En general, el objetivo principal es conseguir una interacción sinérgica entre los principios activos, en la cual el efecto biológico producido por los fármacos combinados es mayor que la suma del efecto de cada uno por separado a la misma dosis (Johnson *et al.*, 2004).

En este sentido, existen estudios en donde se han combinado dos agentes antifúngicos que se caracterizan por diferentes modos de acción (Johnson *et al.*, 2004). Tal es el caso de la combinación de AMB y anidulafungina que resultó en un efecto sinérgico sobre biofilms de *C. albicans* y *C. glabrata* (Valentín *et al.*, 2016)

Por otro lado, en biofilms de *C. albicans* y *C. parapsilosis* se han llevado a cabo combinaciones de un antimicótico (polieno o equinocandina) con otro fármaco, como un antiinflamatorio (diclofenac, aspirina), el cual actuaría como un potenciador (Bink *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012).

Diferentes informes describen una mejora sinérgica de la actividad de azoles y AMB combinados con compuestos que pueden aumentar las ERO, tal como paraquat y otros de origen natural como baicaleína, allicina, curcumina y berberina (Delattin *et al.*, 2014). En particular, la combinación de berberina con miconazol tuvo efectos sinérgicos en biofilms de *Candida* (Delattin *et al.*, 2014; Wei, *et al.* 2011).

Por lo tanto, la terapia combinada se centra en una mejora significativa de la eficacia de los compuestos en la combinación en comparación con la monoterapia. Esta alternativa terapéutica no sólo se ha desarrollado para tratar infecciones resistentes, o ampliar el espectro de acción de antifúngicos sobre una mayor variedad de hongos, sino que también busca reducir la concentración de aquellos que presentan efectos adversos con el fin de disminuir sus efectos tóxicos (Delattin, *et al.* 2014; Johnson *et al.*, 2004).

1.4.2- Terapia fotodinámica antimicrobiana

La TFDa implica la participación de tres factores indispensables: una sustancia química no tóxica, denominada fotosensibilizador (FS), la cual es activada por luz inocua a su longitud de onda (λ) de absorción, y en presencia de oxígeno produce un incremento en los niveles de ERO. Así, se busca inducir estrés oxidativo en los microorganismos patógenos. Las ERO así generadas, reaccionan con moléculas biológicas de su entorno directo (proteínas, lípidos, ADN), conduciendo eventualmente a la muerte de las células microbianas patógenas (Hamblin, 2016).

La TFDa, también conocida como inactivación fotodinámica o quimioterapia fotodinámica antimicrobiana, fue descubierta en el 1900 por Raab y Tappeiner, quienes hallaron que los protozoos *Paramecium* spp. morían luego de ser teñidos con naranja de acridina y expuestos a la luz brillante (Baltazar *et al.*, 2015; Hamblin, 2016). Su desarrollo se vio limitado por el auge de los antibióticos. Recién en la década de los 70, se comenzó a desarrollar el uso de sustancias fotosensibilizantes y luz como una terapia para tratar el cáncer. Esto sucedió como consecuencia del descubrimiento que

las porfirinas se localizaban selectivamente en los tumores y bajo irradiación generaban la regresión de los mismos (Baltazar *et al.*, 2015, Hamblin, 2016).

En los últimos años la TFDa ha resurgido, especialmente debido a la búsqueda de tratamientos alternativos para patógenos resistentes. Su principal ventaja sobre los tratamientos tradicionales radica en generar un desbalance oxidativo generalizado, desencadenando así un proceso que no diferencia entre microorganismos resistentes y no resistentes. Incluso esta foto-oxidación incluye la destrucción de factores de virulencia que en general, son moléculas orgánicas susceptibles de oxidación (Baltazar *et al.*, 2015; De Melo *et al.*, 2013; Gonzales & Maisch, 2012). Además, esta terapia presenta la posibilidad de realizar un control espacial estricto de la irradiación sobre la zona afectada, reuniendo sólo, de esa manera, los tres agentes responsables del efecto fotodinámico (FS, luz y oxígeno).

Otras ventajas que se pueden citar de esta terapia son (De Melo *et al.*, 2013; Hamblin, 2016; Jori *et al.*, 2006):

- Amplio espectro de acción, ya que al generar foto-oxidación de biomoléculas necesarias para la viabilidad celular, puede inactivar una gran variedad de microorganismos como bacterias, hongos, protozoos y virus.
- Eficacia sobre microorganismos resistentes, debido a que al producir un desbalance oxidativo afecta a muchas dianas al mismo tiempo.
- No genera resistencia, dado que los microorganismos no han mostrado activar mecanismos de resistencia, ya sea mediante un incremento en el metabolismo de detoxificación o en la exportación de fármacos.
- Efecto sobre patógenos organizados en biofilms, ya que ha demostrado capacidad de erradicar biofilms en algunos casos, al producir la ruptura de la matriz extracelular.
- El FS puede diseñarse para que se localice preferentemente en el microorganismo y no en el tejido o células del hospedador, confiriendo selectividad con el menor daño a los tejidos sanos.
- Si no fuera posible una acumulación preferencial, se podría lograr la muerte de los microorganismos mediante un control de la irradiación, ya que el efecto estaría limitado a la zona en donde se aplicó la luz.
- El daño sobre el tejido sano es mínimo porque las ERO generadas tienen vida media muy corta y por lo tanto, difunden en un radio de acción pequeño (5-20 nm).
- El efecto mutagénico o genotóxico sobre una célula eucariota es muy bajo porque, en general, los FS no se localizan en el núcleo.

- Estimula el sistema inmune frente al estrés oxidativo generado, ayudando al tratamiento.
- En la mayoría de los casos, los resultados son inmediatos.

A pesar de todas estas ventajas, esta terapia presenta las siguientes desventajas o limitaciones (Gad *et al.*, 2004):

- Su uso está limitado preferentemente a infecciones superficiales o localizadas, en donde la aplicación de la fuente de luz sea posible. Sin embargo, en las últimas décadas se han desarrollado dispositivos que permiten llegar con la irradiación a tumores internos.
- El tipo de luz a utilizar depende del FS, específicamente del rango del espectro en donde éste absorbe luz.
- Puede generar fototoxicidad en tejidos sanos y/o una reacción inflamatoria, lo cual depende directamente del FS usado, el tiempo entre su aplicación y el tratamiento con luz, y la parte del cuerpo tratada. Se prefieren FS que sean eliminados completamente.
- A veces es necesario repetir el tratamiento para lograr resultados satisfactorios.

I.5- Fotosensibilizadores

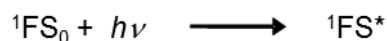
Hay ciertas características estructurales que los FS deben tener para que puedan ocurrir los procesos fotofísico-químicos. En particular, son moléculas orgánicas planas y rígidas con un alto grado de conjugación aromática (cromóforo), lo cual le confiere una gran deslocalización electrónica que le permite absorber luz (Baltazar *et al.*, 2015, Dai *et al.*, 2012; De Melo *et al.*, 2013; Hamblin, 2016). Por lo tanto, los FS generalmente son moléculas altamente coloreadas, ya que el cromóforo es el responsable de su capacidad para absorber luz (Baltazar *et al.*, 2015, Dai *et al.*, 2012; de Melo *et al.*, 2013; Hamblin, 2016). La presencia de grupos auxocromos (grupos funcionales o cadenas carbonadas) alteran su espectro de absorción y por lo tanto, de ellos depende en gran medida la longitud de onda de absorción del FS (Dai *et al.*, 2012).

La susceptibilidad de los microorganismos a la TFDa depende de las características fisicoquímicas del FS como polaridad, distribución de carga y solubilidad, entre las más estudiadas. En términos generales, para que el tratamiento fotodinámico sea efectivo, el FS idóneo debe reunir los siguientes requisitos (Hamblin, 2016):

- No debe ser tóxico en células de mamíferos bajo oscuridad. A su vez, se prefiere que su toxicidad sea baja luego de la irradiación. Esto incluye que no sea mutagénico, ni genotóxico, ni carcinogénico.
- Fotoestable, que no se degrade al ser irradiado, especialmente en subproductos tóxicos.
- Debe mostrar selectividad por los microorganismos y no por las células del hospedador.
- Alto poder de penetración en los tejidos, es decir, lipofilicidad para una buena difusión a través de las membranas biológicas.
- Capacidad para activarse a una longitud de onda inocua y de alta penetración.
- Distribución homogénea en el tejido a tratar.
- Alto rendimiento fotodinámico para una máxima producción de ERO.
- Vida media corta y rápida eliminación de los tejidos sanos.
- Escasos o nulos efectos adversos, incluyendo dolor durante o después del tratamiento.
- Versatilidad en la forma de administración (oral, tópica) y que permita ser administrado en forma ambulatoria para reducir costos.
- Combinable con otros tratamientos.

I.5.1- Estados electrónicos y energéticos de un fotosensibilizador

El FS en su estado fundamental singlete ($^1\text{FS}_0$, con todos sus electrones con espines apareados y en orbitales de baja energía), absorbe un fotón de luz ($h\nu$) cuando es irradiado a la λ de absorción, pasando a un estado singlete electrónicamente excitado ($^1\text{FS}^*$).

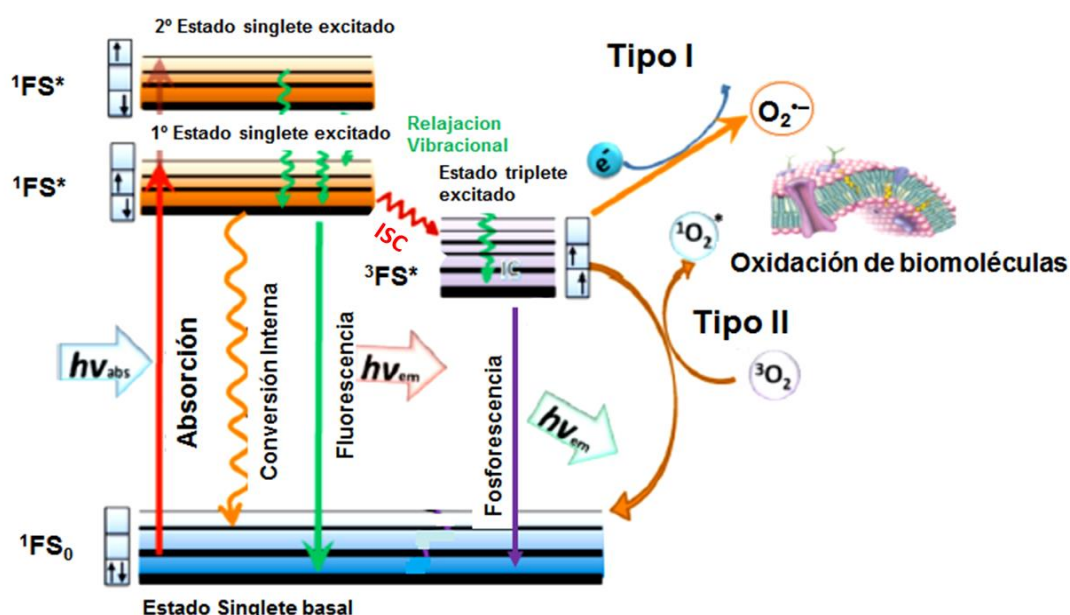


En este estado excitado, el $^1\text{FS}^*$ se puede desactivar a través de procesos fotoquímicos o fotofísicos (Levine, 1996; Skoog, Holler, y Nieman, 2001; Nagy *et al.*, 2010). En los primeros, se generan nuevas especies moleculares por distintas reacciones como disociación, isomerización, ionización, entre otras (Levine, 1996; Skoog, Holler, & Nieman, 2001). En los procesos fotofísicos, el $^1\text{FS}^*$ retorna su estado basal $^1\text{FS}_0$ (Fig. 1.2), permaneciendo la molécula químicamente inalterada. El $^1\text{FS}^*$ libera su energía por distintos mecanismos, ya sea en forma de calor o a través de

procesos **radiativos** y/o **no radiativos** (Baltazar *et al.*, 2015, Dai *et al.*, 2012; Hamblin, 2016).

Los procesos **radiativos** (flechas rectas en Fig. 1.2) implican la liberación de energía en forma de radiación electromagnética desde un estado excitado del FS, lo cual puede darse desde el $^1\text{FS}^*$ a través de la emisión de fluorescencia o a partir de un estado triplete excitado ($^3\text{FS}^*$) por fosforescencia (Fig. 1.2). La primera ocurre en forma espontánea entre dos estados electrónicos con la misma multiplicidad de espín, mientras que en la segunda los estados electrónicos tienen diferente multiplicidad de espín (Baltazar *et al.*, 2015, Dai *et al.*, 2012; Hamblin, 2016).

Figura 1.2 Diagrama de Jablonski (adaptado de Silva *et al.*, 2015).



Los procesos **no radiativos** (flechas onduladas en Fig. 1.2) abarcan la relajación vibracional, la conversión interna y el cruce entre sistemas (Intersystem Crossing, ISC) (Fig. 1.2). En el primer proceso, la energía del $^1\text{FS}^*$ disminuye dentro de un mismo estado electrónico. Esta relajación suele ocurrir con posterioridad a la conversión interna y al cruce entre sistemas; por lo cual, no logra por sí sola retornar al estado basal. En cambio, con la conversión interna se puede regresar al estado basal, ya que esta disminución de energía ocurre entre dos estados electrónicos con la misma multiplicidad de espín, y esto puede suceder en varias etapas. El proceso de cruce entre sistemas ocurre entre dos estados electrónicos con distinta multiplicidad de espín, generando un $^3\text{FS}^*$ de menor energía que el $^1\text{FS}^*$, pero con mayor tiempo de vida media y más reactivo (Baltazar *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2012; Hamblin, 2016). A

partir de este estado triplete excitado, el FS puede regresar al estado basal emitiendo fosforescencia o reaccionando con otras moléculas de su entorno (Baltazar *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2012). Esto último puede ocurrir al transferir su energía a otra molécula (proceso fotofísico) o por reacciones fotoquímicas, como transferencia de electrones, abstracción de átomos de hidrógeno (H) o formación de fotoproductos (Baltazar *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2012; De Melo *et al.*, 2013).

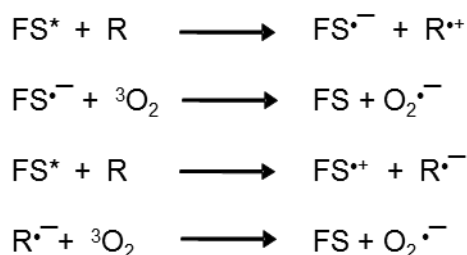
I.5.2- Mecanismos fotosensibilizantes

Los FS, en su estado excitado, producen alteraciones fotoquímicas o fotofísicas en el $^3\text{O}_2$, generando radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y otras ERO, a través de dos mecanismos (Baltazar *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2012; Hamblin, 2016).

A- Mecanismo fotosensibilizante o fotodinámico Tipo I

El FS en su estado excitado singlete o triplete reacciona con un sustrato o con el solvente en el cual está disuelto (R o RH_2) y se forman radicales libres por (i) transferencia electrónica o (ii) abstracción de H (reacciones fotoquímicas). Los radicales libres generados del FS reaccionarán con el $^3\text{O}_2$ para formar radicales peróxidos que formarán otras ERO, y ellas en definitiva, oxidarán las moléculas biológicas.

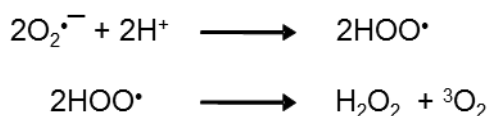
(i) Por transferencia de electrones a partir del estado singlete o triplete excitado del FS, se obtiene el radical catiónico ($\text{FS}^{\bullet+}$) y/o aniónico ($\text{FS}^{\bullet-}$) de éste a través de las siguientes reacciones. A su vez, los radicales generados al reaccionar con el $^3\text{O}_2$ producen $\text{O}_2^{\bullet-}$. (Baltazar *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2012; Hamblin, 2016):



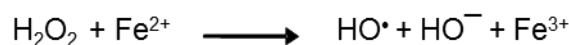
A pesar que el $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede reaccionar con algunas biomoléculas como leucoflavinas, tetrahidropterinas, catecolaminas y compuestos relacionados (Fridovich, 1997; Mattila *et al.*, 2015), no se lo considera una especie muy reactiva. No ataca en forma significativa al ADN ni a los lípidos poliinsaturados, con el consecuente daño en la membrana celular (Fridovich, 1997). Su potencialidad como agente oxidante radica

en su capacidad para generar especies oxidantes más potentes, como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (HO^\bullet); y esto lo puede hacer por varios mecanismos (Dai *et al.*, 2012).

El más simple de estos mecanismos es una dismutación rápida que genera $^3\text{O}_2$ y H_2O_2 (Dai *et al.*, 2012) por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Fig. 1.3, pág. 18). El H_2O_2 inicia principalmente peroxidación en la bicapa lipídica de las membranas plasmáticas (Mattila *et al.*; 2015; Ochsner, 1997).

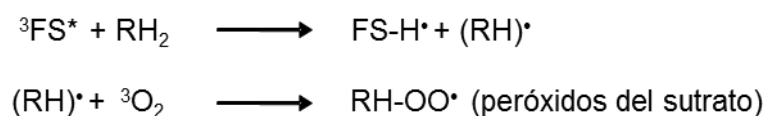


Otro mecanismo posible es el conocido como reacción *in vivo* de Haber-Weiss. Es un proceso en el cual el $\text{O}_2^{\bullet-}$ aumenta el hierro "libre", oxidando el centro [4Fe-4S] de enzimas dehidrasas (Mattila *et al.*, 2015, Ochsner, 1997). El hierro liberado se mantiene reducido (Fe^{+2}) por reductores celulares, y reacciona con H_2O_2 en la reacción de Fenton, para producir HO^\bullet en sistemas biológicos (Mattila *et al.*, 2015, Ochsner, 1997):



El HO^\bullet es una de las especies más reactivas del oxígeno, ocasionando daño significativo en el ADN, como también en proteínas y lípidos celulares. Por lo tanto, se considera una de las ERO más tóxica.

(ii) En la abstracción de hidrógeno se producen radicales peróxidos del sustrato (RH-OO^\bullet) que son los que reaccionan con las biomoléculas, de acuerdo a las siguientes reacciones (Baltazar *et al.*, 2015; Laustriat, 1986):



B- Mecanismo fotosensibilizante o fotodinámico Tipo II

En este mecanismo se produce una transferencia de energía triplete/triplete (proceso fotofísico). El FS en estado triplete excitado regresa a su estado fundamental al transferir su energía al $^3\text{O}_2$ que se transforma en $^1\text{O}_2$.



Esta ERO posee una extrema reactividad con todas las biomoléculas. Es un agente oxidante no selectivo que daña lípidos insaturados, colesterol, residuos de α -aminoácidos en proteínas (cisteína, histidina, metionina, tirosina y triptófano), bases púricas con el consecuente daño en ADN y ARN (Gambino & Capitelli, 2016; Mattila *et al.*, 2015).

Si bien el $^1\text{O}_2$ es muy tóxico para la célula, su efecto está restringido porque su radio de acción (5-20 nm) es limitado debido a que posee un tiempo de vida muy corto (3,1 μs en agua); incluso en las células fúngicas puede recorrer distancias pequeñas (Lopez Chicón *et al.*, 2012; Mattila *et al.*, 2015).

Estos dos mecanismos fotosensibilizantes pueden ocurrir simultáneamente; y la proporción en la cual estos dos procesos ocurren depende de la naturaleza del FS, del sustrato y de la concentración de $^3\text{O}_2$ (Dai *et al.*, 2012).

A su vez se ha descrito que algunos FS, en su estado excitado, pueden unirse al ADN a través de un proceso de fotoadición, formando fotoaductos covalentes que impiden la replicación y transcripción del ADN u originar un fotoproducto que rompe las membranas celulares (Laustriat, 1986). Sin embargo, no se descarta que ocurran procesos oxidativos simultáneamente, como en el caso de los psoralenos (Nagy *et al.*, 2010).

I.6- Fotosensibilización y defensas antioxidantes

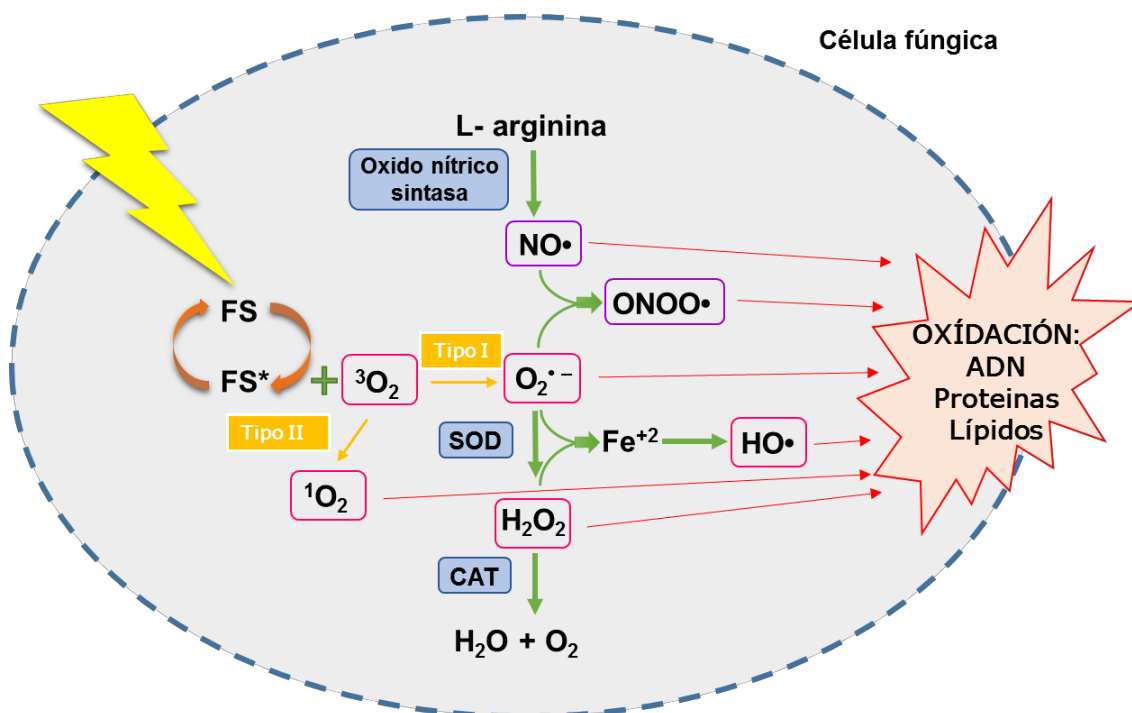
La alteración fotoquímica o fotofísica de una entidad molecular, como resultado de una absorción inicial de radiación por otra entidad molecular, en este caso el FS, se conoce como proceso de **fotosensibilización**.

En terapia fotodinámica (TFD), la entidad que sufre la alteración fotoquímica o fotofísica es el $^3\text{O}_2$, a través de cualquiera de los mecanismos ya explicados: Tipo I (producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$) o Tipo II (generación de $^1\text{O}_2$) (Baltazar *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2012; Hamblin, 2016).

Un mecanismo a tener en cuenta cuando existe sobreproducción de $\text{O}_2^{\bullet-}$, es la generación del radical óxido nítrico (NO^{\bullet}) por activación de la enzima óxido nítrico sintasa (Fig. 1.3). El NO^{\bullet} reacciona con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ para formar peroxinitrito (ONOO^{\bullet}), actuando como secuestrante de esta ERO en una reacción que podría considerarse como un mecanismo de defensa que es dependiente de la concentración de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y que se genera frente a un exceso de la misma (Hurtado Bredda *et al.*, 2005). Sin embargo, se forma una especie reactiva del nitrógeno (ERN) de gran toxicidad, ya que

el ONOO• es un agente fuertemente oxidante y nitrante a nivel de proteínas y lípidos de membrana e intracelulares (Hurtado Bredda *et al.*, 2005).

Figura 1.3 Esquema de fotosensibilización y defensas antioxidantes (adaptada de Baltazar *et al.*, 2015)



La reactividad de las ERO ($\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\text{HO}\bullet$ y $^1\text{O}_2$) generadas en la fotosensibilización dinámica, incluso de las ERN y de los radicales peróxidos de sustratos ($\text{RH-OO}\bullet$), se reduce debido a la presencia en las células de sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Las principales enzimas involucradas en el sistema antioxidante son la SOD que produce la dismutación del $\text{O}_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 ; la catalasa (CAT) que desactiva el H_2O_2 , generando agua y oxígeno molecular; y algunas peroxidasas, como la glutatión peroxidasa (GSH), que en presencia de un compuesto donador de electrones, catalizan la conversión de H_2O_2 en agua (Dai *et al.*, 2012; Mattila *et al.*, 2015; Ochsner, 1997). En *C. albicans* se han descrito 6 genes que codifican para SOD; y estas enzimas se pueden encontrar en citoplasma, en la superficie celular y en mitocondrias (Frohner *et al.*, 2009; Missall *et al.*, 2004). Mientras que para CAT se ha descrito un gen y esta enzima se localiza en el citoplasma (Roman *et al.*, 2016).

Entre los compuestos no enzimáticos, se pueden citar los péptidos antioxidantes como el glutatión, que actúa como secuestrantes de $\text{HO}\bullet$ y $^1\text{O}_2$ (Hurtado Bredda *et al.*, 2005; Missall *et al.*, 2004), azúcares antioxidantes como el ácido

ascórbico, vitaminas como el α -tocoferol, y carotenos que desactivan tanto ERO como otros radicales orgánicos formados (Hurtado Bredda *et al.*, 2005; Missall *et al.*, 2004).

Cuando se altera el equilibrio entre las ERO, las ERN y los sistemas de defensa, la acumulación de estas especies en las células conduce a una condición conocida como estrés oxidativo y nitrosativo, respectivamente (Hurtado Bredda *et al.*, 2005; Baltazar *et al.*, 2015). En esta condición, la concentración de ERO y ERN es tan alta que puede dar lugar al daño de moléculas biológicas, y la consecuente muerte celular necesaria para lograr la regresión de las infecciones (incluso un tumor en TFD) (Baltazar *et al.*, 2015; Missall *et al.*, 2004).

Simultáneamente a esta defensa antioxidante que actúa directamente sobre las especies reactivas, se activa otro sistema enzimático que repara el daño producido por estas ERO sobre moléculas biológicas. Como ejemplo se pueden citar la sulfóxido metionina reductasa que repara los residuos de metionina en proteínas dañadas; las endonucleasas, exonucleasas y ADN-polimerasas que reparan el ADN dañado por estrés oxidativo (Missall *et al.*, 2004).

1.7- Agentes fotodinámicos usados en la práctica clínica

En la práctica clínica, los fármacos fotosensibilizantes se desarrollaron en función de su aplicación en la TFD oncogénica. En particular, los FS dinámicos se dividen en primera, segunda y tercera generación, según su desarrollo y evolución.

Los FS de primera generación son los derivados de hematoporfirina (HpD), que constituyen la base de los medicamentos comercialmente conocidos como Photofrin® (EEUU), Photosan (Alemania) y sus análogos en otros países (Bonnettt, 2000; Yoon *et al.*, 2013).

A pesar que la actividad clínica de los HpD ha sido ampliamente demostrada, e incluso se cuenta con una extensa experiencia clínica en la bibliografía, estos FS de primera generación muestran una serie de desventajas (Yoon *et al.*, 2013; Bonnettt, 2000). Se pueden destacar que su respuesta clínica es imposible relacionarla a una estructura molecular definida, ya que se trata de una mezcla compleja de HpD. Además, el efecto anticancerígeno es moderado; no son suficientemente selectivos; poseen una banda de absorción débil alrededor de 630 nm, que requiere mayor dosis de FS o mayor dosis de luz o una combinación de ambos para generar un nivel adecuado de FS excitado.

Debido a estas desventajas, se desarrolló una segunda generación de FS. Se trata de moléculas definidas, obtenidas por síntesis simple y con alto rendimiento, con mejor actividad y selectividad, que no necesariamente estaban relacionadas a la

porfirinas (Yoon *et al.*, 2013; Bonnett, 2000). Entre ellos se incluyen protoporfirinas, ácido sulfónico de tetraporfirinas, tetrahidroxifenilporfirinas, meso-alquilporfirinas, clorinas, bacterioclorinas, purpurinas, benzoporfirinas, ftalocianinas, naftolocianinas, ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), entre otros (Yoon *et al.*, 2013).

La estrategia de asociar los FS de segunda generación con transportadores específicos para aumentar la afinidad por el tejido tumoral, dio lugar a los FS de tercera generación. Esto se logra por ejemplo a través de la conjugación del FS con anticuerpos monoclonales (dirigido contra los antígenos tumorales); o unión del FS a lipoproteínas de baja densidad o moléculas de folato, ya que los receptores de estos compuestos están sobre-expresados en la superficie de las células tumorales. También se están usando sistemas nano-estructurados de liberación de FS (Yoon *et al.*, 2013). Estas estrategias se encuentran en continuo desarrollo en la actualidad.

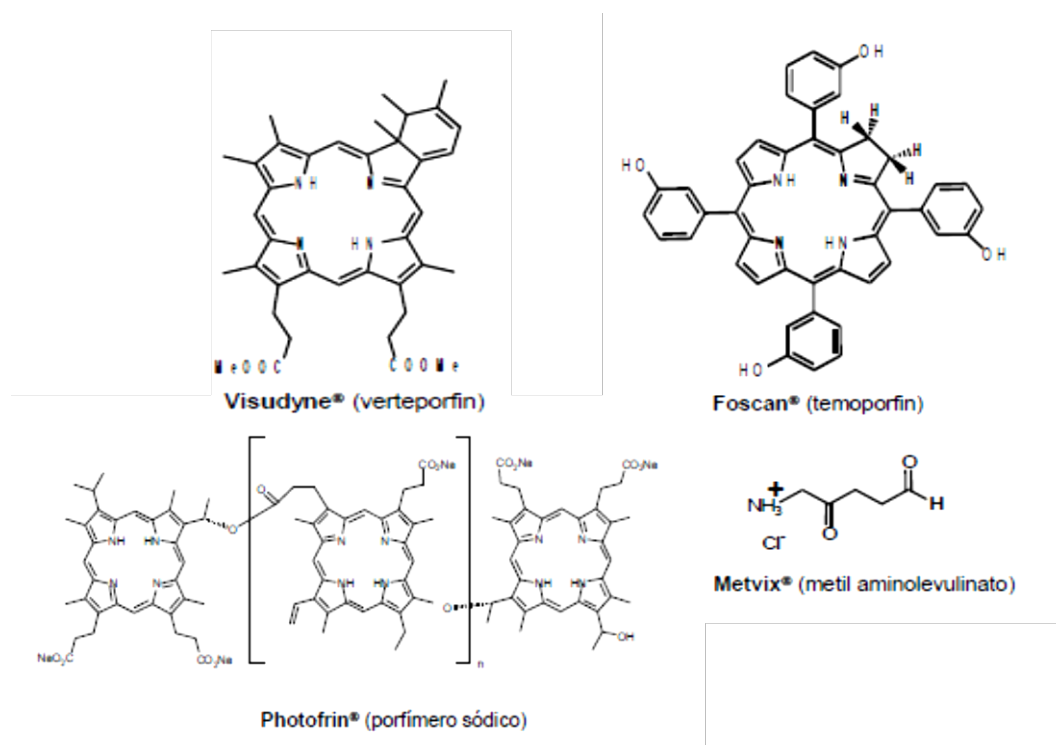
Por otro lado, se han probado otros FS químicamente no relacionados a las porfirinas. Estos incluyen una gran variedad de colorantes orgánicos, algunos de ellos de origen natural. Entre ellos, podemos nombrar:

- a) Colorantes derivados de acridina (acriflavina, naranja de acridina).
- b) Fenotiacinas, las más usadas son el azul de metileno y el azul de toluidina.
- c) Colorantes del tipo xantenos, entre los que se destacan fluoresceína, derivados halogenados de fluoresceína como eosina y rosa de bengala.
- d) Colorantes de cianina que se desarrollaron como sensibilizadores fotográficos, como Merocianina 540 e Indocianina verde.
- e) Quinonas como Hipericina

En nuestro país, actualmente, sólo hay cuatro FS autorizados por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) para su uso clínico en TFD oncológica (Fig. 1.4). Tres de ellos son derivados de la porfirina: Visudyne, Foscan y Photofrin (Disposición autorizante ANMAT 3064/00, 7641/07 y 7094/07, respectivamente). El cuarto (Metvix) es un derivado del ácido amino levulínico, el clorhidrato de metil-aminolevulinato (Disposición autorizante ANMAT 7392/12).

Por otro lado, en TFDa se han probado los mismos FS que se desarrollaron para la TFD en cáncer. Entre ellos podemos citar: porfirinas, clorinas, ftalocianinas, 5-ALA y fenotiazinas, especialmente los colorantes azul de metileno y azul de toluidina (O’Riordan *et al.*, 2005; Calzavara-Pinton *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2012; De Melo *et al.*, 2013).

Figura 1.4 Fármacos aprobados por ANMAT para su uso en TFD y su nombre comercial.



Aunque se han estudiado una gran variedad de FS como potenciales antimicrobianos, es importante destacar que las estructuras óptimas para la inactivación de las células bacterianas y fúngicas pueden ser sutilmente diferentes de los FS utilizados para el cáncer. En general, las estructuras más lipofílicas, con una menor cantidad de cargas catiónicas, parecen ser mejores para la inactivación células fúngicas (Dai *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que los biofilms de *C. albicans* son sensibles a la TFDa mediada por Photofrin®. También *C. albicans* y *C. dubliniensis* fueron susceptibles a la TFDa con eritrosina, pero los biofilms de ambas especies de *Candida* fueron más resistentes que sus homólogos en estado planctónico. La combinación de eritrosina y rosa de bengala en TFDa tiene algún efecto en los biofilms, siendo también eficaz en la reducción y destrucción de blastoconidios e hifas de *C. albicans*. Además, la TFDa utilizando azul de metileno y láser (660 nm) mostró una leve reducción en biofilms de *C. albicans* (Dai *et al.*, 2012).

Por todo lo expuesto, la TFDa emerge como un nuevo enfoque para tratar infecciones. En este marco la búsqueda de nuevas sustancias fotosensibilizadoras es un área de investigación con actual y amplio desarrollo en las últimas décadas. Considerando los satisfactorios resultados obtenidos al utilizar esta terapia (Baltazar *et*

al., 2015; Hamblin, 2016), la significancia de encontrar nuevos FS, sobre todo de origen natural, es relevante.

I.8- Productos naturales como fotosensibilizadores

El estudio de las plantas como una alternativa a otras formas de descubrimiento de fármacos, ha atraído una gran atención. Según la Organización Mundial de la Salud, las especies vegetales serían las mejores fuentes para la obtención de una amplia variedad de fármacos; las cuales además, podrían beneficiar a una extensa población, ya que se trata de un recurso renovable fácilmente accesible (Sardi *et al.*, 2013; Scorzoni *et al.*, 2016).

Como antecedente, podemos citar a la especie *Althernanthera marítima*, una planta herbácea comúnmente distribuida en las playas de la costa brasileña. Los extractos de hexano y etanol obtenidos de partes aéreas, han mostrado efecto fotosensibilizador, ya que produjeron un efecto antifúngico frente a *C. dubliniensis* cuando fueron irradiados con un láser a 685 nm (Gasparetto *et al.*, 2010).

Algunos compuestos naturales han sido bien establecidos como FS, entre ellos, se destaca la hipericina. Este pigmento natural obtenido de las plantas de *Hypericum*, ha sido ampliamente estudiado como FS. El efecto fotodinámico de este pigmento natural se ha ensayado frente a varias especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*) (Rezusta *et al.*, 2012) y también contra dermatofitos (*Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*) (Paz-Cristobal *et al.*, 2014). La TFDa con hipericina ha demostrado ser eficaz solamente sobre *C. albicans* sin daño a las células normales de la piel (Paz-Cristobal *et al.*, 2013). En tanto que sobre dermatofitos, este pigmento ha resultado fungicida *in vitro* (Paz-Cristobal *et al.*, 2013).

Otro FS de origen natural es la curcumina, la cual se ha utilizado en TFDa con buena eficacia sobre levaduras en estado planctónico y sobre biofilms de algunas especies de *Candida*, tales como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. dubliniensis* (Andrade *et al.*, 2013; Dovigo *et al.*, 2011).

I.9- Una planta fototóxica: *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. (Rubiaceae)

En la búsqueda de compuestos fotosensibilizadores con potencial actividad antimicrobiana, el grupo de Farmacognosia ha estudiado ampliamente una planta fototóxica: *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) (Núñez Montoya, 2002). Es un arbusto de 2 a 3 m de altura que crece en la región Andina de Argentina y Bolivia, entre los 2500-3000 metros sobre el nivel del mar (Fig. 1.5) (Bacigalupo, 1993).

Figura 1.5 *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) (A) arbusto, (B) partes aéreas.



En Argentina, su hábitat está circunscripto a las provincias de Jujuy, Salta y Tucumán. Popularmente esta especie es conocida como “cegadera”, “ciegadera” o “saruera” debido a los efectos tóxicos que produce en el ganado con predominio de pelaje blanco (ovino, bovino, mular y equino), específicamente ceguera (queratoconjuntivitis) y lesiones dérmicas (dermatitis) (Hansen y Martiarena, 1967).

I.9.1- Estudio fitoquímico

A partir de las hojas y tallos de esta planta, se aislaron antraquinonas (AQs), flavonoides y un iridoide conocido como asperulósido (Fig. 1.6). Se estableció que los metabolitos secundarios predominantes son derivados antraquinónicos del tipo aglicones (Núñez Montoya, 2002; Núñez Montoya *et al.*, 2003; 2006).

Este estudio fitoquímico permitió estimar que las AQs serían los compuestos responsables del efecto fototóxico de la planta, ya que otras estructuras antraquinónicas habían sido asociadas a procesos de fotosensibilización (Hipericina) (Rajendran, 2016). Con el propósito de corroborar este supuesto, se realizó un ensayo *in vivo* en donde se demostró que soranjidiol y rubiadina, principales componentes de esta planta, llegan a piel y generan síntomas de fotosensibilización (fotofobia, inflamación, eritema, prurito y petequias) en ratones Balb-C expuestos a la luz solar. También se demostró que estos síntomas se revierten si los animales dejan de ser expuestos a la luz solar (Núñez Montoya *et al.*, 2008)

I.9.2- Caracterización fotofísica, fotoquímica y fotobiológica de antraquinonas

La caracterización fotofísica y fotoquímica de las AQs aisladas de esta especie vegetal implicó la cuantificación de la producción de $O_2^{\bullet-}$ (Mecanismo fotosensibilizante Tipo I) y 1O_2 (Mecanismo fotosensibilizante Tipo II).

Mediante la caracterización fotobiológica, se pudo demostrar que las AQs en estudio son capaces de foto-estimular el metabolismo oxidativo de monocitos y neutrofilos, incrementando la formación de $O_2^{\bullet-}$ bajo irradiación (Núñez Montoya *et al.*, 2005). El único compuesto que no incrementó la producción de esta ERO fue 5,5'-bisoranjidiol. Por lo tanto, estos derivados antraquinónicos se estarían comportando como agentes fotosensibilizadores Tipo I, siendo damnacantal el que se destaca por ser el mejor productor de esta ERO a la menor concentración probada (Núñez Montoya *et al.*, 2005).

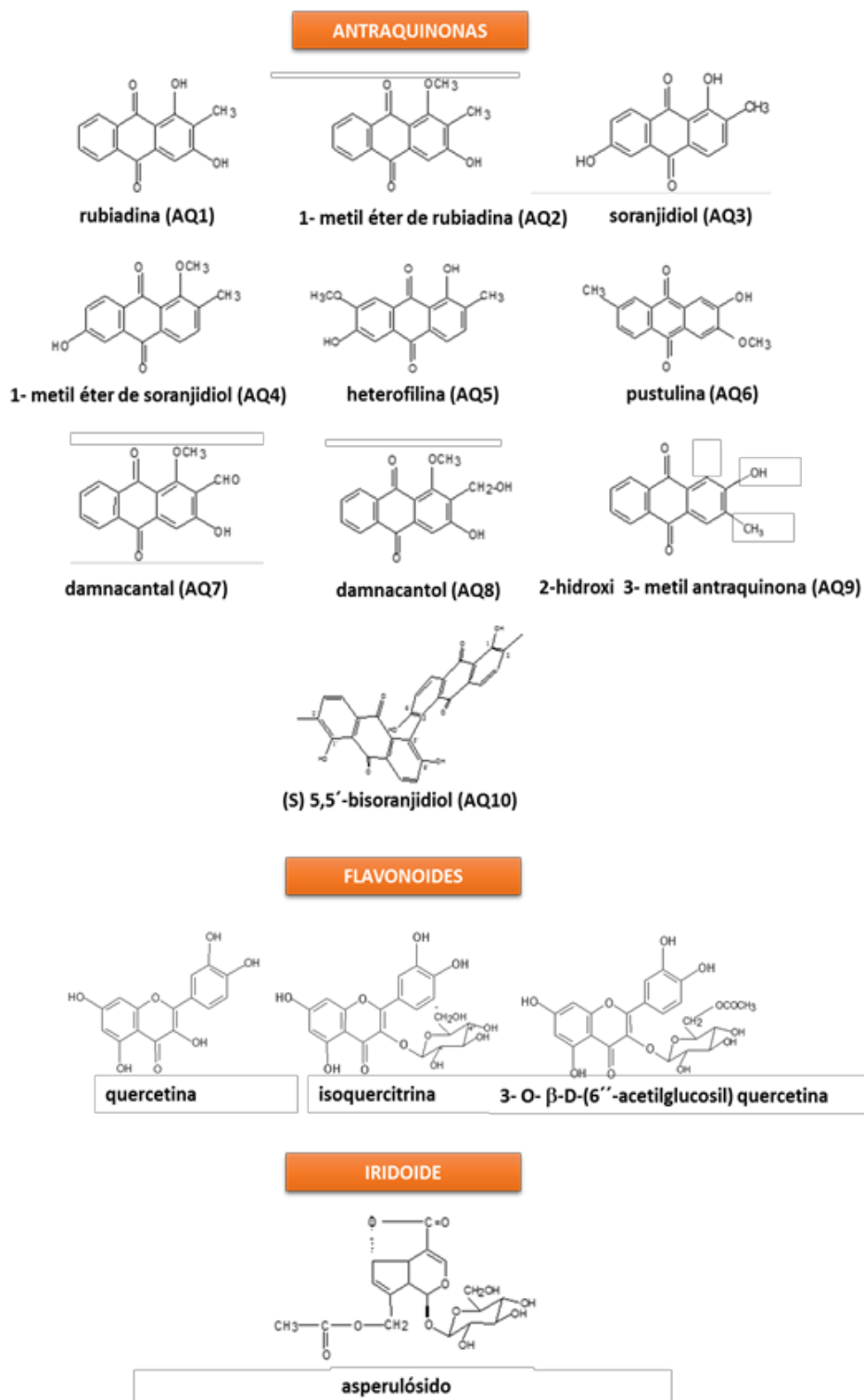
En cuanto a la generación de 1O_2 , se llevaron a cabo estudios fotofísicos y fotoquímicos de este grupo de AQs. El número de moléculas de 1O_2 producidas por cada fotón absorbido por un FS, se denomina rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete (ϕ_Δ). Esta producción de 1O_2 se determinó a través de una técnica en tiempo resuelto que mide la luminiscencia infrarroja cuando se desactivan las moléculas de 1O_2 producidas (Núñez Montoya *et al.*, 2005).

Se demostró que las AQs aisladas de *H. pustulata*, con excepción de 1-metil éter de rubiadina, son capaces de generar 1O_2 en $CHCl_3$. Se destaca damnacantal como el mejor productor de esta ERO bajo estas condiciones (Núñez Montoya *et al.*, 2005). En consecuencia, esta propiedad las postularía como FS Tipo II.

A su vez, se pudo estimar que el camino predominante de relajación de estos derivados sería a través de un ISC desde el primer singlete excitado ($^1AQ^*$) al triplete ($^3AQ^*$), y que la mayoría de estos compuestos poseen bajos valores de fluorescencia (10^{-2} - 10^{-4}). El rendimiento cuántico relativo de fluorescencia (ϕ_f) de cada AQ se estimó en comparación con 9,10 difenil antraceno (9,10 DFA) y naftaleno.

Al mismo tiempo se pudo determinar que estos compuestos son pobres o moderados desactivantes del 1O_2 (estudio fotoquímico), lo cual los definió como mejores FS Tipo II, ya que no desactivan de manera relevante al 1O_2 generado por ellos mismos (Núñez Montoya *et al.*, 2005). Mediante estudios de fotólisis, se pudo establecer que las AQs como tal son las que generaron 1O_2 mediante un proceso de fotosensibilización y no algún fotoproducto, ya que fueron estables bajo condiciones de irradiación.

Figura 1.6 Estructura química de los metabolitos secundarios aisladas de hojas y tallos de *H. pustulata*.



En vista de todos estos avances realizados sobre el estudio de la planta fototóxica *H. pustulata*, en esta tesis doctoral se pretende investigar el uso potencial de las principales AQs fotosensibilizantes en TFDa.

II- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1- Hipótesis

Se plantea como hipótesis de este trabajo de tesis doctoral que las AQs aisladas de *Heterophyllaea pustulata*, con acción fotosensibilizadora, podrían tener actividad antifúngica sobre hongos en biofilms. Así, el efecto antifúngico podría ser foto-estimulado y por lo tanto, relacionado con el estrés oxidativo celular.

II.2- Objetivos

II.2.1- Objetivo general

El objetivo general del presente proyecto fue aislar y purificar principios fotosensibilizadores biológicamente activos, presentes en plantas autóctonas de nuestro país, evaluando su capacidad antifúngica sobre biofilms del género *Candida* y su relación con la generación de metabolitos reactivos del oxígeno.

II.2.2- Objetivos específicos

1) Evaluar la actividad de los extractos y de las AQs mayoritarias aisladas de *H. pustulata* sobre *Candida no albicans* formadora de biofilms, estudiando la citotoxicidad de los principios que resulten activos sobre células eucariotas.

2) Establecer si el efecto antifúngico producido por las AQs sobre biofilms podría ser incrementados por acción de la luz.

3) Evaluar si el posible mecanismo de acción de estos metabolitos fotosensibilizadores está relacionado con la generación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.

4) Determinar posibles efectos sinérgicos entre estas AQs con agentes antifúngicos usados actualmente en la terapéutica.

III- MATERIALES Y MÉTODOS

III.1- METODOLOGÍAS USADAS EN EL ANÁLISIS FITOQUÍMICO

III.1.1- Recolección e identificación del material vegetal

La planta entera, en estado de fructificación, se recogió en El Alisal (Departamento de Rosario de Lerma, Salta, Argentina) en febrero de 2013. Fue identificada por la Dra. Gloria Barboza (Museo Botánico de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, IMBIV-CONICET) como *Heterophyllaea pustulata* Hook. F (Rubiaceae). Una muestra de herbario se depositó en el Museo Botánico de Córdoba como J. Micheloud s/n, CORD 19759 (Marioni *et al.*, 2016a).

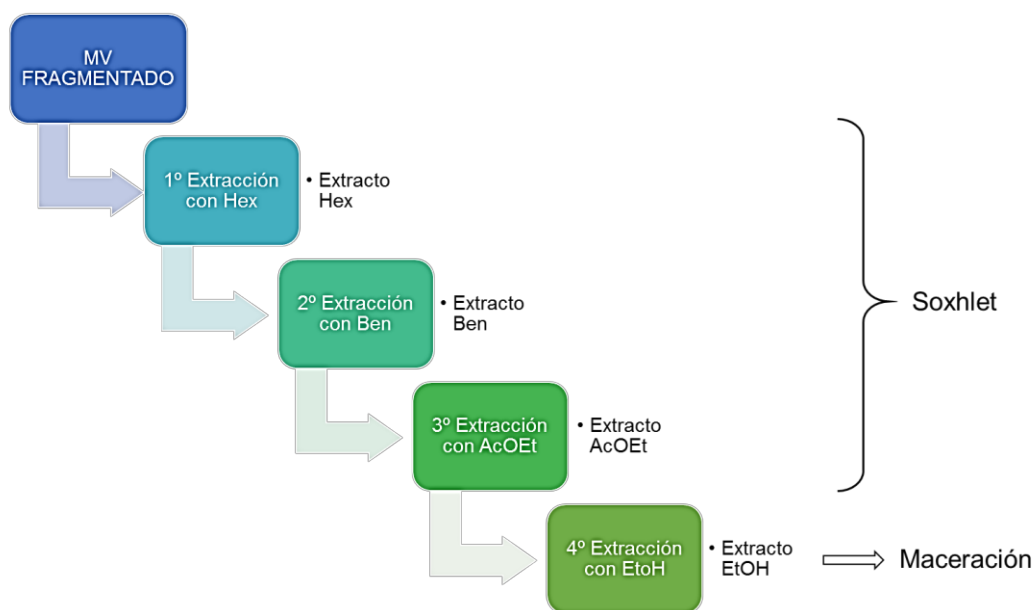
III.1.2- Preparación del material vegetal

El material vegetal (MV) se secó a la sombra y a temperatura ambiente, con rotación esporádica a fin de permitir un desecado homogéneo. Posteriormente, se realizó una inspección visual de todo el MV, durante la cual se descartó la materia extraña: vegetal (partes de la planta deterioradas u otras especies vegetales), inorgánica y animal. Posteriormente, el MV se separó en tres grupos: raíces, tallos - hojas (que se llamó partes aéreas) y frutos. Las partes aéreas y las raíces, en forma separada, se fragmentaron en una primera instancia a mano. Seguidamente, se molieron en un molino a cuchillas (Retsch KG tipo SK1, N° 13176, Alemania) a través de un tamiz N° 6.

III.1.3- Obtención de extractos

Las partes aéreas (270 ± 1 g) y las raíces (90 ± 1 g) por separado, se extrajeron sucesivamente con solventes de polaridad creciente en un aparato Soxhlet: hexano (Hex), benceno (Ben) y acetato de etilo (AcOEt). Finalmente, cada grupo de MV se sometió a una maceración con etanol (EtOH) (Fig. 3.1). De esta forma, se obtuvieron cuatro extractos para cada grupo (Hex, Ben, AcOEt y EtOH), los cuales se concentraron a presión reducida hasta sequedad en un evaporador rotatorio (Büchi, R110, Brasil) (Núñez Montoya, 2002; Núñez Montoya *et al.*, 2003).

Figura 3.1 Esquema de obtención de extractos con solventes de polaridad creciente.



MV: Material vegetal, Hex: hexano, Ben: benceno; AcOEt: acetato de etilo, EtOH: etanol.

III.1.4- Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en extractos: Cromatografía líquida de alta resolución

Teniendo en cuenta los antecedentes químicos de *H. pustulata* (Núñez Montoya, 2002; Núñez Montoya *et al.*, 2003), se desarrolló una metodología que utiliza cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta-visibe (HPLC-UV-Vis: High Performance Liquid Chromatography) para realizar la identificación y cuantificación de los principales compuestos químicos presentes en los extractos obtenidos, específicamente AQs y flavonoides. A su vez, la identidad de estos metabolitos se corroboró por HPLC con detector de arreglo de diodos (DAD) y acoplada a espectrómetro de masa-masa (HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF: High Performance Liquid Chromatography/Diode-array detector/Mass Spectrometry).

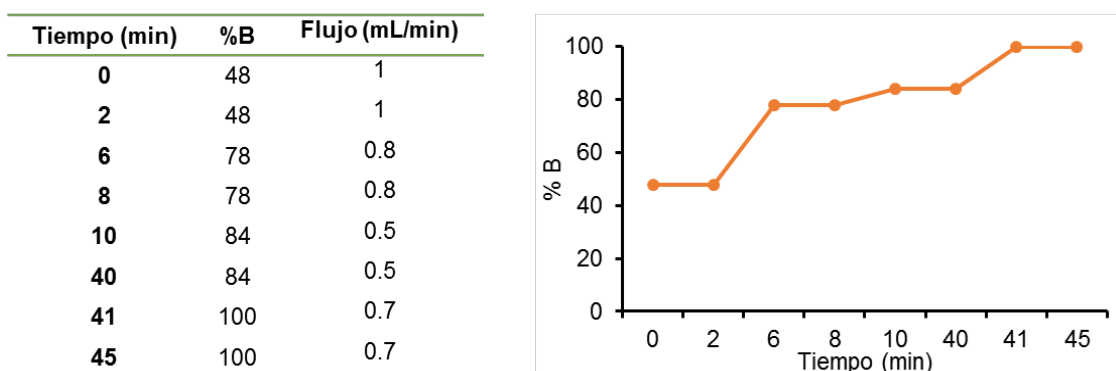
A- Ensayo analítico de HPLC-UV-Vis

Se utilizó un cromatógrafo Varian Pro Star (modelo 210, 04171 serie, EEUU), equipado con un detector ultravioleta-visible (UV-Vis) y una columna C-18 Microsorb MV-100-5 (250 x 4,6 mm de diámetro interno, Agilent, Holanda). La fase móvil (FM) estuvo compuesta por dos soluciones: ácido fórmico 0,16 M (A) y metanol (MeOH)-ácido fórmico 0,16 M (B). El gradiente de elución con flujo variable se muestra en la Fig. 3.2. El detector UV-Vis se utilizó a 269 nm. El volumen de inyección manual fue de

20 μ L. El análisis de los datos se realizó mediante el software Star Chromatography Workstation 6.41 (Varian, EEUU).

Como testigos de AQs y flavonoides se utilizaron los compuestos previamente purificados por el grupo de Farmacognosia, los cuales se identificaron por medio de sus datos espectrales: espectrofotometría UV-Vis, infrarrojo (IR), espectrometría de masa (EM), y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en una y dos dimensiones (Núñez Montoya, 2002; Núñez Montoya *et al.* 2003, 2006).

Figura 3.2 Gradiente de elución utilizado en el ensayo analítico HPLC-UV-Vis



Cada extracto desecado y cada compuesto de referencia se pesaron y a continuación, se disolvieron en el volumen necesario de MeOH grado HPLC (MeOH-HPLC, Sintorgan) para obtener soluciones de 1 mg/mL. Finalmente, cada solución se filtró a través de papel Whatman N° 1 (sistema de micro-filtración).

La identificación se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención (t_R) con los obtenidos para cada compuesto de referencia y realizando co-cromatografía, mediante el agregado del estándar a la solución de extracto. Los valores de t_R de cada metabolito identificado se expresaron como la media \pm desviación estándar de tres inyecciones para cada muestra.

La cuantificación se realizó por el método de calibración externa. La concentración de cada AQ identificada se expresó como rubiadina (**AQ1**) y la de cada flavonoide como quercetina (**Quer**). Para cada uno de estos estándares se confeccionó una curva de calibración (**AQ1** y **Quer**, 94-96 % pureza según HPLC), graficando el área bajo la curva de cada pico (ABC) en función de la concentración de cada analito. A partir de una solución madre de cada analito (1 mg/mL) en MeOH-HPLC se prepararon cinco diluciones consecutivas (1:2), en el intervalo de 0,10 a $6,25 \times 10^{-3}$ mg/mL para **AQ1**, y 0,20 - $1,25 \times 10^{-2}$ mg/mL para **Quer**. Las soluciones madre se prepararon por triplicado, y a partir de ellas se realizaron tres curvas de calibración en dos días consecutivos (dos curvas el primer día, y la tercera al día

siguiente). Todas las soluciones se conservaron a -20 °C durante la realización de estas curvas. A partir del análisis de regresión lineal, el valor mínimo aceptable para el coeficiente de correlación (R^2) de la curva fue $\geq 0,99$. A partir de la curva de calibración de **AQ1**, se determinó la concentración de cada AQ en los extractos por extrapolación del ABC de cada compuesto. De la misma manera, se determinó la cantidad de flavonoides, pero utilizando la curva de calibración de **Quer**. Por último, la concentración de cada compuesto se expresó como porcentaje peso en peso (% p/p) en el extracto desecado.

Este método analítico de HPLC también se usó para establecer el grado de pureza de las AQs. En este caso, se informó el porcentaje del compuesto purificado en la muestra inyectada, el cual fue calculado por el software Star Chromatography Workstation 6.41, según el método de normalización de aéreas.

B- Validación del método analítico de HPLC-UV-Vis

Se realizó una serie de ensayos para garantizar que el método de validación cumpliera con las directrices de la "Food and Drug Administration" (FDA), establecidas en la Conferencia Internacional de Armonización (International Conference on Harmonization, 2005a, b). Estas directrices incluyen la determinación de los siguientes parámetros del método analítico: selectividad, linealidad y rango lineal, límites de detección (LOD: Limit of detection) y cuantificación (LOQ: Limit of quantitation), precisión y exactitud intra e inter-día.

La selectividad estuvo dada por la λ elegida, que permitió detectar los compuestos de interés sin interferencias. La linealidad de la curva de trabajo se comprobó mediante la verificación del cumplimiento de la Ley de Lambert-Beer en el rango de concentraciones ensayadas para cada uno de los compuestos de referencia (**AQ1** y **Quer**), y se expresó como $R^2 \geq 0,99$.

Los valores de LOD y LOQ de cada uno de los compuestos de referencia (**AQ1** y **Quer**) se determinaron a partir de la desviación estándar de la intersección en y - (S_b) y la pendiente "a" de la curva de calibrado, obtenida por dilución de las soluciones patrón de forma secuencial de cada uno de los compuestos correspondientes (Quattrocchi *et al.*, 1992).

La precisión y la exactitud intra- e inter-día del sistema cromatográfico se evaluó mediante el uso de dos concentraciones de cada analito (**AQ1** y **Quer**), ambas seleccionadas de las respectivas curvas de calibrado (dentro del rango de linealidad). Cada concentración se preparó por triplicado, mediante la dilución de las respectivas soluciones madre que se prepararon como se describió anteriormente (Punto II-1.4-A).

Las dos soluciones de concentración conocida de cada estándar de referencia, cada una por triplicado, se analizaron en el mismo día (repetitividad) y en 3 días consecutivos (reproducibilidad). El criterio de aceptabilidad para la precisión intra- e inter-día fue la desviación estándar relativa (RSD: relative standard deviation) para cada concentración ensayada, la cual no debe superar el valor máximo de RSD calculado por la ecuación de Horwitz (Ecuación 1), donde C es el LOD de cada analito expresado en logaritmo de base 10 (Horwitz, 1982).

$$RSD_{\max} = 2^{(1-0,5\log C)}$$

Ecuación 1

Las precisiones intra e inter-día del procedimiento analítico, junto con la exactitud (recuperación de los analitos) se evaluaron por el agregado del estándar **AQ1** (45 mg/mL) al extracto Ben y del estándar **Quer** (30 mg/mL) al extracto de AcOEt. Los extractos enriquecidos con los respectivos estándares se inyectaron en el cromatógrafo por tres días consecutivos, siguiendo el método aplicado para el análisis de las muestras. Las variaciones se establecieron utilizando la RSD de las inyecciones por triplicado. La exactitud del método se evaluó mediante el análisis del porcentaje de recuperación del compuesto **AQ1** en el extracto Ben y del compuesto **Quer** en el extracto de AcOEt. Este porcentaje de recuperación se calculó utilizando la relación entre el contenido detectado (real) respecto al contenido agregado (teórico).

C- Ensayo analítico de HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF

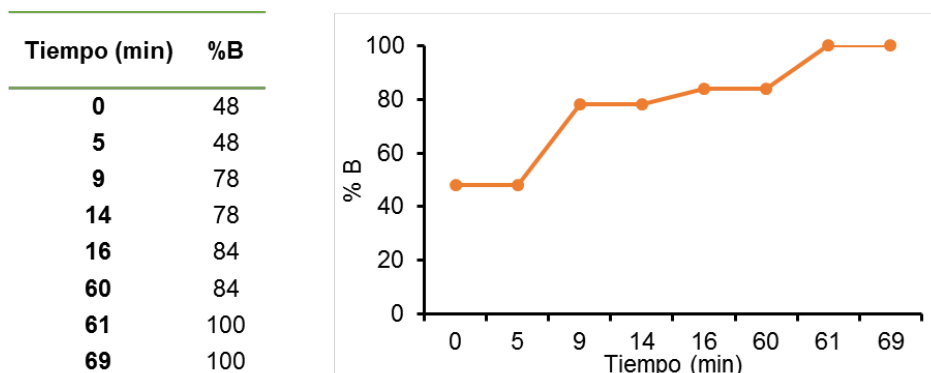
Se utilizó un cromatógrafo Agilent Technologies (1200 series, EEUU), equipado con una bomba de gradiente (Agilent G1312B SL Binary), un desgasificador de solventes (Agilent G1379 B) y un inyector automático (Agilent G1367 D SL + WP). El sistema de HPLC está conectado a un detector DAD (Agilent G1315 C Satarlight), el cual está acoplado a un espectrómetro de masa-masa (MS-MS, serie micrOTOF-Q11, Bruker), equipado con una interfaz de ionización por electro spray (ESI). Se utilizó la misma columna que en Punto III-1.4-A.

La FM estuvo compuesta por las dos soluciones anteriormente utilizadas. El gradiente de elución a un flujo constante de 0,4 mL/min se muestra en la Fig. 3.3.

El volumen de inyección fue de 40 μ L. El detector DAD se utilizó a 269, 362 y 410 nm. Los espectros UV-Vis se registraron de 200 a 600 nm. La medición de la masa se registró en el modo de iones negativos entre relación masa/carga (m/z) 50 y 1000. Las condiciones de trabajo para la fuente de ionización fueron las siguientes: voltaje capilar 4500 V; nebulizador de presión de gas 4,0 bares; flujo de gas de secado 8,0 L/min y temperatura del gas de secado 180 °C. Se utilizaron nitrógeno y argón

como nebulizador y gases de colisión, respectivamente. El detector de MS fue programado para realizar una exploración MS-MS de los tres iones más abundantes, usando energía de colisión de 15,0 eV. La adquisición y el procesamiento de datos se realizaron utilizando el software Compass Versión 3.1 y el software Data Analysis Version 4.0 (Bruker Daltonics GmbH, EEUU), respectivamente.

Figura 3.3 Gradiente de elución utilizado en el ensayo analítico HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF



Se utilizaron las mismas soluciones de testigos y extractos que se prepararon para HPLC-UV-Vis (II-1.4-A) (Núñez Montoya, 2002; Núñez Montoya *et al.* 2003, 2006).

La identificación se llevó a cabo por comparación de los t_R , espectros UV y rompimientos del ión $[M-1]$ con los obtenidos para cada compuesto de referencia.

III.1.5- Métodos de separación y purificación de antraquinonas

A- Cromatografía en columna

Se utilizó cromatografía de adsorción que usa como fase estacionaria (FE) sílica gel 60 (Merck, Alemania), de 70 – 230 mesh ASTM. La FM consistió en un gradiente de elución de dos o más solventes, los cuales variaron según la naturaleza físico-química de los compuestos a separar. Todas las columnas fueron seguidas analíticamente por cromatografía en capa fina (TLC: Thin Layer Chromatography).

B- Cromatografía en capa fina preparativa

La TLC como técnica preparativa (TLCp) permite la separación y purificación de los componentes de una mezcla.

En este caso, se emplearon dos tipos de placas. Unas elaboradas manualmente con sílica gel 60 G (Merck, Alemania) y agua destilada en una proporción 1:1,5 sobre un vidrio de 20 x 20 cm, para mezclas o fracciones con muchos componentes; y cromatofolios de sílica gel 60 sin indicador de fluorescencia (Merck, Alemania, 20 x 20 cm) para mezclas o fracciones con menor cantidad de componentes. El tamaño de ambas placas permitió sembrar entre 5 y 10 mg de la mezcla a separar, en forma de banda. Las placas se desarrollaron en la FM que presentó mejor resolución, según la TLC analítica previamente realizada. Las manchas de AQs se revelaron con luz UV y vapores de NH₃ con luz UV. Todos los compuestos purificados por TLCp fueron extraídos de la sílica gel con AcOEt o acetona.

III.1.6- Métodos de identificación de antraquinonas

A- Cromatografía en capa fina analítica: Co-cromatografía

La TLC como técnica analítica permite la identificación de compuestos, comparando la Relación de frente (R_f) de la sustancia problema con un compuesto testigo. Además, se utilizó esta técnica para analizar las fracciones obtenidas de las cromatografías en columna.

Se utilizaron cromatofolios de sílica gel 60 sin indicador de fluorescencia (Merck, Alemania) como FE. Como FM se emplearon distintas mezclas de solventes, de acuerdo a las propiedades físico-químicas de los compuestos a analizar y con el fin de conseguir la mejor separación. Entre ellas se pueden citar las siguientes fases móviles:

- CHCl₃
- CHCl₃-AcOEt (9:1)
- Ben-AcOEt (80:20)
- Ben-MeOH (95:5)

Las manchas de AQs se revelaron con luz UV, vapores de NH₃ con luz UV y con vapores de NH₃ bajo luz visible (Wagner *et al.*, 1984).

La co-cromatografía es una variante de la cromatografía analítica. En el caso de la TLC, el compuesto desconocido se siembra conjuntamente con el compuesto testigo y a su vez, en forma separada en la misma placa cromatográfica, la cual se desarrolla en la FM que presentó mejor resolución. Permite identificar un compuesto desconocido contra testigo, ya que si son el mismo compuesto, en la siembra conjunta no se separan, presentando la misma R_f .

B- Espectrofotometría Ultravioleta-Visible

Todas las AQs que se obtuvieron en estado puro, se caracterizaron mediante sus espectros UV-Vis en CHCl_3 y EtOH, desde 220 a 800 nm. Para ello se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Cary Win (Santa Clara, EEUU) y celdas de cuarzo. Todos los solventes usados fueron grado espectroscópico.

La identidad de las AQs puras se determinó por comparación de los datos obtenidos en espectrofotometría UV-Vis con los espectros de las AQs testigos.

C- Espectrometría de Masa

Los espectros de masa de ionización electrónica se obtuvieron en un espectrometro de masa Variant Mat CH-7A a 70 eV.

D- Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de RMN se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Advance II 400 (Rheinstetten, Alemania). Los espectros de RMN de protones (RMN- H^1) se realizaron a una frecuencia de 400 MHz y los de carbono 13 (RMN- C^{13}) a 100 MHz de frecuencia. Los compuestos a analizar se disolvieron en solventes deuterados de grado espectroscópico, específicamente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) o acetona deuterada (acetona- d_6). Los corrimientos químicos (δ) se informaron en ppm en relación a tetra metil silano como estándar interno, y los valores de las constantes de acoplamiento (J) se expresaron en Hz. Todos los espectros se procesaron con el software Bruker 1D WIN-NMR versión 6.0 (Bruker, Alemania). Los datos espectrales obtenidos de los compuestos a identificar se compararon con los de los compuestos testigos.

E- Espectroscopía Infrarroja

Los espectros de IR se obtuvieron en un espectrofotometro de infrarrojo Nicolet 5-sxc-FTIR (Madison, WI, USA).

III.2- ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Estos ensayos se realizaron como un trabajo en colaboración con la Dra. Brenda Konigheim del Instituto de Virología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba (UNC).

Los ensayos de citotoxicidad implican evaluar la toxicidad *in vitro* de un compuesto sobre líneas celulares, mediante la evaluación del efecto citopático (EC) y la viabilidad celular (VC).

Para este ensayo, se eligieron las células Vero, las cuales son células de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*, Vero 76 ATCC CRL-587). Las células se cultivaron en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ a 37 °C. Se utilizó Medio Esencial Mínimo (MEM, Gibco), suplementado con diferentes porcentajes de suero fetal bovino (SFB, Natocor) como medio de crecimiento (MC) o medio de mantenimiento (MM), según lo descrito en el Anexo I (Konigheim *et al.*, 2012b).

Los compuestos a ensayar (AQs) fueron disueltos en buffer fosfato salino (PBS: phosphahte-buffered saline) con 1 % de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) como co-solvente para obtener una solución madre de 1 mg/mL. Luego, se realizaron diluciones seriadas 1:2, abarcando un rango de 30 a 50 µg/mL según la solubilidad de cada compuesto.

III.2.1- Efecto citopático

Para evaluar el EC se observaron las alteraciones morfológicas producidas en las células Vero por acción de cada compuesto, mediante microscopía óptica de fase invertida (microscopio Diavert Leitz, de 4x a 100x). Cada dilución se añadió por duplicado a una monocapa de células confluentes ($2,0 \pm 0,6 \times 10^5$ células/mL, incubadas 48 h para alcanzar al menos un 95 % de confluencia). Como control celular (CC) se utilizaron células incubadas solamente con MM. Las placas de cultivo se incubaron a 37 °C en 5 % de CO₂ durante 72 h. La morfología de las células se observó diariamente al microscopio, detectando alteraciones como: modificación del contorno celular (redondeo), retracción de la membrana, desprendimiento de células con la consecuente pérdida de la monocapa, aparición de gránulos y vacuolas en el citoplasma (Ooi *et al.*, 2004).

III.2.2- Viabilidad celular: Ensayo de captación de Rojo Neutro

La VC se midió por el ensayo de captación de rojo neutro (RN), siguiendo el procedimiento descrito por Borenfreund y Puerner (1985) y modificado por Konigheim

et al., 2012. Las mismas diluciones utilizadas en el prueba de EC se añadieron a una similar monocapa confluyente de células, por triplicado y usando CC (n = 3). Después de 48 h de incubación a 37 °C en 5 % de CO₂, se agregó RN incubando 3 h adicionales. La densidad óptica (DO) del RN extraído, se midió a 540 nm utilizando un lector de microplacas (BioTek ELx800, EEUU). La disminución en la VC se calculó como un porcentaje respecto de la DO del CC (100 % de viabilidad). La concentración del compuesto que redujo las células viables al 50 % se definió como concentración citotóxica (CC₅₀). La máxima concentración no citotóxica (MCNC) se definió como la concentración más alta de compuesto que mostró más del 90 % de células viables y sin ejercer ningún EC (Liu *et al.*, 2009). La concentración Sub-tóxica (CSubT) se definió como la concentración que causó el 10-20 % de la muerte celular (Cholewa *et al.*, 1994) y produjo ligeros cambios morfológicos observado por microscopía (menos del 20 % de células hinchadas y redondeadas, con inclusiones citoplasmáticas, ligera vacuolización, y sin daño aparente de la membrana celular) (Konigheim *et al.*, 2012a; 2012b). Todas estas concentraciones se estimaron a partir de las curvas dosis-respuesta (% VC vs. concentración de AQ) con el programa GraFit 7.0 (Inglaterra).

III.3- METODOLOGÍAS USADAS EN EL ESTUDIO FOTOMICROBIOLÓGICO:

Estos ensayos se realizaron en el laboratorio de la Prof. Dra. María G. Paraje, IMBIV-CONICET, Cátedra de microbiología, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales (FCEyN), Universidad Nacional de Córdoba.

III.3.1- Identificación de cepas microbianas y condiciones de cultivo

Con el propósito de obtener biofilms fúngicos, se evaluó la capacidad de formación de éstos por parte de 8 cepas clínicas y 2 cepas de referencia de *Candida* spp. Las cepas clínicas fueron identificadas y provistas por el Servicio de Bacteriología de la Clínica Universitaria Privada Reina Fabiola (Universidad Católica de Córdoba). Las cepas clínicas comprendían: 2 cepas de *C. glabrata*, 3 de *C. tropicalis*, 2 de *C. albicans* y 1 cepa de *C. parapsilosis*. Las cepas de referencia pertenecen al National Collection of Pathogenic Fungi (NCPF): una de *C. tropicalis* (NCPF 3111) y una de *C. albicans* (NCPF 3153).

Las soluciones stock de estas cepas se conservaron a -80 °C, suspendidas en Caldo Sabouraud Glucosado (CSG, Britania) con 10 % (v/v) de glicerol como crioprotector. A fin de garantizar la pureza y viabilidad de las levaduras, se realizó un repique de la solución stock en Agar Sabouraud Glucosado (ASG, Britania), el cual se mantuvo por 3 meses mediante repiques cada 15 días. A partir de éstos se realizaron cultivos “overnight” a 37 °C con el mismo medio cultivo para realizar los ensayos, siguiendo las normas del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002).

III.3.2- Ensayo de formación de biofilms

La capacidad de las cepas fúngicas para formar biofilms se evaluó por medio de una microtécnica adaptada en el laboratorio de microbiología (Cátedra de microbiología, FCEyN), a partir del método descrito por O'Toole y Kolter (O'Toole y Kolter, 1998). Los cambios consistieron en la utilización de una microplaca de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania), que se pre-trató con SFB al 50 % (v/v) en CSG de pH 6 durante 30 min a 37 °C (Arce Miranda *et al.*, 2011; Pierce *et al.*, 2008; Peralta *et al.*, 2015; Marioni *et al.*, 2016a). Posteriormente, la placa se lavó dos veces con PBS estéril 10 mM (pH = 7,2). Cada cepa se agregó por triplicado, utilizando 200 µL por pocillo de la suspensión de levaduras en CSG (pH 6,5 ajustado con NaOH 0,1 M), la cual contenía 1×10^7 unidades formadoras de colonia en 1 mL (UFC/mL). Los pocillos controles (n = 3), pre-tratados de igual manera, sólo contuvieron CSG estéril (pH 6,5). La microplaca se incubó durante 90 min a 37 °C para permitir la adherencia de las

células a la superficie. Después de esta primera incubación, se realizó un lavado con PBS para remover las levaduras no adheridas. Luego del agregado de medio fresco (CSG), se continuó la incubación sin agitación a la misma temperatura hasta completar 48 h, obteniéndose un biofilm maduro. Posteriormente, el sobrenadante se descartó y la microplaca se secó a temperatura ambiente durante 24 h. El biofilm se tiñó con una solución de Cristal Violeta 1 % (p/v) (CV) por 3 min. El biofilm adherido se lavó con PBS para remover el colorante; y finalmente, el CV se extrajo con una solución de EtOH/acetona (70:30, Porta/Merck), usando 200 μ L por pocillo. La DO se midió a 595 nm en un lector de microplacas (Tecan Sunrise Model, TECAN, Australia).

Para cada cepa se obtuvo la DO promedio ($n = 3$) que fue comparada con la del control (DO_c). Las cepas se clasificaron según su capacidad para formar biofilms siguiendo los criterios de la Tabla 3.1 (Stepanovic *et al.*, 2007; Arce Miranda *et al.*, 2011; Peralta *et al.*, 2015):

Tabla 3.1: Criterios de clasificación de las cepas formadores de biofilms.

$DO \leq DO_c$	no productora de biofilms
$DO_c < DO \leq (2 \times DO_c)$	leve productora de biofilms
$(2 \times DO_c) < DO \leq (4 \times DO_c)$	moderado productora de biofilms
$(4 \times DO_c) < DO$	fuerte productora de biofilms

La cantidad de biofilms formado se expresó en Unidad de Biomasa de Biofilms (UBB), definida arbitrariamente como 0,1 DO₅₉₅ igual a 1 UBB. (Arce Miranda *et al.*, 2011).

III.3.3- Sistema de irradiación

Como sistema de irradiación se utilizó una lámpara actínica usualmente usada para el tratamiento de la hiperbilirrubinemia humana (www.philips.com/phototherapy). Se trata de una lámpara Phillips TL 20W/52 con un máximo de emisión a 420 nm (380 – 480nm, 0,65 mW/cm²). Esta lámpara se ubicó por encima de las muestras dentro de una caja negra (Comini *et al.*, 2011).

III.3.4- Optimización de las condiciones de irradiación: tiempo y distancia de irradiación

Este estudio se realizó con el fin de establecer el tiempo y la distancia de irradiación que no producen alteraciones en el biofilm. A su vez, se evaluó la utilización de DMSO como co-solvente. Para ello, se ensayó el caldo de cultivo (CSG) con y sin agregado de DMSO al 1 %, sobre el biofilm maduro.

A dos microplacas con biofilm maduro, se les agregó CSG fresco con y sin DMSO 1 % por triplicado. Luego, se irradiaron con el sistema previamente descrito (punto II-3.3), ubicando la lámpara a diferentes distancias para cada placa: 20 y 40 cm, durante diferentes períodos de tiempo: 5, 10, 15 y 20 min. Una tercera microplaca se mantuvo en oscuridad como control de irradiación. Posteriormente, las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h y se cuantificó la formación de biofilm con CV como se describió en el punto II-3.2.

III.3.5- Determinación de la concentración inhibitoria mínima fotoactiva en levaduras planctónicas

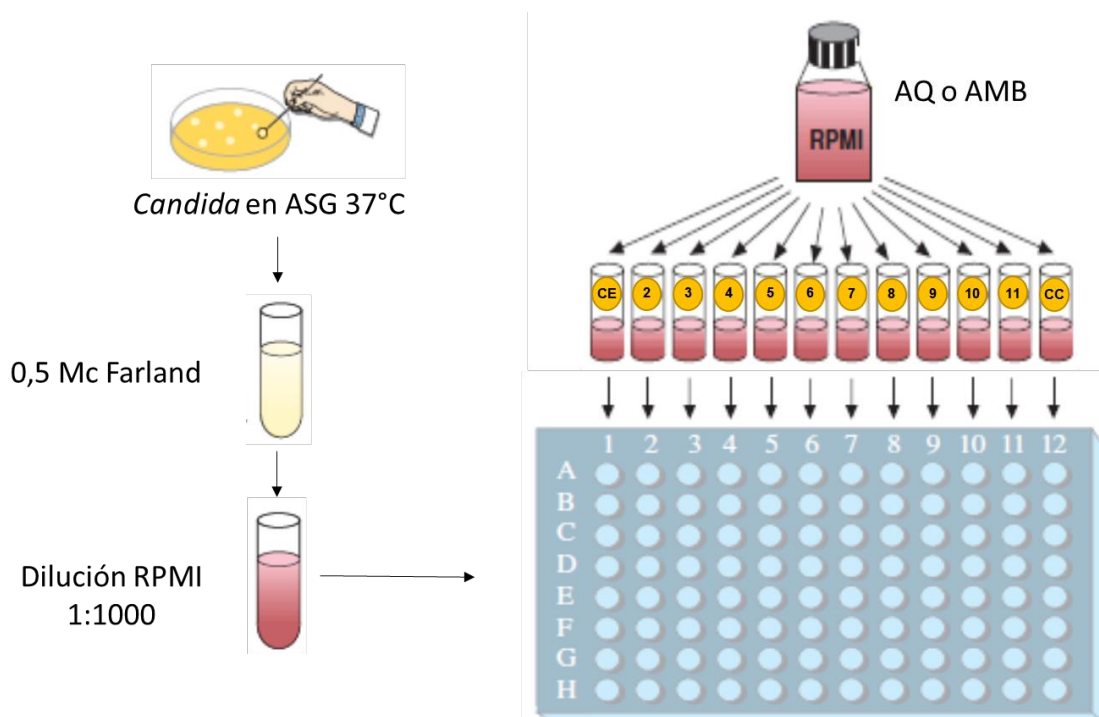
El parámetro inicial para evaluar la susceptibilidad de un microorganismo a un potencial fármaco es la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM). Para levaduras en estado planctónico, la CIM se definió según las normas establecidas por el CLSI en el documento M27-A3 (CLSI, 2008). Para los antifúngicos fungistáticos, la CIM se define como la concentración más baja de fármaco que produce una inhibición ≥ 50 % en el crecimiento de las levaduras, mientras que para los antifúngicos fungicidas la CIM es la menor concentración de antifúngico que inhibe el 100 % del crecimiento (CLSI, 2008).

En este ensayo se determinó la sensibilidad de *C. tropicalis* a rubiadina (**AQ1**) y 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) (Fig. 1.6), utilizando una cepa clínica y otra cepa de referencia (NCPF 3111). Para ello, se aplicó el método descrito por el CLSI (2008) modificando el experimento con el agregado de luz. En esta situación experimental, una microplaca se irradió durante 15 min antes de su incubación; mientras que otra microplaca se mantuvo simultáneamente en oscuridad. De esta manera, se determinó la CIM (en oscuridad) y la CIM fotoactiva (CIMf).

El medio utilizado en el ensayo fue "Roswell Park Memorial Institute 1640" (RPMI) con glutamina y sin bicarbonato de sódico (Sigma, EEUU), tamponado con ácido morfolino propano sulfónico 0,164 M (MOPS, Sigma), con 0,2 % de glucosa y ajustando el pH a 7 (con NaOH 1 N).

El inóculo se preparó tomando de 4 a 5 colonias de un cultivo de 24 h de crecimiento en una placa con ASG (Fig. 3.4), y se suspendieron en un tubo con solución de NaCl al 0,85 %. Se agitó y se ajustó la DO a 0,5 de la escala de Mc Farland con un espectrofotómetro a 530 nm (Modelo Tecan Sunrise, TECAN, AUS). Este valor equivale a $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ UFC/mL. Seguidamente, se realizó una dilución 1:1000 con RPMI, y se agregó (100 μ L x pocillo) en las columnas 2 a 11 de la microplaca de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania) (Fig. 3.4). La concentración final de las levaduras en cada pocillo fue de $0,5 \times 10^3 - 2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Como control de esterilidad se agregó RPMI en la primera columna de la microplaca, y como control positivo se agregó el inóculo de la cepa de *C. tropicalis* ensayada en la columna 12.

Figura 3.4 Esquema del método de microdilución para determinar la CIM en *C. tropicalis*



Cada AQ se disolvió en DMSO y luego se diluyó con RPMI, de manera que la concentración final de DMSO no superó el 1 %. A partir de esta solución madre (1 mg/mL) se prepararon diluciones en el rango de concentraciones de 0,24 a 500 μ g/mL para ambas AQs, siguiendo el método de las diluciones dobles seriadas aditivas. Cada dilución se agregó a la placa de 96 pocillos por columnas (100 μ l x pocillo) de la 2 a la 11 por duplicado (Fig. 3.4) (CLSI, 2008).

Como control antifúngico se utilizó AMB. Se determinó su CIM y CIMf, siguiendo el procedimiento descrito en un rango de concentraciones de 0,03 a

16 µg/mL. Las diluciones se prepararon con la misma metodología usada para las AQs (CLSI, 2008).

Una vez finalizada la incubación (48 h a 37 °C) de las microplacas (oscuridad e irradiación), se realizó la lectura espectrofotométrica de las DO de todos los pocillos a 490 o 530 nm en el mismo lector de microplacas usado anteriormente. A partir de las DO se determinó cuáles eran las concentraciones que producían el 100 % de inhibición respecto al control de crecimiento.

III.3.6- Determinación de la actividad antibiofilm: Fotoinactivación de biofilms fúngicos

La actividad antibiofilm *in vitro* de extractos y AQs obtenidos de *H. pustulata* se evaluó sobre biofilms maduros (48 h incubación), formados como se describió anteriormente (punto II-3.2), y usando específicamente las cepas clasificadas como fuerte productoras de biofilms (O'Toole & Kolter, 1998; Arce Miranda *et al.*, 2011; Peralta *et al.*, 2015; Marioni *et al.*, 2016a, Marioni *et al.*, 2016b).

El ensayo consistió en lavar el biofilm maduro con PBS estéril e inmediatamente se agregan las concentraciones de la muestra (extracto o AQ) por triplicado (200 µl por pocillo). Como control de esterilidad se utilizó CSG (pH 6,5) y como control negativo se utilizó CSG con DMSO 1% (pH 6,5), ambos se ensayaron por triplicado. AMB se utilizó como control positivo bajo las mismas condiciones (n = 3). El estudio se realizó simultáneamente en dos microplacas, una se sometió a condiciones de irradiación durante 15 minutos, y la otra se mantuvo en oscuridad durante el mismo tiempo, luego de agregar las muestras a analizar. Se usó el sistema de irradiación descrito anteriormente (punto II-3.3), ubicándose la lámpara a 20 cm por encima de las muestras. Seguidamente, ambas placas se incubaron durante 48 h a 37 °C. Al finalizar la incubación, se separó el sobrenadante para medir la producción de ERO y ERN, y estudiar la activación de las defensas antioxidantes.

Después de retirar el sobrenadante, se cuantificó la formación de biofilms con CV como se explicó en el punto II-3.2, y se expresó en UBB (0,1 DO_{595nm} = 1 UBB) (Arce Miranda *et al.*, 2011).

Por otra parte, se determinó el porcentaje de reducción del biofilm, usando la siguiente fórmula (Nithyanand *et al.*, 2015):

$$\% R = \frac{DO_{595nm} \text{ Biofilm no tratado} - DO_{595nm} \text{ Muestra} \times 100}{DO_{595nm} \text{ Biofilm no tratado}}$$

A partir de este ensayo se obtuvo la concentración mínima de antimicrobiano que disminuyó el 50 ó 80 % del biofilm, denominada Concentración Inhibitoria Mínima Sésil (CIMS-50 y CIMS-80, respectivamente) (Pierce *et al.*, 2008).

A- Extractos de *H. pustulata*

Para evaluar los extractos de *H. pustulata*, se preparó una solución madre de cada extracto en CSG (1 % DMSO, pH 6,5), y a partir de éstas se realizaron tres diluciones a ensayar de cada extracto: 0,2; 0,1 y 0,05 mg/mL. AMB se usó a la concentración CIM determinada en el punto III-3.5.

B- Antraquinonas aisladas de *H. pustulata*

Según las CIMf determinadas para **AQ1** y **AQ2** sobre la cepa clínica y la cepa de referencia de *C. tropicalis*, se prepararon diluciones de las mismas en CSG (1 % DMSO, pH 6,5), para obtener tres concentraciones finales a ensayar: 0,5 x CIMf (Sub-CIMf), 1 x CIMf y 2 x CIMf (Supra-CIMf). Para AMB se procedió de la misma forma a partir de su CIM. La pureza de las AQs se estableció por HPLC, según la metodología descrita en el punto III-1.4-A.

Además, se realizó un estudio de correlación entre las UBB y las UFC/mL (Arce Miranda *et al.*, 2011; Marioni *et al.*, 2016b). Después del tratamiento antifúngico, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 µL de PBS estéril a cada pocillo y se sometió a ultrasonido (40 kHz, 60 s) con el fin de suspender las células del biofilm. Esta suspensión se diluyó 1000 veces con PBS estéril, y una alícuota (100 µL) se extendió uniformemente en una placa con ASG mediante espátula de Drigalsky estéril. A continuación, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se realizó el recuento de las colonias y se graficó las UFC/mL vs. las UBB obtenidas por CV. La correlación se verificó por una relación lineal con $R^2 > 0,99$.

III.3.7- Estudio del estrés celular en la fotoinactivación de biofilms de *Candida* spp.

El estrés oxidativo se evaluó por el ensayo de azul de nitro tetrazolium (NBT: Nitroblue Tetrazolium) que mide la producción de $O_2^{\bullet-}$, una de las principales ERO ya que a partir de ella se generan otras como H_2O_2 y HO^{\bullet} (Mattila *et al.*, 2015; Paraje *et al.*, 2008).

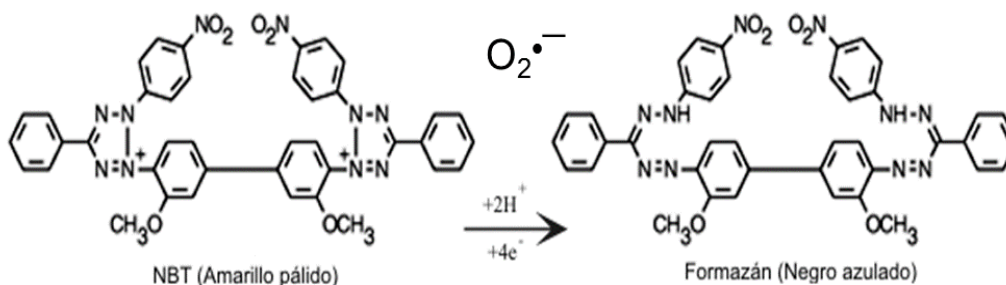
Para evaluar el estrés nitrosativo se utilizó la reacción de Griess, ya que mide una de las ERN estable, el ión nitrito (NO_2^-) (Arce Miranda *et al.*, 2011; Paraje *et al.*, 2009; Tsikas, 2007).

Ambos tipos de estrés celular se estudiaron en las dos condiciones experimentales de irradiación y oscuridad, a fin de poder realizar la comparación correspondiente, usando el sistema ya descrito (punto III-3.3) e irradiando durante 15 min a 20 cm (Marioni *et al.*, 2016a; Marioni *et al.*, 2016b).

A- Determinación de anión superóxido en biofilms: Ensayo de azul de nitro tetrazolium

Mediante un ensayo biológico indirecto que utiliza NBT, se evaluó la generación de $\text{O}_2^{\bullet-}$. En esta técnica, el NBT se reduce a un precipitado insoluble, el azul de diformazán (Fig. 3.5) por la acción oxidante de esta ERO. Así, la formación de azul de diformazán es directamente proporcional al $\text{O}_2^{\bullet-}$ generado y se cuantificó espectrofotométricamente a 540 nm (Arce Miranda *et al.*, 2011; Baronetti *et al.*, 2013; Paraje *et al.*, 2008; Konigheim *et al.*, 2012b, Marioni *et al.*, 2016a; Marioni *et al.*, 2016b).

Figura 3.5 Reacción de reducción de NBT.



Una alícuota (100 μL) del sobrenadante proveniente de cada pocillo del ensayo de actividad antibiofilm, se traspasó a otra microplaca y se incubó con 100 μL de NBT (1 mg/mL) a 37 °C durante 30 min. La reacción se detuvo agregando 20 μL de HCl 0,1 N. La DO de cada pocillo se midió usando el mismo lector de microplaca.

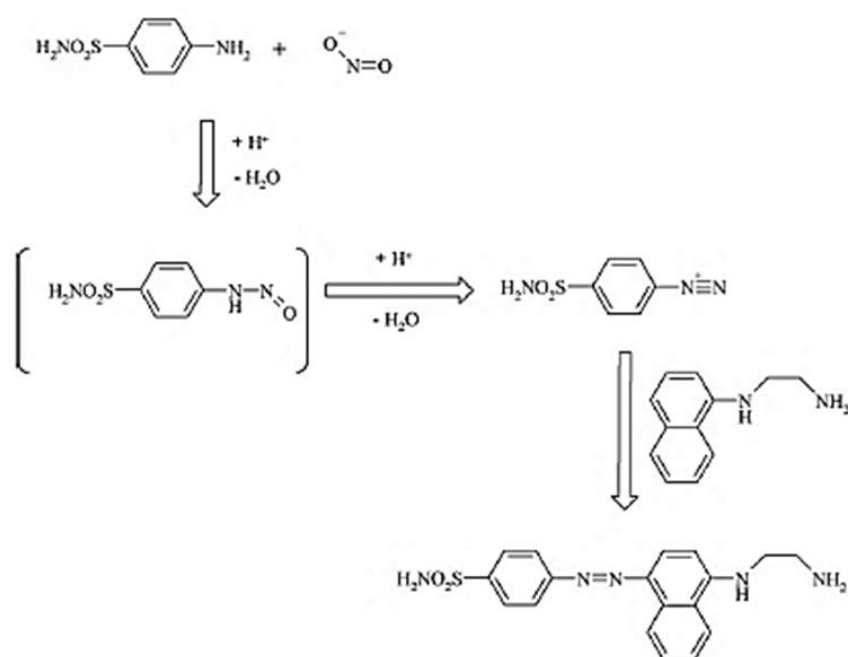
Los resultados se expresaron como $\text{DO}_{540\text{nm}}/\text{UBB}$ ($\text{O}_2^{\bullet-}/\text{UBB}$) con el fin de correlacionar la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ con la formación de biofilms para cada condición ensayada (Arce Miranda *et al.*, 2011; Peralta *et al.*, 2015).

B- Reacción de Griess: Determinación del radical óxido nítrico en biofilms

La producción de NO^\bullet se determinó midiendo la acumulación de sus productos de degradación estables, específicamente NO_2^- , mediante un ensayo en microplaca usando el reactivo de Griess y una curva de calibración de NaNO_2 como estándar (Arce Miranda *et al.*, 2011; Peralta *et al.*, 2015; Paraje *et al.*, 2009; Baronetti *et al.*, 2011).

En condiciones ácidas el NO_2^- reacciona con los grupos aminos de la sulfanilamida para formar el catión diazonio, el cual se acopla a la N-(1-naftil) etilendiamina formándose el correspondiente azo compuesto que se mide espectrofotométricamente a 540 nm (Fig. 3.6). Por lo tanto, en esta reacción, la producción del compuesto azo es proporcional a los NO_2^- formados (Tsikas, 2007).

Figura 3.6 Reacción de Griess (extraída de Tsikas, 2007).



El reactivo Griess se preparó mezclando sulfanilamida (1,5 % en HCl) con un volumen igual de diclorhidrato de N-(1-Naftil) etilendiamina (0,13 % en H₂O) (Tsikas, 2007).

El sobrenadante (100 μL) de cultivo se mezcló con 200 μL de reactivo Griess en otra microplaca que se mantuvo a 25 °C y oscuridad durante 15 min. Al cabo de ese tiempo se midió la DO a 540 nm en el lector de microplacas mencionado anteriormente. La concentración de NO_2^- se determinó por extrapolación de la absorbancia obtenida para cada pocillo en un curva de calibrado de NaNO_2 (DO vs.

concentración de NO_2^-). Los resultados se expresaron como la relación entre la concentración de nitritos (μM) producida por 1 UBB, siendo la unidad usada intermediarios reactivos del nitrógeno por UBB (ERN/UBB) (Arce Miranda *et al.*, 2011; Paraje *et al.*, 2008; Peralta *et al.*, 2015, Marioni *et al.*, 2016a, Marioni *et al.*, 2016b).

La curva de calibrado se realizó a partir de una solución madre de NaNO_2 (500 μM en agua destilada), utilizándose 12 diluciones seriadas 1:2 por duplicado (0,24 a 500 μM), las cuales fueron tratadas con el reactivo de Griess. Se graficó la DO del compuesto azo formado en función de la concentración de NO_2^- . La curva de calibración se considera válida en el rango de concentraciones cuando se obtiene una ecuación de la recta con $R^2 \geq 0,99$.

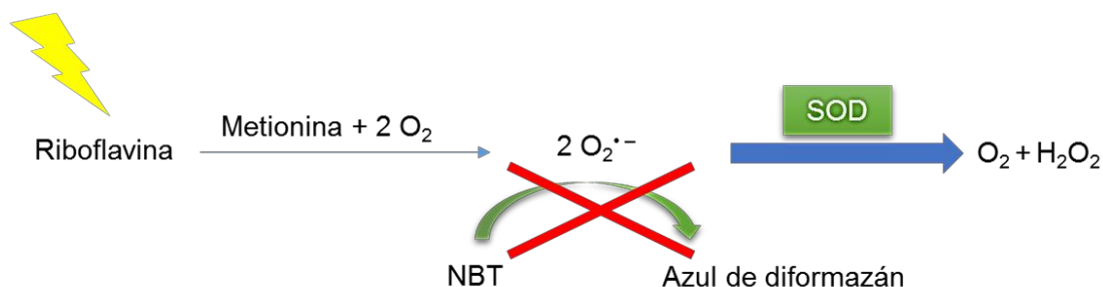
III.3.8- Estudio de la capacidad antioxidante del biofilm

El estudio de la capacidad de defensa antioxidante, se evaluó en irradiación y oscuridad. Para ello, se determinó la activación de la SOD, una de las principales enzimas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo; y la capacidad antioxidante total del biofilm mediante la técnica “Ferrous Reduction Antioxidant Potency” (FRAP).

A- Medición cuantitativa de la actividad de la enzima superóxido dismutasa

Se evaluó la capacidad de la enzima SOD para inhibir la reducción de NBT por acción del $\text{O}_2^{\cdot-}$ generado a través de la fotoexcitación de riboflavina en presencia de oxígeno y metionina como donador de electrones (Fig. 3.7). Se midió la DO del azul de diformazán a 595 nm (Beauchamp & Fridovich, 1971).

Figura 3.7 Reacción para evaluar la actividad de la enzima SOD.



A una alícuota del sobrenadante (50 μL) de cultivo se le adicionaron 30 μL de metionina (Sigma) 47,7 mM, 10 μL de NBT 0,825 mM, 30 μL de EDTA (Cicarelli, Argentina) 0,367 μM y 30 μL de riboflavina (Sigma) 7,33 μM , todos disueltos en PBS.

Luego, la microplaca se expuso bajo una lámpara fluorescente (20 W) durante 90 min para iniciar la fotoactivación de la riboflavina y así desencadenar la reacción. La lectura de la DO se realizó a 595 nm en el lector de microplacas. Los resultados se expresaron como el porcentaje de activación SOD respecto al control (100 %) en relación a las UBB (% activación SOD/UBB) (Arce Miranda *et al.*, 2011; Angel Villegas *et al.*, 2015; Peralta *et al.*, 2015, Marioni *et al.*, 2016a, Marioni *et al.*, 2016b).

B- Determinación de la capacidad antioxidante total del sistema:

FRAP

La capacidad antioxidante total del biofilms, incluido los factores enzimáticos y no enzimáticos, se evaluó por la técnica FRAP. Esta técnica mide el poder reductor del sistema biológico, ya que se basa en la reducción en medio ácido de un complejo de tripiridiltriazina férrica (Fe^{+3} -TPTZ) a la forma ferrosa (Fe^{+2} -TPTZ) por acción de todos los compuestos reductores presentes en el medio.

Debido al intenso color azul de la forma reducida (Fe^{+2} -TPTZ), esta reacción se puede monitorear por espectrofotometría a 593 nm. La producción de la forma ferrosa (aumento de la DO) está directamente relacionado al poder reductor combinado o total de los antioxidantes donantes de electrones presentes en la mezcla de reacción (Benzie & Strain, 1996; Baronetti *et al.*, 2011; Angel Villegas *et al.*, 2013)

A una alícuota (10 μL) del sobrenadante de cultivo se le agregaron 300 μL de la siguiente mezcla (10:1:1): (a) buffer acetato 300 mM de pH 3,6, (b) 2, 4, 6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM en HCl 40 mM y (c) solución de cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 20 mM. La DO se midió a 595 nm en el lector de microplacas después de 4 min de incubación a 37 °C. Los valores de FRAP se calcularon usando una curva de trabajo de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Los resultados se expresaron como una relación entre la concentración de Fe^{+2} generada por las UBB (FRAP/UBB) (Baronetti *et al.*, 2011; Angel Villegas *et al.*, 2013; Marioni *et al.*, 2016a, Marioni *et al.*, 2016b).

A partir de una solución madre de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (750 μM en H_2O) se realizó una curva de calibrado. Se prepararon 7 diluciones seriadas 1:2 por duplicado, las cuales fueron tratadas con la mezcla mencionada. Se graficó la DO del Fe^{+2} -TPTZ formado en función de la concentración de Fe^{+2} (Benzie & Strain, 1996). Se utilizaron curvas de calibrado cuya ecuación de la recta se correspondiera a un $R^2 \geq 0,99$.

III.3.9- Estudio de la estructura de biofilms: Microscopía Confocal de Exploración LÁSER

Los biofilms de *C. tropicalis* tratados con las concentraciones más activas de extractos o AQs se observaron por Microscopía Confocal de Exploración LÁSER (MCEL), con el fin de estudiar su estructura tridimensional.

A- Observación y cuantificación de biofilms

El biofilm se formó sobre discos de vidrio (12 mm de diámetro), ubicados en los pocillos de microplacas de 24 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania) y siguiendo el procedimiento ya descrito (punto III-3.2). Luego de la formación y del tratamiento antifúngico (con y sin fotoactivación) según el punto II-3.6, se descartaron los sobrenadantes y los discos se lavaron con PBS estéril (no autofluorescente). Posteriormente, el biofilm se tiñó con 30 μ L de Calcofluor-White (0,05 % v/v, Sigma-Aldrich, EEUU) durante 1 min a 25 °C. Este colorante fluorescente que se une a carbohidratos (celulosa y quitina), tiñendo la pared celular fúngica de azul cuando es excitado a 355 nm (Peralta *et al.*, 2015). Después de la tinción, los discos se removieron de los pocillos, se secaron a 25 °C y en oscuridad durante 15 min. Finalmente, se montaron en forma invertida sobre un portaobjeto con el agregado de aceite de inmersión para su observación.

Se utilizó un equipo Fluoview FV1000 Espectral Olympus CSLM (Olympus Latin America, EEUU), equipado con objetivo de inmersión UPlanSApo 100x/1.40 oil UIS2 Olympus para visualizar la estructura tridimensional del biofilm (Arce Miranda *et al.*, 2011; Marioni *et al.*, 2016a, Marioni *et al.*, 2016b). El estudio se llevó a cabo adquiriendo secciones ópticas a intervalos de 0,5 μ m en el espesor del biofilm, utilizando objetivos de inmersión de 6x y observando, al menos, 20 campos representativos por muestra.

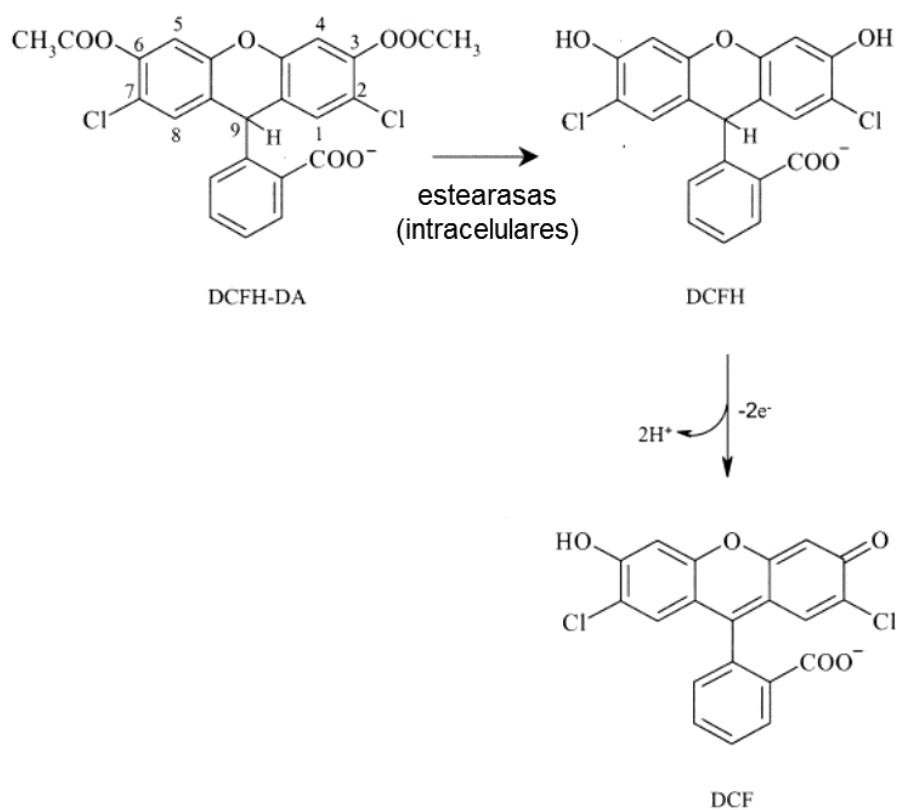
La cuantificación del grosor del biofilm, en las distintas condiciones experimentales, se realizó evaluando el eje XY (vista superior) y XZ (vista del perfil) con el software NIH-ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004) y COMSTAT (Technical University of Denmark, Kongens Lyngby, Dinamarca).

B- Observación y cuantificación de especies reactivas del oxígeno intracelular

Para determinar la generación de ERO intracelular, se utilizó una sonda del compuesto 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA, Molecular Probes, Inc., EEUU). El DCFH-DA es un compuesto no polar, no autofluorescente y capaz de

difundir a través de membranas. Una vez que ha ingresado a las células es hidrolizado por esterasas intracelulares a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH), un derivado polar incapaz de atravesar membranas celulares. DCFH rápidamente es oxidado por las ERO a un producto fluorescente: 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que se visualiza de color verde cuando se excita a 488 nm (Fig. 3.8) (Mattila *et al.*, 2015; Marioni *et al.*, 2016b; Peralta *et al.*, 2016).

Figura 3.8 Reacción de la sonda DCFH-DA (adaptada de Marchesi *et al.*, 1999).



Después de la tinción con Calcofluor-White, los discos se lavaron con PBS y se incubaron con 50 μ L de DCFH-DA 10 μ M, durante 15 min en oscuridad y a 25 $^{\circ}$ C. Luego, se procedió como ya se explicó, los discos se secaron y montaron en portaobjetos para su visualización. Se utilizó el mismo equipo descrito en el punto anterior realizando las mismas secciones ópticas que fueron visualizadas con el mismo aumento.

En el análisis cuantitativo, las intensidades relativas de fluorescencia de Calcofluor-White y DCF obtenidas por medio de NIH-ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004) permitieron determinar los niveles de ERO intracelulares en cada condición.

III.3.10- Efecto de secuestrantes/desactivantes de especies reactivas del oxígeno sobre la fotoinactivación de biofilms

Se estudió como secuestrantes/desactivantes (quenchers) de diferentes ERO pueden influir en la formación de biofilms de *C. tropicalis* cuando éstos fueron tratados con cada AQ bajo irradiación; esto a su vez, se comparó con la condición en oscuridad. Específicamente se evaluaron dos situaciones, en presencia de: **1)** sal disódica del ácido 4,5-dihidroxi-1,3-benzenodisulfónico mono hidrato (Tiron, Sigma) que es un secuestrante de $O_2^{\bullet-}$ (ERO generada por el mecanismo fotosensibilizante Tipo I); y **2)** azida sódica (NaN_3 , Sigma) que es un desactivante de 1O_2 ERO generada por el mecanismo fotosensibilizante Tipo II).

Las soluciones de secuestrante y desactivante se prepararon en agua destilada estéril y luego, se agregaron al medio de cultivo (CSG), de tal forma que la concentración final de los mismos fue 500 mM. Con esta concentración, se aseguró que estuvieran en exceso para así poder desactivar todo el $O_2^{\bullet-}$ y 1O_2 generado por las AQs (Paz-Cristóbal *et al.*, 2013; López- Chicón *et al.*, 2012).

A partir de biofilms maduros de *C. tropicalis* (48 h incubación), se retiraron los sobrenadantes de cultivo y cada pocillo se lavó 2 veces con 200 μ L de PBS estéril (pH = 7,2). Se agregó medio fresco que contenía las concentraciones correspondientes de secuestrante/quencher. Inmediatamente después, se adicionaron las concentraciones de cada AQ por triplicado. El ensayo se realizó en oscuridad e irradiación simultáneamente, exponiendo una de las microplacas al sistema de irradiación anteriormente mencionado durante 15 min. Una vez finalizada las 48 h de incubación a 37 °C, se cuantificó la formación de biofilms con CV. Antes de esta tinción, los sobrenadantes se utilizaron para analizar el desbalance redox; en especial producción de ERO y activación de SOD (puntos III-3.7-A y III-3.8-A, respectivamente).

III.3.11- Estudio de incorporación de antraquinonas en biofilms de *Candida* por HPLC-UV-Vis

La incorporación de AQs se estudió sobre un biofilm maduro de *C. tropicalis* NCPF 3111, formado en microplacas de 24 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania) como se describió previamente (punto III-3.2). Cada AQ se ensayó a una concentración en exceso para que el proceso de incorporación a la biomasa del biofilm no estuviera limitado por la falta de compuesto en el medio; y su vez, garantizar que la cantidad de cada AQ incorporada al biofilm pudiera ser detectada por el método de HPLC. **AQ1** se testeó a 10 μ g/mL (0,039 mM) y **AQ2** a 30 μ g/mL (0,112 mM). El

biofilm se expuso a estas concentraciones de AQ durante distintos tiempos de incubación: 0 - 0,5 - 1 - 3 y 6 h, cada tiempo por duplicado y a una temperatura de 37 °C. Controles de cada tiempo de incubación (biofilm no tratado, conteniendo sólo CSD con < 1 % DMSO) se procesaron por duplicado bajo las mismas condiciones experimentales.

Al finalizar cada tiempo de incubación, se descartó el sobrenadante de cultivo de cada pocillo (tratados y controles), y se agregó 0,5 mL de H₂O destilada (H₂O-D). Para desprender las células del biofilm, la placa se sometió a ultrasonido durante 1 min a 40 KHz, tres veces en intervalos de 1 min (Ultrasonic Cleaner, Testlab, Argentina). Luego de un “escrapeo”, la suspensión celular de cada pocillo se recogió por separado. Este procedimiento se repitió tres veces, y las alícuotas se juntaron para extraer el contenido intracelular (CIC) de AQ. La suspensión celular se centrifugó a 5000 rpm durante 25 min (Centrífuga EPF-12R, Presvac, Argentina). Cada pellet así obtenido se suspendió en CHCl₃ (1 mL), y se expuso alternadamente a frío y calor, utilizando aire líquido y un baño a 70 °C (Baño termostatzado MassonD, Vicking, Argentina). Se centrifugó nuevamente y el sobrenadante generado en este procedimiento se separó como CIC. Este proceso se repitió 3 veces con igual volumen de CHCl₃ para desestructurar la bicapa fosfolipídica de la membrana celular de las levaduras, y extraer la AQ del biofilm (disuelta en el CHCl₃). Por lo tanto, el pellet se descartó y los sobrenadantes de estas tres repeticiones se juntaron como CIC. Posteriormente las muestras de CIC se concentraron a sequedad en el evaporador rotatorio previamente usado. Finalmente, se retomaron con 1 mL de MeOH-HPLC para su posterior análisis (Comini *et al.*, 2011). Una vez finalizado el escrapeo, la microplaca se tiñó con CV para verificar que todo el biofilm se removió.

Para el análisis de la muestra por HPLC, se utilizó la metodología previamente descrita en el punto II-1.4.-a para la identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en extractos. Brevemente, la identificación de las AQs de cada fracción intracelular se hizo por comparación con los t_R de las AQs estándar. La cuantificación se realizó por el método de calibración externa (Núñez Montoya *et al.*, 2008). La concentración de cada AQ en la fracción intracelular se determinó usando la curva de calibración de cada AQ, construidas con 5 concentraciones diferentes: en el rango de 25 - 390 µM para **AQ1**, y 4,1 - 3731 µM para **AQ2**. Las ecuaciones de las curvas de calibración fueron $y = 59334 x + 71$ para **AQ1** y para **AQ2** $y = 42706 x + 92,79$, donde “y” es el área debajo de la curva y “x” la concentración en µM (n = 3, R² > 0,99).

III.3.12- Efecto de la variación en la frecuencia de irradiación sobre la actividad antibiofilm de antraquinonas: Tratamiento de irradiación

A partir del estudio de incorporación de AQs en biofilms de *Candida* por HPLC, se determinaron los tiempos de incubación en donde se logra la máxima acumulación de **AQ1** y **AQ2** en el biofilm. Este parámetro permitió plantear una nueva estrategia con el fin de mejorar el proceso de fotoinactivación del biofilm, la cual consistió en incrementar la frecuencia de irradiación del biofilm tratado con las AQs.

Para ello, se procedió de la misma forma que en el ensayo de determinación de la actividad antibiofilm *in vitro* de AQs (ver punto III-3.6-B), donde se utilizaron tres concentraciones: Sub-CIMf, CIMf y Supra-CIMf de cada AQ. AMB se usó como control positivo y los respectivos controles negativos fueron los mismos a los previamente usados (punto II-3.6).

Este ensayo se realizó en dos microplacas en simultáneo, una placa no se expuso a la luz y otra se irradió a diferentes períodos de incubación. Específicamente, se irradió durante 15 min inmediatamente después del agregado de las muestras ($t = 0$ h), y posteriormente a las 3, 6, 24, 27 y 30 h de este agregado, manteniendo el intervalo de irradiación. Entre cada período de irradiación las placas se incubaron en estufa a 37 °C, completando las 48 h de incubación. Luego, los sobrenadantes de ambas microplacas (irradiadas y en oscuridad) se separaron para los ensayos de estrés celular (punto III-3.7) y el estudio de la capacidad antioxidante del biofilm (punto III-3.8). Las microplacas se dejaron secar para determinar las UBB (ensayo puntos III-3.2 y III-3.6-B).

III.3.13- Ensayo de combinación con irradiación

Se testearon las combinaciones AQ-AMB y **AQ1-AQ2** mediante curvas de muerte. Para ello, se utilizaron las concentraciones previamente testeadas: Sub-CIMf, CIMf y Supra-CIMf. AMB fue añadida en una placa de 96 pocillos por columnas, mientras que las AQs fueron agregadas por filas sobre biofilms de 48 h de incubación (Dastgheyb *et al.*, 2013).

Las combinaciones también se desarrollaron simultáneamente en condiciones de oscuridad e irradiación durante 15 min con el sistema descrito anteriormente. A su vez, la irradiación se realizó de dos formas diferentes:

- a) irradiando sólo a $t = 0$ h (después del agregado de las combinaciones), seguido por una incubación de 48 h.

b) irradiando a distintos tiempos de incubación, t = 0, 3, 6, 24, 27 y 30 h, hasta completar las 48 h de incubación; lo cual implicó un incremento en la frecuencia de irradiación

Luego de la incubación a 37 °C, los sobrenadantes se separaron para determinar los metabolitos del estrés y la activación del sistema antioxidante, siguiendo las técnicas descriptas previamente (punto III-3.7 y III-3.8, respectivamente). El efecto de las combinaciones se cuantificó mediante la tinción con CV, que se expresó como UBB (punto III-3.2 y III-3.6-b).

Los resultados se graficaron como curvas de dosis- respuesta (UBB en función de la concentración). Los resultados obtenidos en este ensayo se utilizaron para estimar el Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (FICI), el cual se define con la siguiente fórmula:

$$FICI = \frac{CIMS-50 (AB)}{CIMS-50 (A)} + \frac{CIMS-50 (AB)}{CIMS-50 (B)}$$

La CIMS-50 (AB) corresponde a la concentración de **AQ1** o **AQ2** combinada con AMB que redujo un 50 % la formación del biofilms. La CIMS-50 (A) representa la concentración de **AQ1** o **AQ2** solo y la CIMS-50 (B) es la concentración de AMB, las cuales redujeron al 50 % el biofilm. De acuerdo al valor de FICI obtenido, se puede interpretar de la siguiente manera (Tabla 3.2) (Dastgheyb *et al.*, 2013):

Tabla 3.2 Interpretación de valores de FICI

FICI	INTERACCIÓN
≤ 0.5	Sinergismo
> 0,5 a < 1	Sinergismo parcial
1	Adición
> 1 a < 4	Indiferencia
≥ 4	Antagonismo

III.4- METODOLOGÍAS USADAS EN EL ESTUDIO FOTOQUÍMICO Y FOTOFÍSICO

Estos ensayos se realizaron en el laboratorio del Prof. Dr. Santiago Nonell Marrugat, Instituto de Química Sarriá de la Universidad Ramon Llull, Barcelona, España.

III.4.1- Preparación de las muestras

Ambas AQs se utilizaron a la misma concentración (56 μ M), disueltas en distintos medios según el experimento a realizar. Se usaron los siguientes disolventes CHCl_3 , PBS, PBS deuterado (PBS-d) y CSG.

Para cada AQ se preparó una solución madre (1 mg/mL) en el solvente a utilizar. Y a partir de ésta, se realizaron las diluciones necesarias para obtener la concentración final (56 μ M). Cuando el disolvente fue PBS, PBS-d o CSG, en la solución madre se usó DMSO como co-solvente sin superar el 1 % (pH 6,5). Todas las soluciones se prepararon y manipularon bajo condiciones de oscuridad, siendo almacenadas a 4 °C.

La pureza de las AQs se determinó por HPLC, según la metodología descrita en los puntos III-1.4.

III.4.2- Preparación de células planctónicas y biofilms de *Candida*

Para realizar las mediciones espectroscópicas de las AQs en células planctónicas de *Candida*, se utilizaron suspensiones obtenidas del cultivo “overnight” de *C. tropicalis* NCPF 3111. Las levaduras se cultivaron a 37 °C en CSG hasta una DO de 0,6 (~10⁶ UFC/mL). Se retiró el medio de cultivo y las levaduras se lavaron con PBS estéril (pH = 7,4) tres veces, realizando centrifugado a 1398 g durante 5 min entre cada lavado. Seguidamente, las levaduras se suspendieron en PBS llevando a una DO de 0,3 (~10³ UFC/mL) (López Chicón *et al.*, 2012). A partir de la solución madre de cada AQ en PBS, se tomó una alícuota que se agregó a las suspensiones de células planctónicas para obtener la concentración final (56 μ M). Inmediatamente se trasvasó a la cuba de cuarzo (Hellmut, Alemania) antes de las mediciones espectroscópicas.

Para las mediciones sobre biofilms, los mismos se formaron siguiendo la metodología descrita en el punto III-3.9-A **observación y cuantificación de biofilms por MCEL**, modificando el soporte del biofilm, que en este caso fue un cuadrado de plástico (1 x 1 cm). Una vez obtenidos los biofilms maduros de la cepa de

C. tropicalis NCPF 3111 ($47,9 \pm 2,6$ UBB), el sobrenadante se descartó, los biofilms se lavaron con PBS y se agregó la solución de cada AQ en PBS. Después de 15 min, cada soporte se introdujo verticalmente dentro de la cubeta espectroscópica a 45° en con respecto a los haces de luz de excitación, y la cubeta se llenó cuidadosamente con el sobrenadante correspondiente. Las medidas se realizaron inmediatamente.

Para realizar las mediciones en PBS-d, los biofilms maduros se lavaron con PBS-d 2 veces (2 mL). Luego, se incubaron con un tercer volumen durante 2 h, antes de agregar las AQs (en PBS-d). Luego de 15 min, el soporte se colocó dentro de la cubeta con el sobrenadante para realizar la medición. Se realizaron controles conteniendo células sésiles de *C. tropicalis* NCPF 3111 en PBS-d.

En todos los casos, las mediadas espectroscópicas se llevaron a cabo sin agitación para prevenir la ruptura mecánica de los biofilms.

III.4.3- Espectros de absorción y de fluorescencia de las antraquinonas

Los espectros de absorción del estado fundamental de cada AQs en CHCl_3 , PBS y en presencia de células planctónicas y sésiles de *Candida* (disueltas en PBS), se registraron entre 300 a 800 nm, mediante un espectrofotómetro Varian Cary 6000i (Varian Inc., Palo Alto, CA).

Los espectros de emisión de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro Spex Fluoromax 4 (Horiba Jobin-Yvon, EEUU). Los decaimientos de fluorescencia en tiempo resuelto se midieron con un sistema de conteo de fotones únicos correlacionado con el tiempo (Fluotime 200, PicoQuant GmbH, Alemania), equipado con un fotomultiplicador sensible al rojo. La fluorescencia se obtuvo excitando las AQs a 375 nm en soluciones de CHCl_3 y PBS por medio de un láser de diodo pulsado, trabajando a una tasa de repetición de 10 MHz y observando la emisión a 420 nm (manteniendo la frecuencia de conteo por debajo del 1 %). Los decaimientos de fluorescencia se analizaron utilizando el software PicoQuant FluoFit 4.5 (PicoQuant, Alemania) (Jimenez-Banzo *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta la fluorescencia que presenta *Candida* spp. por sí misma (Graham, 1983), este parámetro no se midió para las AQs en presencia de células planctónicas y sésiles de *C. tropicalis*.

III.4.4- Absorción de los estados transitorios de las antraquinonas

El estudio de la absorción de las especies transitorias de las AQs: el estado triplete excitado ($^3\text{AQ}^*$) y el radical anión ($\text{AQ}^{\bullet-}$), se realizó en CHCl_3 , PBS y sobre levaduras planctónicas y biofilms de *C. tropicalis*, con un equipo de flash fotólisis

provisto de un láser de nanosegundos descrito en Schmidt *et al.*, 1994 y Martí *et al.*, 1996. La λ de excitación de las AQs fue 355 nm y la absorción de los transitorios se midió a las longitudes de onda apropiadas para detectar el $^3\text{AQ}^*$ (675 nm) y el $\text{AQ}^{\bullet-}$ (550 nm) de ambas AQs (Shida, 1988). Las soluciones de AQs en CHCl_3 y PBS se analizaron en un medio saturado con aire y con argón, ya que cuando el oxígeno se encuentra en el sistema las señales de los intermediarios desaparecen por completo porque son desactivados al reaccionar con el $^3\text{O}_2$. Para ello, las soluciones de AQs (en CHCl_3 o PBS) se desgasificaron mediante una corriente de argón, e inmediatamente se midieron para detectar los transitorios de las AQs (López Chicón *et al.*, 2012).

III.4.5- Determinación de oxígeno singlete

A- Medición con sonda fluorescente Singlet Oxygen Sensor Green

La instrucción sobre el uso de esta sonda se realizó en el laboratorio de la Prof. Dra. Adriana Casas, Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias, CONICET, Hospital Clínicas José de San Martín perteneciente a la Universidad de Buenos Aires.

Para determinar la generación de $^1\text{O}_2$ por los extractos obtenidos de partes aéreas de *H. pustulata* y de las AQs aisladas del extracto bioactivo, se utilizó la concentración que resultó más activa en el biofilm de *C. tropicalis*. Para ellos, se realizó una dilución en PBS a partir de una solución madre de cada uno de los extractos y AQs (1 mg/mL) en PBS con DMSO al 1 % como co-solvente. La sonda fluorescente Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) se preparó a una concentración de 0,5 mM en PBS, resguardándola de la luz.

Esta sonda reacciona en presencia de $^1\text{O}_2$ formando un producto fluorescente, el cual puede ser detectado a 525 nm (Mattila *et al.*, 2015). La fluorescencia se determinó utilizando un fluorómetro Perkin Elmer LS55 (Perkin, España).

El ensayo se realizó en dos placas de 24 pocillos en simultáneo, una con irradiación y otra en oscuridad. Cada extracto (500 μL) se añadió por duplicado e inmediatamente, se agregó 50 μL de la solución de SOSG (Mamone *et al.*, 2014). Para las AQs se utilizó 2 mL de la solución a testear por triplicado con el mismo volumen de sonda (50 μL).

Una de las placas se irradió durante 15 min, utilizando el sistema de irradiación descrito previamente (punto II-3.3), y ubicado 20 cm por arriba de las muestras. Los valores de fluorescencia se cuantificaron a λ_{em} 525 nm en una cuba de 500 μL . Además, se realizaron controles de SOSG en ausencia de extracto/AQ, de PBS y muestra sin sonda bajo irradiación y en oscuridad, cada uno por duplicado. Como

control positivo se utilizó una solución de perinaftenona (PN) 0,5 mM en PBS (1 % DMSO).

B- Cinética de fosforescencia de oxígeno singlete

La luminiscencia en el IR cercano del $^1\text{O}_2$ resuelta en el tiempo, se puede monitorizar mediante su fosforescencia a 1275 nm (López-Chicón *et al.*, 2012; Ragàs *et al.*, 2010). De esta manera, el $^1\text{O}_2$ formado por las AQs en presencia de biofilms de *C. tropicalis* puede ser detectado.

La fosforescencia de $^1\text{O}_2$ fue detectada mediante un sistema customizado, el Fluotime 200 (PicoQuant GmbH, Berlin, Alemania). Para la excitación de la muestra se utilizó un láser pulsado Nd: Yag de bombardeo de diodos (FTSS355-Q, Crystal Laser, Alemania), trabajando con una tasa de repeticiones de 10 kHz y a 355 nm (6 mW, 0.6 μJ por pulso). Se colocó un filtro de corte de 1064 nm y un filtro Schott KG5 (Edmund Optics, Reino Unido) en el puerto de salida del láser para eliminar cualquier componente residual de su emisión fundamental en la región del IR cercano. La luminiscencia emitida por la muestra se filtró mediante un espejo frío (IVC Melles Griot, EEUU) y un filtro de interferencia a 1273 ± 86 nm (Interferenzop-tik Elektronik GmbH, Alemania), y se focalizó en un tubo fotomultiplicador sensible al IR cercano (H9170-45, Hamamatsu Fotónica, Japón). El conteo de fotones se realizó con un multicanal NanoHarp Escalador 250 (PicoQuant, Alemania). Las señales de emisión resueltas en el tiempo fueron analizadas usando el programa de análisis de datos FluoFit 4.5 con la finalidad de extraer los valores de vida media de las especies. Los rendimientos cuánticos de producción de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ) se determinaron por comparación de las intensidades de las señales con un compuesto de referencia. Se utilizó perinaftenona la cual tiene $\Phi_\Delta = 0,95-1$ (Jimenez -Banzo *et al.*, 2008). Sólo en medios biológicos (en presencia de células planctónicas y sésiles), los Φ_Δ fueron aparentes.

La generación de $^1\text{O}_2$ de biofilms tratados con cada AQ (56 μM), se determinó agregando 2 mL de la solución de cada AQ (preparada como se indicó en el punto II-4.1) sobre un biofilm de *C. tropicalis* NCPF 3111, formado según lo indicado en el punto II-3.9-a. Luego, se irradió la muestra con un láser pulsado a 355 nm y se recogió la señal emitida de luminiscencia a 1275 nm, correspondiente al $^1\text{O}_2$.

Para asignar esta señal de forma inequívoca al $^1\text{O}_2$, se midió la fosforescencia de esta ERO en dos situaciones diferentes: (a) A una longitud de onda donde se conoce que el $^1\text{O}_2$ no emite fosforescencia, esto es a 1325 nm, (b) Sobre biofilms en PBS-d, ya que la vida media del $^1\text{O}_2$ aumenta en agua deuterada. En este caso, se

Materiales y Métodos

agregó la AQ en PBS-d y se midió la señal de $^1\text{O}_2$ a tiempo 0 h. (Orgilby & Foote, 1982).

III.5- METODO ESTADÍSTICO

Los ensayos se realizaron por triplicado y en tres ensayos independientes. Los resultados se expresaron como los promedios con sus desviaciones estándar. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo obtenido por la prueba de t - Student- Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en función de los objetivos específicos propuestos, incluyendo la discusión de los mismos.

En una primera instancia se establecieron las condiciones experimentales necesarias para dar respuesta a estos objetivos.

IV.1- SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES SOBRE BIOFILMS

IV.1.1- Clasificación de cepas de *Candida spp.* formadoras de biofilms

En la Tabla 4.1 se muestra la capacidad de formar biofilm de cepas de diferente origen de *Candida spp.* en CSG a pH 6,5, siguiendo la metodología detallada en la sección **III-3.2 Formación de biofilms** (Materiales y métodos). En base a estudios microbiológicos, se considera que una cepa es capaz de formar biofilm cuando su DO es mayor a la DO de los pocillos control (DOc) (Stepanovic *et al.*, 2007). En función del valor de DO obtenido, las cepas fueron clasificadas según la Tabla 4.1 de Materiales y métodos.

Tabla 4.1 Formación de biofilms de cepas de diferente origen de *Candida spp.*

Origen	Cepa	DO _{595nm}	Formación de biofilm
Clínico	<i>C. albicans</i> CRF1	0,7 ± 0,1	Fuerte
	<i>C. albicans</i> CRF2	0,110 ± 0,002	No productora
	<i>C. glabrata</i> CRF3	0,11 ± 0,01	No productora
	<i>C. glabrata</i> CRF4	0,21 ± 0,01	Leve
	<i>C. parapsilosis</i> CRF5	0,9 ± 0,2	Fuerte
	<i>C. tropicalis</i> CRF6	3,500 ± 0,001	Fuerte
	<i>C. tropicalis</i> CRF7	0,158 ± 0,001	Leve
	<i>C. tropicalis</i> CRF8	0,66 ± 0,05	Fuerte
Referencia	<i>C. albicans</i> NCPF 3153	1,40 ± 0,02	Fuerte
	<i>C. tropicalis</i> NCPF 3111	3,4 ± 0,1	Fuerte
	Control	0,16 ± 0,03	

Seis cepas de *Candida* resultaron fuertemente formadoras de biofilms: *C. albicans* CRF1, *C. parapsilosis* CRF5, *C. tropicalis* CRF6 y CRF8,

C. albicans NCPF 3153 y *C. tropicalis* NCPF 3111 independientemente de su origen (clínico o de referencia). Teniendo en cuenta que esta clasificación se basa en un intervalo de valores de DO respecto al control ($DO > 4 \times DO_c$), se observan diferencias en cuanto a la DO entre las mismas cepas clasificadas como “fuertes productoras”. *C. tropicalis* CRF6 se destacó, ya que presenta aproximadamente 22 veces más DO que el control.

En función de estos resultados, se seleccionaron dos cepas de *C. tropicalis* de distinto origen: una clínica (CRF6) y otra de referencia (NCPF 3111) para llevar a cabo el estudio de actividad antibiofilm. Esta especie de *C. no albicans* presenta particular interés de estudio dada su creciente importancia clínica en los últimos años como uno de los principales patógeno oportunista causante de IFI (Nucci *et al.*, 2010; Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012). En Argentina, se ha detectado un aumento en la incidencia de esta *C. no albicans* como responsable de IIH (Cornistein *et al.*, 2013; Falagas *et al.*, 2010; Luque *et al.*, 2009).

IV.1.2- Efecto de tiempo y distancia de irradiación sobre biofilms

Para estudiar la inactivación del biofilms de *C. tropicalis* por acción de la luz, fue necesario evaluar algunas variables que pueden afectar el crecimiento del biofilm durante la irradiación, tales como distancia de la lámpara a las muestras (20 y 40 cm) y tiempo de exposición (5, 10, 15 y 20 min). Además, se evaluó el efecto de DMSO al 1 % en CSG sobre biofilm, con el objetivo de determinar si podría ser utilizado como co-solvente de las muestras a analizar.

Cuando la lámpara se ubicó a 20 cm por encima de la microplaca (Fig. 4.1 A), se observó que a los diferentes tiempos de exposición a la irradiación, excepto para 20 min, la biomasa del biofilm fue constante (aproximadamente 20 UBB) y similar al biofilm control (sin irradiación, $t = 0$, $p > 0,05$). Mientras que ubicada a 40 cm (Fig. 4.1 B), la biomasa del biofilm no fue constante. Es probable que esta variación esté relacionada a algún factor experimental que no fue controlado; por lo cual para no incurrir nuevamente en este error se decidió trabajar a 20 cm.

Además, se observó que el DMSO a la concentración ensayada no tuvo efecto sobre el biofilm ($p > 0,05$).

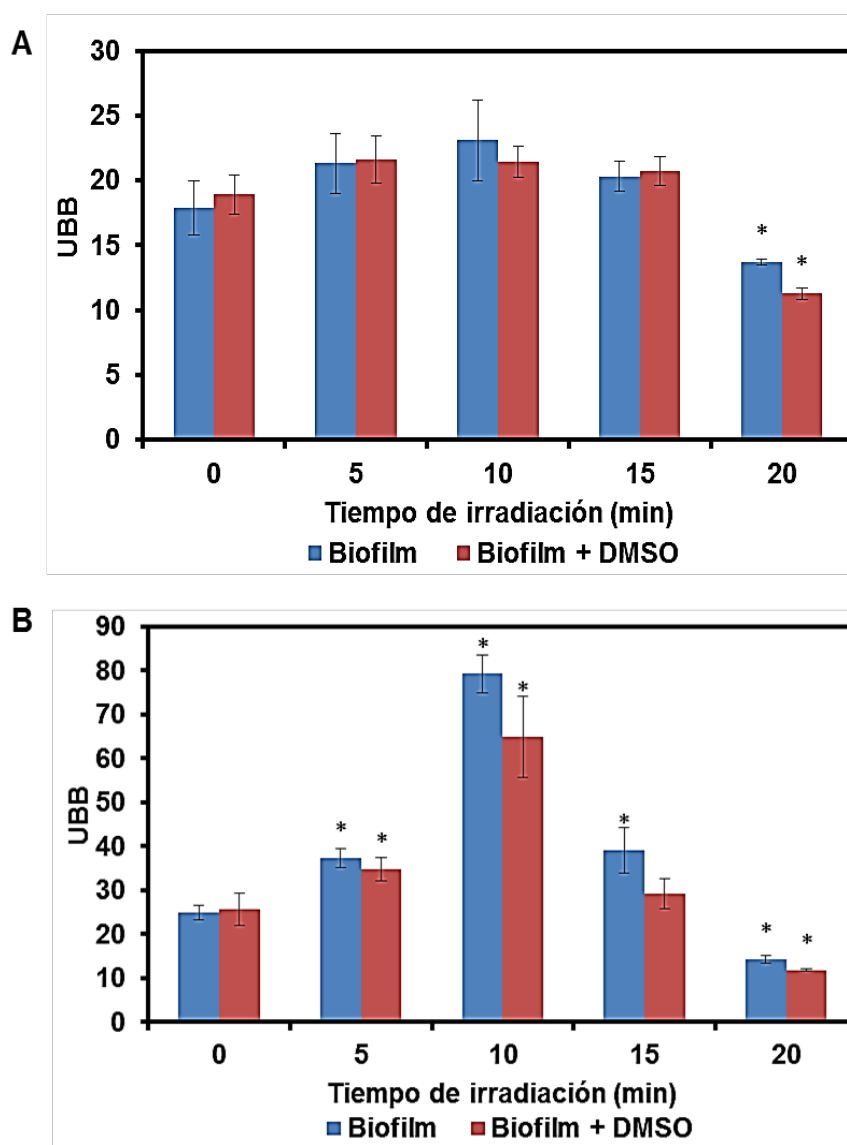
Si bien se ha demostrado que la luz azul (410 nm) es capaz de inactivar células plantónicas de *C. albicans*. (Zhang *et al.*, 2016), la Fig. 4.1 muestra que la biomasa del biofilm expuesta a la luz y sin FS no fue diferente del biofilm que no fue expuesto a la luz y se mantiene constante hasta los 15 min cuando la lámpara se ubicó a 20 cm por encima de la microplaca.

Resultados y Discusión

Un requisito fundamental en TFDa es que la fuente de luz debe dispensar la energía necesaria en el menor tiempo posible manteniendo la selectividad por el FS, dada por su espectro de absorción, y generando un daño nulo o mínimo en el tejido sano.

Por lo tanto, estas fueron las condiciones óptimas de irradiación que no afectan el crecimiento del biofilm: una lámpara actínica, habitualmente utilizada en terapéutica para tratar la hiperbilirrubinemia, con una potencia de $0,6 \text{ J/cm}^2$, ubicada a 20 cm por encima de la microplaca y con un período de irradiación de 15 min como máximo.

Figura 4.1 Efecto de la irradiación con lámpara actínica ubicada a 20 cm (A) y 40 cm (B) por encima de la microplaca con biofilms maduros de *Candida* durante diferentes períodos de tiempo.



* $p < 0,05$ cuando se comparó cada tiempo de irradiación respecto a oscuridad (0 min).

IV.2- FOTOINACTIVACIÓN DE BIOFILMS DE *C. tropicalis* POR EXTRACTOS DE *H. pustulata* Y ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO

Se ensayaron los extractos obtenidos a partir de partes aéreas de *H. pustulata* con los siguientes rendimientos en estado desecado: Hex $1,2976 \pm 0,0002$ g, Ben $0,7907 \pm 0,0002$ g, AcOEt $1,0051 \pm 0,0002$ g y EtOH, $8,0638 \pm 0,0002$ g. Como el propósito fue identificar el extracto con mayor fotoactividad se evaluó el efecto sobre una sola cepa, eligiéndose la cepa clínica clasificada como fuerte productora de biofilm (*C. tropicalis* CRF6). Posteriormente en función de la composición química de los extractos determinada por HPLC, se propuso aislar y purificar los metabolitos secundarios predominantes para su posterior evaluación como fotosensibilizadores con efecto antibiofilm *in vitro*.

Asimismo, se evaluó el estrés oxidativo y nitrosativo que se podría generar cuando el biofilm es tratado con estos extractos, como consecuencia de un desbalance entre las ERO y ERN producidas, la activación de la enzima SOD y la capacidad antioxidante total del biofilm (enzimático y no enzimático).

IV.2.1- Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *H. pustulata* sobre biofilms de una cepa clínica de *C. tropicalis*

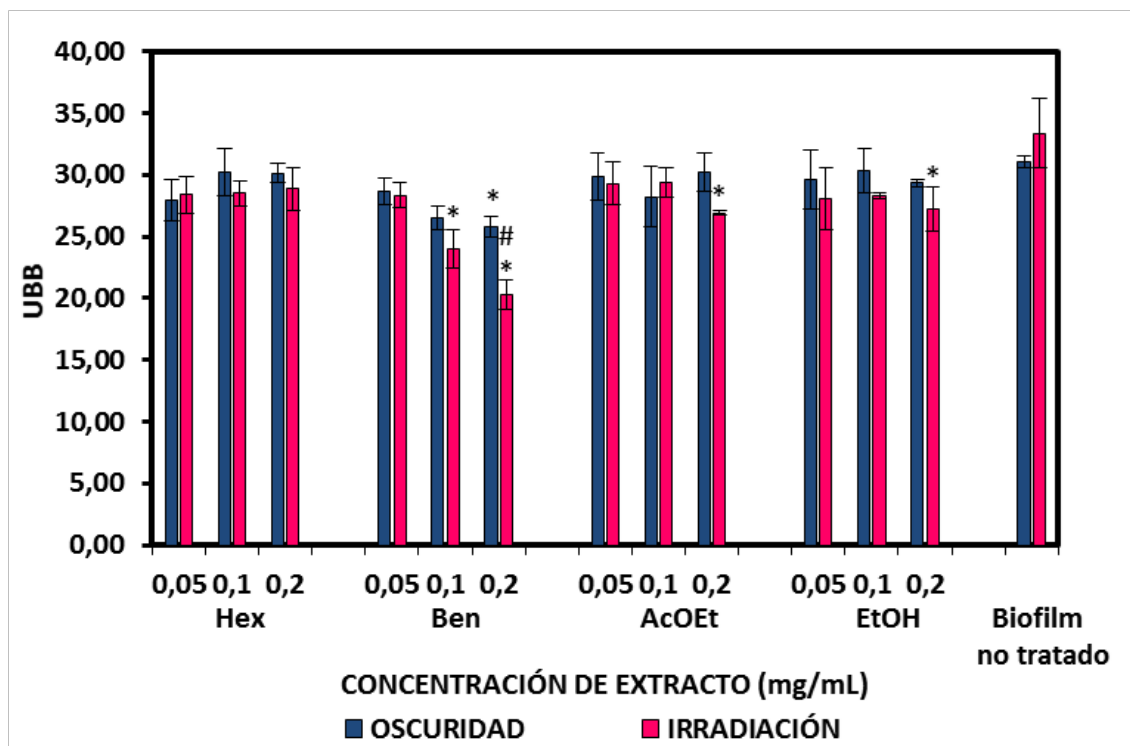
La actividad antibiofilm *in vitro* de los extractos fue evaluada mediante dos técnicas. Una técnica espectrofotométrica que utiliza CV como marcador de la reducción de la biomasa del biofilm y la técnica de MCEL que permite estudiar la estructura tridimensional del biofilm.

A- Cuantificación espectrofotométrica del biofilm con Cristal Violeta

El extracto Ben fue el único bioactivo bajo las dos condiciones experimentales (oscuridad e irradiación), exhibiendo un mayor efecto reductor sobre el crecimiento del biofilm bajo la acción de la luz (Fig. 4.2).

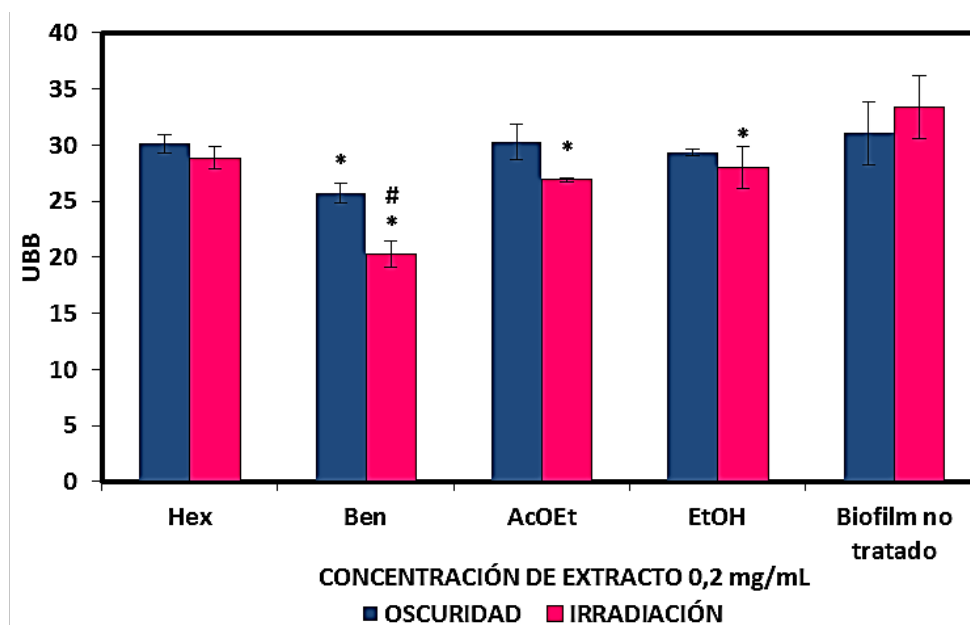
En oscuridad, el extracto Ben redujo levemente el biofilm (Fig. 4.3) a la mayor concentración probada (0,2 mg/mL). Bajo irradiación, la disminución en las UBB ($20,26 \pm 1,18$) fue 1,65 veces respecto al biofilm no tratado ($33,4 \pm 2,8$) (* $p < 0,05$), alcanzando un porcentaje de reducción (%R) de $39,3 \pm 3,5$ con luz comparado con el $17,1 \pm 2,8$ %R en oscuridad (# $p < 0,05$).

Figura 4.2 Actividad antifúngica *in vitro* de los extractos de *H. pustulata* sobre biofilms de una cepa clínica de *C. tropicalis* CRF6 (expresada en UBB), bajo condiciones de oscuridad e irradiación a las 3 concentraciones ensayadas (0,05, 0,1; 0,2 mg/mL).



Bajo irradiación, los extractos AcOEt y EtOH a 0,2 mg/mL redujeron las UBB pero este efecto no fue significativo respecto a la misma condición en oscuridad ($p > 0,05$). Por lo tanto, sólo el extracto Ben fue capaz de disminuir el biofilm de *C. tropicalis* mediante un efecto de fotoestimulación, determinando que la concentración más activa para reducir el biofilm fue 0,2 mg/mL, tanto bajo la acción de la luz como en oscuridad (Marioni *et al.*, 2016a). Esto significa que estarían involucrados varios factores en el efecto antibiofilm, unos que se activarían con luz y otros que serían independientes de esta (ver más adelante).

Figura 4.3 Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *H. pustulata* (0,2 mg/mL) sobre biofilms de la cepa clínica de *C. tropicalis* CRF6 (expresada en UBB), bajo condiciones de oscuridad e irradiación.



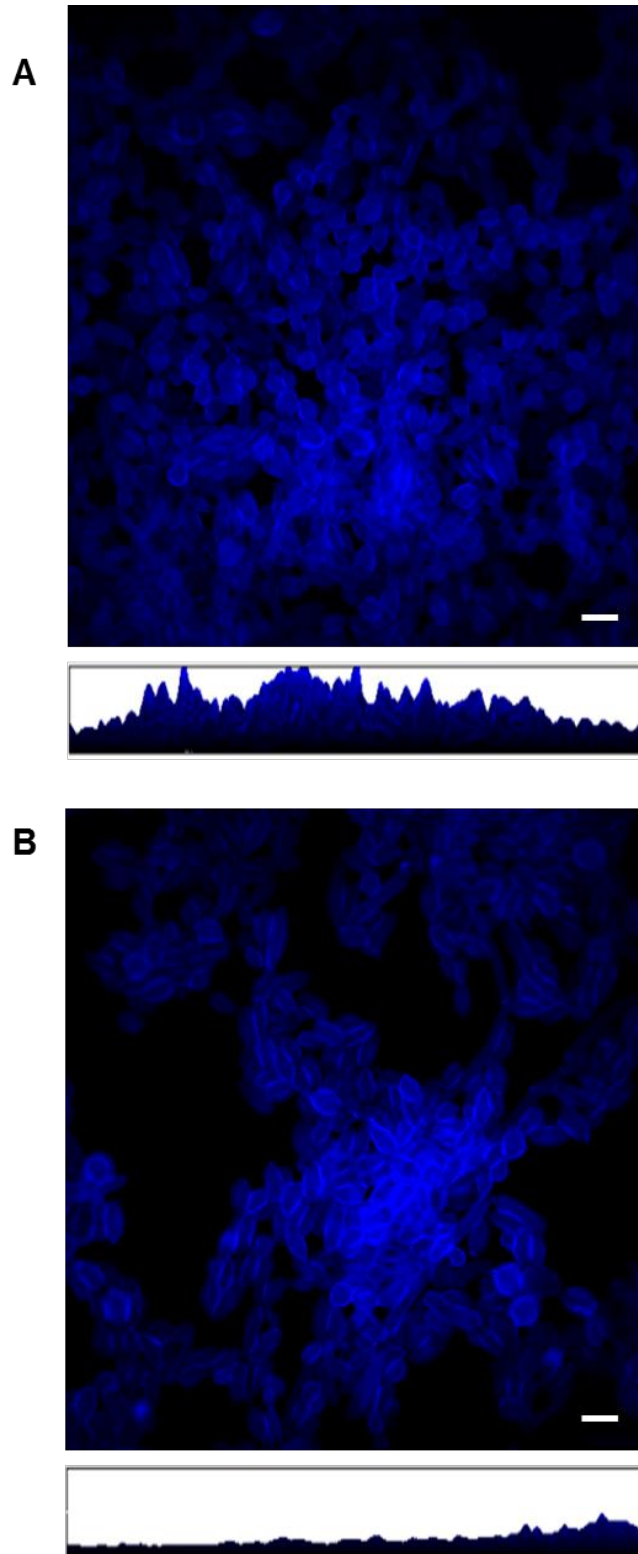
Extractos: Hex: hexánico, Ben: bencénico, AcOEt: acetato de etilo, EtOH: etanólico. La barra de error representa la desviación estándar obtenida de tres experimentos independientes con $n=3$ cada uno. * $p < 0.05$ respecto al biofilm no tratado; # $p < 0.05$ cuando se compararon oscuridad e irradiación.

B- Cuantificación del biofilms por Microscopia confocal de exploración LÁSER

La actividad antibiofilm del extracto Ben fue confirmada por MCEL. En la Fig. 4.4 se muestran las imágenes del eje XY (vista superior) y XZ (vista del perfil) de las células sésiles del biofilm de *C. tropicalis* CRF6 teñidas con Calcofluor-White (azul).

Se pudo observar la reducción del espesor del biofilm tratado con el extracto Ben a la concentración más activa (0,2 mg/mL) en condiciones de irradiación (Fig. 4.4.B) comparado con el control (Fig. 4.4.A). El análisis por COMSTAT demostró que la biomasa del biofilm y el grosor se redujeron luego del tratamiento con el extracto Ben cuando se compararon con el control. El grosor del biofilm tratado fue $12,96 \pm 0,05 \mu\text{m}$, con una reducción de la biomasa del $37,87 \pm 1,08 \%$ en comparación al biofilm no tratado (100 % de biomasa) que presentó un espesor de $20,86 \pm 0,05 \mu\text{m}$. Esta reducción de la biomasa coincidió con el %R obtenido por CV ($39,3 \pm 3,5 \%$ R).

Figura 4.4 Imágenes de MCEL de la actividad antifúngica del extracto Benceno sobre el biofilm de *C. tropicalis* CRF6 bajo la acción de la luz. **(A)** Biofilm no tratado, **(B)** Biofilm tratado con extracto bencénico (0,2 mg/mL).



El azul muestra la pared de las células sésiles teñidas con Calcofluor-White. El panel superior muestra la vista del eje XY y el panel inferior, la vista ortogonal del perfil XZ. Magnificación 60x, escala de la barra 5 µm. Foto representativa de 20 campos.

IV.2.2- Producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno

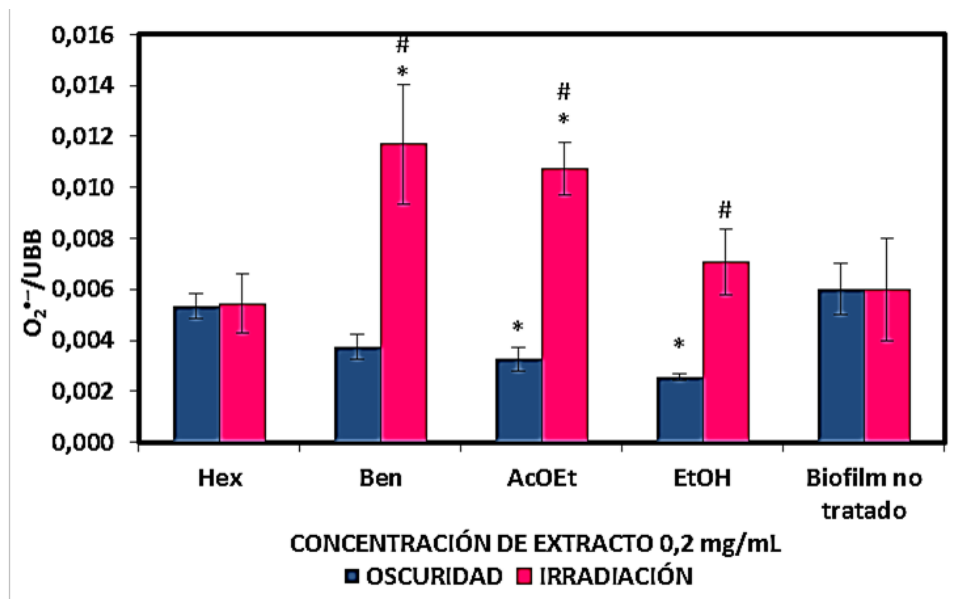
A- Generación de radical anión superóxido

Se analizó la producción del $O_2^{\bullet-}$ como principal ERO, ya que se forma en primer lugar y es promotora de las demás especies.

Ningún extracto ensayado incrementó la producción de $O_2^{\bullet-}$ en oscuridad (Fig. 4.5). Por lo tanto, otro mecanismo de acción estaría involucrado en el efecto inhibitorio del extracto Ben sobre el biofilm, bajo esta condición experimental (Fig. 4.3).

Sin embargo, cuando el sistema biológico fue irradiado, se observó que tanto el extracto Ben como AcOEt fueron los responsables del mayor incremento esta ERO. En el caso del extracto Ben este aumento fue casi el doble respecto al basal ($0,0117 \pm 0,0023$ vs. $0,0060 \pm 0,0020$) y más del triple respecto a su producción en oscuridad ($0,0037 \pm 0,0005$). Similares resultados se observaron para el extracto AcOEt.

Figura 4.5 Generación de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) extracelular por acción de los extractos de *H. pustulata* sobre biofilms de *C. tropicalis* CRF6, bajo condiciones de oscuridad e irradiación.



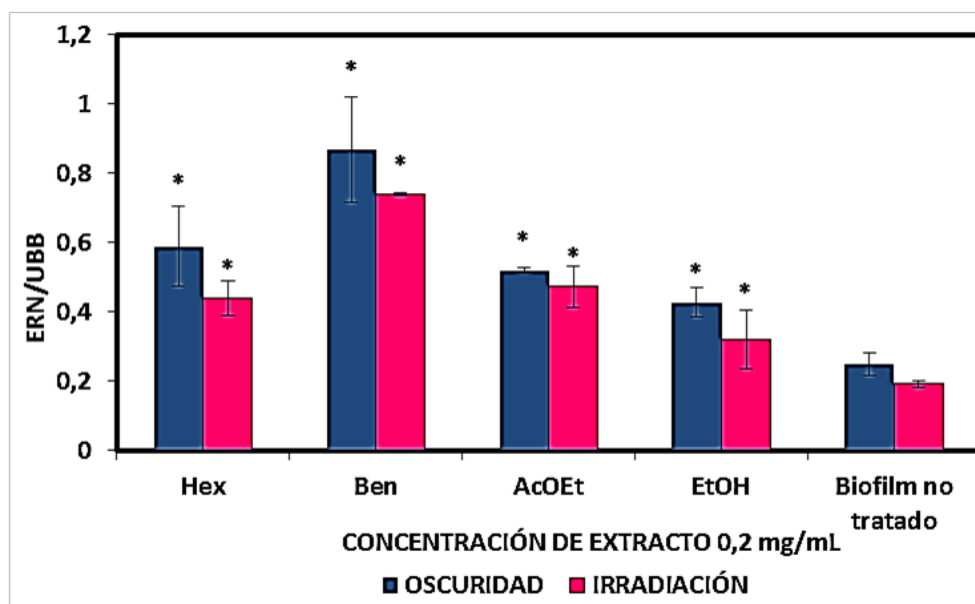
Extractos a 0,2 mg/mL. Hex: hexánico, Ben: bencénico, AcOEt: acetato de etilo, EtOH: etanólico. La barra de error representa la desviación estándar obtenida de tres experimentos independientes con $n=3$ cada uno. * $p < 0,05$ respecto al biofilm no tratado; # $p < 0,05$ cuando se compararon oscuridad e irradiación.

B- Producción de óxido nítrico

Se estudió la generación de NO^{\bullet} en forma indirecta con el reactivo de Griess, ya que esta especie es la precursora de las demás ERN (Cuéllar-Cruz *et al.*, 2014).

Todos los extractos generaron un aumento del NO• en distintas proporciones respecto al biofilm no tratado, siendo esta producción similar bajo ambas condiciones experimentales (luz y oscuridad) (Fig. 4.6).

Figura 4.6 Producción de especies reactivas del nitrógeno (ERN) por acción de los extractos de *H. pustulata* sobre biofilms de *C. tropicalis* CRF6, bajo condiciones de oscuridad e irradiación.



Extractos a 0,2 mg/mL: Hex: hexánico, Ben: bencénico, AcOEt: acetato de etilo, EtOH: etanólico. La barra de error representa la desviación estándar obtenida de tres experimentos independientes con $n=3$ cada uno. * $p < 0.05$ respecto al biofilm; # $p < 0.05$ cuando se compararon oscuridad e irradiación.

Se destacó el extracto Ben por incrementar en mayor medida la generación de las ERN. En oscuridad, el extracto Ben produjo un incremento de 3,5 veces ERN/UBB respecto al biofilm sin tratar; el cual podría ser responsable del escaso efecto inhibitorio observado sobre el biofilm ($17,1 \pm 2,8 \%R$) (Fig. 4.3), ya que no se detectó producción de $O_2^{\bullet-}$ (Fig. 4.5). En este contexto, se puede destacar que ya se ha descrito que incluso bajos niveles de NO• inducen dispersión del biofilm con la consecuente reducción del mismo (Barraud *et al.*, 2009; Angel Villegas *et al.*, 2015). Por otro lado, el incremento de NO• producido por los demás extractos, no sería suficiente para reducir la biomasa del biofilm en oscuridad. Seguramente, estarían actuando sistemas de defensa del biofilm que desactivan las ERN generadas. En el caso del extracto Ben, estas defensas no lograrían contrarrestar el estrés nitrosativo generado y consecuentemente, se observó una baja reducción del biofilm.

Dado que el incremento de NO• en oscuridad no tuvo efecto sobre el biofilm, excepto para el extracto Ben (Fig. 4.3), se infiere que la generación de NO• bajo

irradiación no sería la principal especie involucrada en la reducción del biofilm, debido a que los niveles de $\text{NO}\bullet$ observados en irradiación y oscuridad son similares (Fig. 4.6).

Por lo tanto, en presencia de irradiación, la disminución en la biomasa estaría mediada principalmente por un aumento en la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Fig. 4.3 y 4.5). Sin embargo, se estima que el $\text{NO}\bullet$ generado podría contribuir junto con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ al efecto reductor observado, especialmente para el extracto Ben. Está descrito en bibliografía que una sobreproducción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ favorece la reacción de este radical con el $\text{NO}\bullet$, para generar $\text{ONOO}\bullet$, una especie altamente reactiva, capaz de oxidar y nitrar proteínas y lípidos de membranas externas e intracelulares (Misall *et al.*, 2004; Tillmann *et al.*, 2011). En esta condición, el $\text{NO}\bullet$ se desempeña como un secuestrante que es directamente dependiente de la concentración de $\text{O}_2^{\bullet-}$, a través de una reacción rápida no enzimática que produce $\text{ONOO}\bullet$ (reacción radical-radical), aumentando las reacciones oxidativas y nitrosativas que favorecen y generan procesos de daño celular. Por lo tanto, existe una competencia entre el $\text{NO}\bullet$ y la enzima SOD por el $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Hurtado Bredda *et al.*, 2005; Powers *et al.*, 2011). En base a estos antecedentes, a continuación se evaluó la actividad de la SOD bajo las dos condiciones experimentales.

IV.2.3- Determinación de la activación de la enzima superóxido dismutasa y de la capacidad antioxidante total

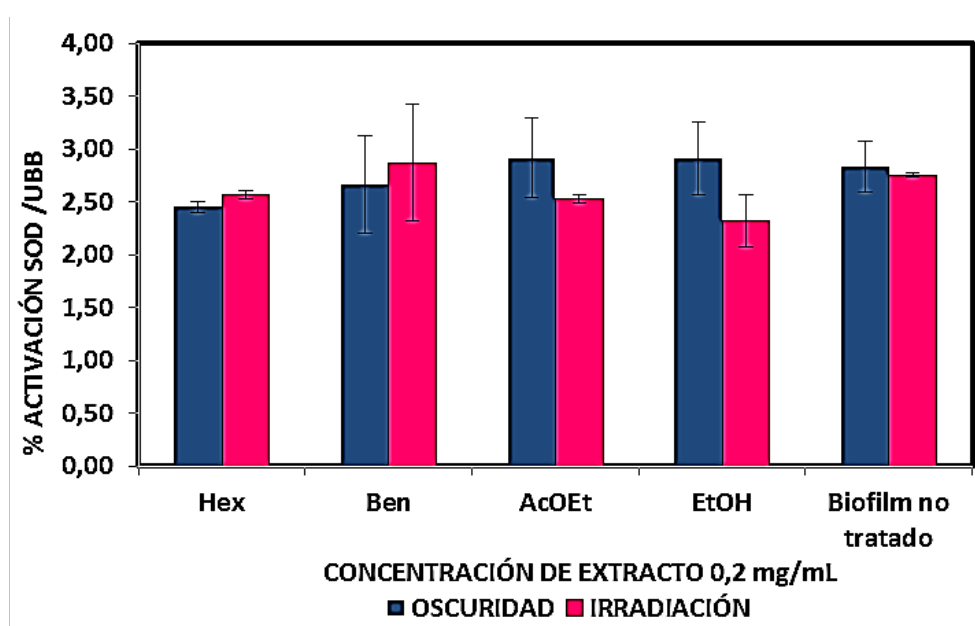
A- Activación de la enzima superóxido dismutasa

Tanto en oscuridad como bajo irradiación, no se observó activación de la SOD del biofilm tratado con los extractos (Fig. 4.7). Dado que los valores de SOD en los biofilms tratados con extractos fueron similares al biofilm no tratado, se podría decir que todo el $\text{O}_2^{\bullet-}$ que reacciona con la enzima es generado por la riboflavina agregada en este ensayo, y que no hay otra fuente productora de esta ERO. Esto puede observarse para la condición oscuridad (Fig. 4.5). Sin embargo, dado que en presencia de luz se observa incremento en la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Fig. 4.5), se puede estimar que otra vía de desactivación de esta ERO estaría actuando. En este caso sería la reacción con el $\text{NO}\bullet$ para generar $\text{ONOO}\bullet$, si consideramos que la reacción radical-radical ($\text{O}_2^{\bullet-}$ y $\text{NO}\bullet$) es más rápida que la reacción enzimática entre $\text{O}_2^{\bullet-}$ y SOD (Astuti *et al.*, 2016; Powers *et al.*, 2011).

De esta forma, se demostró que cuando el biofilm fue irradiado en presencia del extracto Ben, se produjo un incremento significativo de $\text{O}_2^{\bullet-}$ que fue acompañado

por un aumento de ERN. Esto sería debido a que el NO^\bullet , en presencia de una sobreproducción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ tiende a reaccionar rápidamente con éste en su rol de secuestrante de ERO, generando ONOO^\bullet . Dado que no hubo un aumento en la actividad de la SOD en esta condición experimental, se podría inferir que la desactivación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ fue mediada principalmente por la reacción radical-radical y fue predominante sobre la reacción enzimática (Astuti *et al.*, 2016; Powers *et al.*, 2011).

Figura 4.7 Activación de la enzima superóxido dismutasa (SOD) por acción de los extractos de *H. pustulata* sobre biofilms de *C. tropicalis* CRF6, bajo condiciones de oscuridad e irradiación.



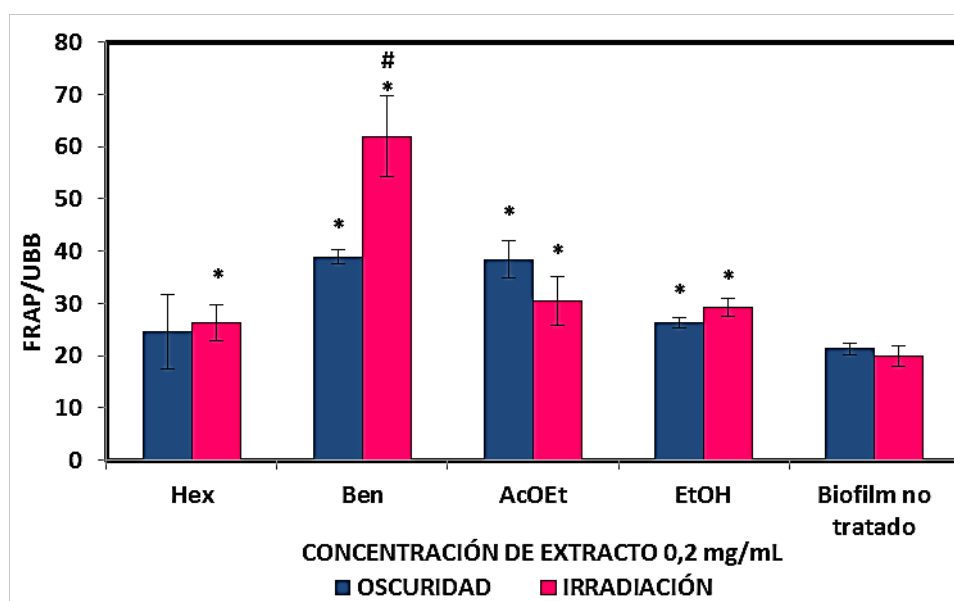
Extractos a 0,2 mg/mL. Hex: hexánico, Ben: bencénico, AcOEt: acetato de etilo, EtOH: etanólico. La barra de error representa la desviación estándar obtenida de tres experimentos independientes con $n=3$ cada uno. * $p < 0.05$ respecto al biofilm no tratado; # $p < 0.05$ cuando se compararon oscuridad e irradiación.

B- Activación de la capacidad antioxidante total: Ensayo FRAP

Frente a una sobreproducción de especies reactivas, se estudió la respuesta antioxidante total del biofilm (enzimático y no enzimático) que tiene como función contrarrestar la generación de ERO y ERN (Missall *et al.*, 2004). En la Fig. 4.8 se muestra la activación del sistema antioxidante total como respuesta a la acción de los extractos en ambas condiciones experimentales (oscuridad e irradiación). El extracto Ben provocó una gran estimulación del sistema antioxidante total en oscuridad e irradiación, respecto de los demás extractos. La activación producida por el extracto Ben fue 1,8 veces en oscuridad ($38,9 \pm 1,3$ vs. $21,3 \pm 1,2$) y 3,1 veces en luz ($61,9 \pm 7,7$ vs. $19,9 \pm 1,9$) respecto al biofilm no tratado.

En función de los resultados obtenidos, se podría estimar que en oscuridad este incremento es suficiente para contrarrestar las ERN generadas por los extractos Hex, AcOEt y EtOH (Fig. 4.6). Por lo tanto, no se observó un efecto reductor sobre el biofilm (Fig. 4.3). Por otra parte, esta activación de la capacidad antioxidante no fue suficiente para compensar la acción del extracto Ben, que provocó una disminución del biofilm mediada por las ERN (Peralta *et al.*, 2015).

Figura 4.8 Efecto de los extractos de *H. pustulata* sobre la capacidad antioxidante total del biofilm de *C. tropicalis* CRF6, bajo condiciones de oscuridad e irradiación.



Extractos a 0,2 mg/mL. Hex: hexánico, Ben: bencénico, AcOEt: acetato de etilo, EtOH: etanólico. La barra de error representa la desviación estándar obtenida de tres experimentos independientes con n=3 cada uno. * $p < 0.05$ respecto al biofilm no tratado; # $p < 0.05$ cuando se compararon oscuridad e irradiación.

Bajo irradiación, los extractos Hex, AcOEt y EtOH generaron una estimulación del sistema antioxidante total que parecería anular completamente el efecto de las ERO y ERN producidas por el extracto Hex que resultó inactivo, o contrarrestarlo parcialmente en el caso de los extractos AcOEt y EtOH que redujeron levemente el biofilm, pero no lo suficiente para observar una fotoactivación de los mismos. Si bien, en presencia del extracto Ben y luz, la activación del sistema antioxidante total fue mayor que para los demás extractos, no fue capaz de contrarrestar las especies reactivas generadas (las cuales alcanzaron niveles más altos respecto a los otros extractos), provocando una reducción significativa del biofilm mediante una fotoestimulación.

Si bien la principal enzima detoxificante de $O_2^{\cdot-}$ (SOD) no se activó, la capacidad antioxidante total del biofilm en particular los componentes no enzimáticos

estarían actuando como una defensa al estrés oxidativo y nitrosativo generado; y por lo tanto no fue posible alcanzar la erradicación del biofilm.

IV.2.4- Generación de oxígeno singlete por los extractos de *H. pustulata*

En base a los resultados anteriores, que demuestran una fotoestimulación del efecto antibiofilm del extracto Ben, se evaluó la producción de $^1\text{O}_2$. Esta ERO sólo se genera bajo irradiación, ya que necesita una transferencia de energía desde el FS* al $^3\text{O}_2$, en un proceso conocido como fotosensibilizante Tipo II. Por tal motivo, se evaluó si los extractos en solución tenían capacidad de incrementar la generación $^1\text{O}_2$ bajo acción de la luz. Para ello, se usó la sonda SOSG que mide la fluorescencia del producto de reacción con $^1\text{O}_2$ cuando el FS está en solución.

En la Tabla 4.2 se observa el aumento en la producción de $^1\text{O}_2$ generado por los extractos en soluciones de PBS y en presencia de SOSG. Bajo irradiación, se observó un incremento de $4,6 \pm 1,2$ y $2,55 \pm 0,04$ veces de esta ERO para los extracto Hex y Ben, respectivamente, en comparación a SOSG.

Tabla 4.2 Incremento en la generación de $^1\text{O}_2$ por los extractos de *H. pustulata*, en condiciones de oscuridad e irradiación respecto de la sonda SOSG.

EXTRACTO	INCREMENTO EN LA PRODUCCIÓN DE $^1\text{O}_2$	
	OSCURIDAD	LUZ
Hex	nd *	$4,6 \pm 1,2$
Ben	nd	$2,55 \pm 0,04$
AcOEt	nd	nd
EtOH	nd	nd

*no detectado

Se evidenció que los extractos no polares (Hex y Ben) tendrían capacidad para actuar por el mecanismo fotosensibilizante Tipo II. Este resultado indicaría que los metabolitos secundarios presentes en estos extractos podrían actuar como potenciales FS Tipo II.

El estudio de la actividad antifúngica de los extractos obtenidos de *H. pustulata* sobre biofilms de *C. tropicalis* CRF6, mostró que el extracto Ben fue el único bioactivo bajo las dos condiciones experimentales, exhibiendo un importante efecto reductor sobre el crecimiento del biofilm bajo la acción de la luz. Así, se estableció que el leve

efecto reductor de este extracto en oscuridad fue mediado solamente por un estrés nitrosativo (incremento en la generación de ERN); mientras que bajo irradiación, el estrés oxidativo fue el proceso predominante (aumento en la generación de ERO). De esta forma, se evidenció una inactivación fotodinámica del biofilm por acción del extracto Ben, ya que se ha demostrado que las sustancias fotosensibilizantes incrementan los niveles de ERO en presencia de luz, lo cual resulta finalmente en un estrés oxidativo sobre el microorganismo (Dai *et al.*, 2012; Hamblin, 2016). Se entiende como estrés a una sobreproducción de especies reactivas, como consecuencia de una estimulación en la producción de las especies o una reducción en el sistema de defensa antioxidante (Powers *et al.*, 2011). Por tal motivo, la producción de $O_2^{\bullet-}$ (asociada al mecanismo fotosensibilizante Tipo I) y de NO^{\bullet} (secuestrante de $O_2^{\bullet-}$) se evaluó, como los principales precursores de las ERO y de las ERN, respectivamente. En consecuencia, se estudió en forma simultánea la capacidad antioxidante total del sistema (enzimático y no-enzimático), como una respuesta a ambos tipos de estrés por medio del ensayo FRAP. Además, la activación de la enzima SOD se estudió por su acción específica sobre el $O_2^{\bullet-}$ (dismutación de esta ROS en H_2O_2). Los resultados obtenidos, permitieron concluir que frente a una sobreproducción de ERO y de ERN (en menor medida) por parte del extracto Ben bajo irradiación, se activa la SOD y el sistema antioxidante total del biofilm. Esto se traduce en una reducción de la biomasa del biofilm, desencadenada por la acción de la luz, pero que no logra la erradicación completa de éste.

En conclusión, se observó una significativa acción antibiofilm del extracto Ben, mediada por un efecto fotodinámico, en donde predominaría la estimulación de la producción de $O_2^{\bullet-}$ (mecanismo fotosensibilizante Tipo I).

A pesar que no se pudo demostrar que el mecanismo fotosensibilizante Tipo II (generación de 1O_2) estaría actuando sobre el biofilm, se evidenció que el extracto Ben y por lo tanto, sus constituyentes químicos, incrementan esta ERO en solución de PBS bajo irradiación. Por lo cual, los metabolitos secundarios presentes en este extracto cobran especial interés como potenciales FS.

Con el fin de establecer los metabolitos secundarios responsables del efecto observado por los extractos ensayados, a continuación se procedió a realizar el análisis químico de los mismos.

IV.3- ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS EXTRACTOS DE *H. pustulata* ENSAYADOS SOBRE BIOFILMS

Estudios químicos previos demostraron que derivados antraquinónicos y flavonoideos caracterizan esta especie vegetal, siendo las AQs agliconas los metabolitos secundarios mayoritarios (Fig. 1.6 de Introducción) (Núñez Montoya *et al.*, 2003; 2006). En consecuencia, para determinar la composición química de los extractos, se desarrolló una metodología mediante HPLC-UV-Vis y una metodología HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF.

IV.3.1 – Análisis químico mediante HPLC-UV-Vis

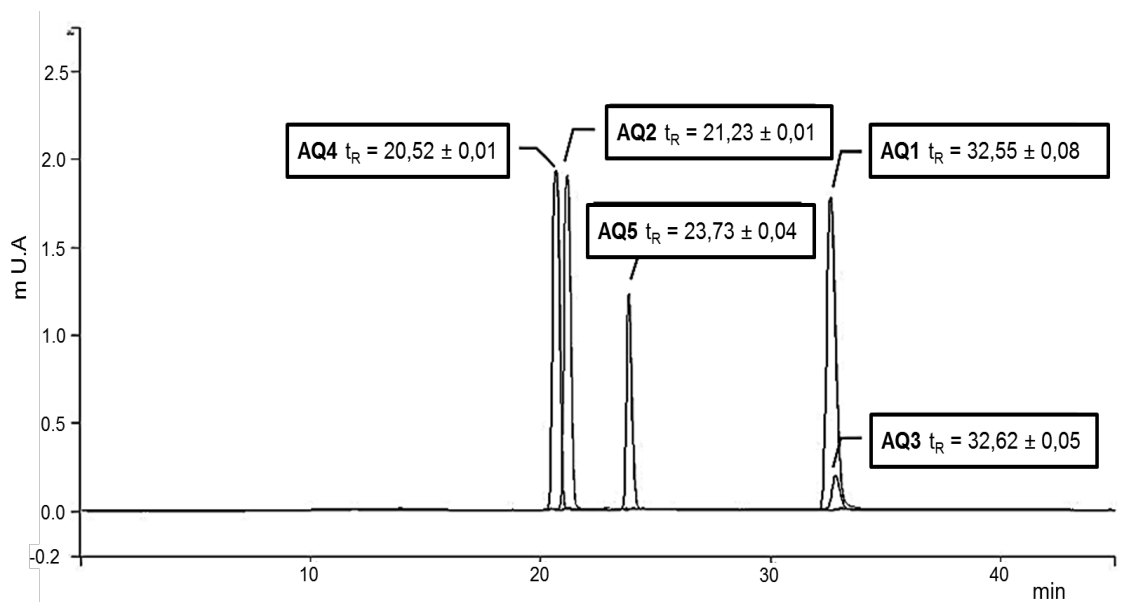
A-Validación de la metodología de HPLC-UV-Vis

Previo al análisis químico de los extractos por HPLC, fue necesario validar la metodología a utilizar. Para ello, se utilizó una columna y un sistema de dos solventes como FM que se utilizan de forma rutinaria en la separación e identificación de AQs presentes en una matriz compleja, como es un extracto de planta (He *et al.*, 2009; Panichayupakaranant *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2013).

El gradiente de la FM y la velocidad de flujo de la misma se optimizaron con el fin de obtener una buena separación y resolución de los compuestos de interés. A ambos disolventes que conforman la FM, se les añadió ácido fórmico (0,16 M) para reducir las colas de los picos, y así obtener señales de forma simétrica. Esto se puede observar en los perfiles cromatográficos de los cinco compuestos que se utilizaron como testigos para la identificación, los cuales se muestran superpuestos en la Fig. 4.9. A pesar de todas las condiciones experimentales probadas (cambio de gradiente y de flujo en la FM), no se logró la separación de **rubiadina (AQ1)** y **soranjidiol (AQ3)** (Fig. 1.6 en Introducción), los cuales son isómeros de posición. La solución de **AQ3** se diluyó para demostrar que eluye con el mismo tiempo de retención (t_R) que **AQ1**. Por otro lado, se obtuvo una buena resolución en la separación de sus derivados metilados en posición 1-: **1 metil éter de rubiadina (AQ2)** y **1 metil éter de soranjidiol (AQ4)**.

Para identificar los derivados antraquinónicos y flavonoides se seleccionó la longitud de onda de 269 nm, ya que las AQs tienen un máximo de absorbancia a 270 nm aproximadamente y los flavonoides exhiben un máximo de absorción a 258 nm con un hombro a 269 nm (Núñez Montoya, 2002). En los cromatogramas de las muestras no se observó interferencia para los compuestos.

Figura 4.9 Superposición de los perfiles cromatográficos de los compuestos estándar: **AQ1** (rubiadina), **AQ2** (1-metil éter de rubiadina), **AQ3** (soranjidiol) **AQ4** (1-metil éter de soranjidiol) y **AQ5** (2-hydroxy-3-metil antraquinona).



AQ1, AQ2, AQ4 y AQ5 a 1 mg/mL, y **AQ3** a 125 µg/mL.

Debido a que la concentración de cada AQ identificada se expresó en función de rubiadina (**AQ1**) y la de cada flavonoide como quercetina (**Quer**), se realizaron dos curvas de calibración, una para cada compuesto testigo. En la Tabla 4.3 se muestra la ecuación obtenida para cada curva de calibración y su R^2 . Se puede observar que en el rango de concentraciones ensayadas se cumple con la Ley de Lambert-Beer, y junto con los resultados de la prueba- t se confirma que el método es lineal en ese mismo rango de concentraciones.

Tabla 4.3 Curva de calibración, límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para rubiadina (**AQ1**) y quercetina (**Quer**) determinados por HPLC-UV-Vis.

Compuesto	Rango de linealidad (µg/mL)	Ecuación de la curva de calibración ^a	R^2	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
AQ1	6,25 - 100	$y = 59334x + 71$	0,9953*	0,22	0,43
Quer	12,5 - 200	$y = 57994x - 527,04$	0,997*	1,12	1,63

^a Cinco puntos (n = 2), x = concentración de los compuestos (mg/mL) y = área del pico.* t -test: $p < 0.05$

Se llevó a cabo un estudio de validación para garantizar la precisión y exactitud del método analítico desarrollado, incluyendo el sistema cromatográfico utilizado. Para esto, se realizaron una serie de ensayos, incluyendo la determinación de límite de

detección y cuantificación (LOD y LOQ), linealidad, precisión intra-día y entre días, y exactitud. La determinación de los valores de LOD y LOQ de los compuestos testigos **AQ1** y **Quer**, se realizó mediante la dilución secuencial de las soluciones estándar de los correspondientes compuestos. También se muestran en la Tabla 4.3 los valores de LOD (relación señal-ruido proporción = 3) y el LOQ (S/N = 10) para cada compuesto de referencia.

Para determinar la precisión y la exactitud del sistema cromatográfico, se utilizaron las variaciones intra e inter- día de los dos compuestos de referencia (Tabla 4.4). Los valores de RSD intra y entre días de los analitos fueron menores a 4 %, estando por debajo del máximo valor de RSD calculado mediante la ecuación de Horwitz ($RSD_{\text{máx}} = 16,85$ para **AQ1**, y $14,93$ para **Quer**). Estos resultados muestran una buena repetitividad y reproducibilidad del sistema cromatográfico. Por otra parte, la precisión observada fue buena (% RSD <3). Como estos experimentos se realizaron durante tres días consecutivos, la estabilidad de los estándares **AQ1** y **Quer** en las soluciones de trabajo se estudió simultáneamente. Los datos muestran que tanto **AQ1** como **Quer** en solución, fueron estables dentro de los 3 días después de su preparación, conservados durante 8 h a temperatura ambiente y 12 h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tabla 4.4).

Resultados y Discusión

Tabla 4.4 Valores de precisión y exactitud intra y entre días para los compuestos de referencia: Rubiadina (**AQ1**) y quercetina (**Quer**).

Compuesto de Referencia	Concentración (µg/mL)	Precisión intra-día (n = 3) (Repetitividad)						Precisión entre días (n = 9) (Reproducibilidad)		Exactitud intra-día			Exactitud entre días
		Día 1		Día 2		Día 3		µg/mL	RSD %	Día 1	Día 2	Día 3	RSD %
		µg/mL	RSD %	µg/mL	RSD %	µg/mL	RSD %			RSD %	RSD %	RSD %	
AQ1	50	51,2 ± 1,9	3,71	51,9 ± 2,0	2,91	51,4 ± 0,7	1,36	51,5 ± 0,3	0,58	2,33	3,62	2,78	2,91
	6,25	6,43 ± 0,16	2,49	6,27 ± 0,17	1,87	6,4 ± 0,1	1,56	6,37 ± 0,07	1,09	2,75	0,40	2,41	1,87
Quer	100	98,4 ± 0,9	0,91	99,6 ± 0,6	-1,33	98,1 ± 0,7	0,71	98,7 ± 0,6	0,64	-1,59	-0,44	-1,95	-1,33
	50	49,1 ± 0,7	1,43	49,3 ± 0,8	-1,74	49,0 ± 0,9	1,84	49,13 ± 0,09	0,24	-1,76	-1,49	-1,96	-1,74
		t _R (min)	RSD %	t _R (min)	RSD %	t _R (min)	RSD %	t _R (min)	RSD %				
AQ1	50 y 6,25	33,16 ± 0,12	0,36	33,01 ± 0,05	0,15	32,52 ± 0,15	0,46	32,89 ± 0,34	1,03				
Quer	100 y 50	12,78 ± 0,02	0,15	12,73 ± 0,06	0,47	13,03 ± 0,13	0,99	12,85 ± 0,13	1,01				

Resultados y Discusión

Se determinó la precisión intra e inter-día del método analítico propuesto, analizando el contenido de los compuestos testigos en una solución de extracto Ben enriquecido con **AQ1** (45 mg/mL) y otra de extracto de AcOEt enriquecido con **Quer** (30 mg/mL), las cuales fueron inyectadas por triplicado durante tres días consecutivos. Los valores se expresaron como porcentaje de RSD cuyos valores fueron menores a 4 % (Tabla 4.5). Por lo tanto, el método analítico mostró una buena repetitividad y reproducibilidad.

Tabla 4.5 Valores de precisión intra y entre días para rubiadina (**AQ1**) y quercetina (**Quer**) detectadas en los extractos de *H. pustulata*.

Compuesto	Precisión intra-día (n= 3)						Precisión entre días (n= 9)	
	Día 1		Día 2		Día 3		Contenido (µg/mL)	RSD %
	Contenido (µg/mL)	RSD %	Contenido (µg/mL)	RSD %	Contenido (µg/mL)	RSD %		
AQ1 ^a	59,75 ± 2,24	3,75	60,52 ± 0,97	1,60	64,67 ± 2	3,14	61,64 ± 2,16	3,50
Quer ^b	56,64 ± 0,60	1,06	56,46 ± 0,7	1,24	56,49 ± 0,90	1,59	56,53 ± 0,08	0,14

^a Detectado en el extracto Ben.

^b Detectado en el extracto AcOEt.

La precisión se determinó utilizando las mismas soluciones de extracto Ben con el agregado de **AQ1** y del extracto AcOEt con el agregado de **Quer**, y se expresó como un porcentaje de recuperación. Las recuperaciones porcentuales obtenidas de ambos analitos se muestran en la Tabla 4.6, y sus valores establecen que el método mostró una buena precisión.

Tabla 4.6 Datos de recuperación de rubiadina (**AQ1**) y quercetina (**Quer**) de los extractos de *H. pustulata*, enriquecidos con los compuestos de referencia.

Compuesto	Agregado (µg/mL)	Detectado ^a (µg/mL)	Recuperación promedio (%)	RSD (%)
AQ1	45	44,3 ± 1,2	97,2 ± 2,5	2,57
Quer	30	29,7 ± 0,4	98,8 ± 1,5	1,52

^a Calculado como la diferencia entre la cantidad total después del agregado del estándar al respectivo extracto y la cantidad de ese compuesto en el extracto antes del agregado del estándar. Los datos se expresaron como el promedio de 3 experimentos.

Este estudio de validación demostró que el método de HPLC propuesto es razonablemente preciso y exacto para la detección (t_R) y cuantificación de Aqs y flavonoides. Todos los valores de RSD en los experimentos de precisión intra- e inter-

día fueron menores al 4 %, y mostraron una alta tasa de recuperación para ambos tipos de compuestos químicos (AQs y flavonoides). Por lo tanto, teniendo en cuenta la naturaleza compleja de los extractos vegetales y los requisitos analíticos, se puede considerar que este método de HPLC resultó adecuado para la detección simultánea de AQs y flavonoides, como así también su cuantificación en los extractos de *H. pustulata*.

B- Análisis químico de los extractos de partes aéreas de *H. pustulata* por HPLC-UV-Vis: Correlación entre su composición química y la actividad antibiofilm *in vitro*

La caracterización química de los extractos mediante el análisis por HPLC, demostró que el extracto Ben sólo contiene derivados antraquinónicos (Tabla 4.7), mostrando poseer una gran variedad de éstos a altas concentraciones en comparación con los demás extractos. En este extracto, las AQs mayoritarias resultaron ser **rubiadina (AQ1)** y **soranjidiol (AQ3)**, seguidas en orden decreciente por **pustulina (AQ6)** (Fig. 1.6 en Introducción y Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en extractos de partes aéreas de *H. pustulata* mediante HPLC-UV-Vis.

METABOLITOS SECUNDARIOS	IDENTIFICACIÓN	CUANTIFICACIÓN (% p/p)*			
ANTRAQUINONAS	t _R en extractos (min)	Hex	Ben	AcOEt	EtOH
Damnacantal (AQ7)	-	-	-	-	-
Damnacantol (AQ8)	13,85 ± 0,01	-	0,34 ± 0,07	-	-
1-metil éter de soranjidiol (AQ4)	20,53 ± 0,01	0,014 ± 0,003	0,58 ± 0,08	-	-
1-metil éter de rubiadina (AQ2)	21,12 ± 0,01	0,05 ± 0,06	0,15 ± 0,08	-	-
2-OH-3-CH ₃ -AQ (AQ9)	23,78 ± 0,04	0,09 ± 0,03	0,30 ± 0,05	0,4 ± 0,1	0,03 ± 0,02
Pustulina (AQ6)	23,25 ± 0,05	0,49 ± 0,07	1,64 ± 0,08	0,52 ± 0,01	0,077 ± 0,002
Rubiadina (AQ1)	32,57 ± 0,08	0,4 ± 0,1	2,7 ± 0,8	0,416 ± 0,007	0,12 ± 0,02
Soranjidiol (AQ3)					
Heterofilina (AQ5)	30,9 ± 0,1	0,12 ± 0,09	0,33 ± 0,02	0,038 ± 0,005	-
5,5'-bisoranjidiol (AQ10)	34,4 ± 0,1	0,09 ± 0,05	0,09 ± 0,07	0,06 ± 0,01	-
FLAVONOIDES					
Quercetina (Quer)	11,85 ± 0,04	-	-	2,36 ± 0,03	-
Isoquercitrina	8,0 ± 0,2	-	-	1,91 ± 0,07	2,19 ± 0,09
3-O-β-D-(6"-acetilglucosil) quercetina	9,2 ± 0,1	-	-	3,2 ± 0,4	1,89 ± 0,04

*(g de compuesto en 100 g de extracto desecado). Hex: extracto hexano. Ben: extracto benceno. AcOEt: extracto acetato de etilo. EtOH: extracto etanol

En el caso del extracto Hex, las concentraciones de AQs fueron menores que en el extracto Ben. Por su parte, los extractos de AcOEt y EtOH poseen un mayor contenido de flavonoides que de AQs. Así, se estableció que la principal diferencia entre los extractos no polares (Hex y Ben) y los polares (AcOEt y EtOH) es que éstos últimos poseen una significativa cantidad de flavonoides (Marioni *et al.*, 2016a).

El efecto producido por cada extracto de *H. pustulata* sobre biofilms de *C. tropicalis* se puede explicar mediante el análisis de su composición química. Así, la significativa actividad antibiofilm del extracto Ben observada bajo irradiación (Fig. 4.3), podría atribuirse su alto contenido de AQs con propiedades fotosensibilizantes, ya que se demostró que el efecto de este extracto se debe a una alta producción de $O_2^{\bullet-}$ (Fig. 4.5). Es importante destacar, que las AQs predominantes en el extracto Ben son rubiadina (**AQ1**) y soranjidiol (**AQ3**), las cuales han demostrado ser buenos compuestos fotosensibilizadores mediante la estimulación de la producción de $O_2^{\bullet-}$ (Mecanismo fotosensibilizante Tipo I) (Núñez Montoya *et al.*, 2005; Comini *et al.*, 2007). Además, esta ERO es la principal precursora de otras especies de oxígeno altamente reactivas como H_2O_2 y HO^{\bullet} .

Por otro lado, la baja concentración de AQs fotosensibilizantes en los extractos Hex, AcOEt y EtOH (Tabla 4.7), junto con la presencia de cantidades importantes de flavonoides, especialmente en los extractos polares (AcOEt y EtOH), podría ser la causa de la baja detección de ERO en los mismos. Esto sería una consecuencia de un gran consumo de las ERO por mecanismos antioxidantes como FRAP y a su vez propiciados por los flavonoides. Consecuentemente, esto deriva en un leve efecto de estos extractos sobre los biofilms.

En el caso del extracto Hex, la concentración de AQs fue menor respecto al extracto Ben, y parecería que la activación de la SOD y del sistema antioxidante total del biofilm podría contrarrestar el efecto de las escasas ERO y ERN generados por las AQs presentes en este extracto (Fig. 4.5 y 4.6). Por el contrario, los extractos de AcOEt y EtOH poseen un mayor contenido de flavonoides que AQs, dos de ellos con reconocida actividad antioxidante (**Quer** e Isoquercitrina) (Permana *et al.*, 2003; Boots *et al.*, 2008). Esto podría explicar la baja generación de ERO y de ERN por estos extractos bajo irradiación, que a su vez fue contrarrestada por la activación del sistema antioxidante total del biofilm.

IV.3.2 – Análisis químico mediante HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF

Mediante esta metodología se corroboró la identificación de los derivados antraquinónicos presentes en los extractos de partes aéreas de *H. pustulata* (Tabla 4.8).

Como se puede observar, los tiempos de retención como así también el ión [M-1] y los respectivos fragmentos de los iones de los metabolitos secundarios presentes en los extractos coinciden con los de los testigos. Así se logró confirmar la identificación de las AQs y flavonoides.

Resultados y Discusión

Tabla 4.8. Identificación de metabolitos secundarios en extractos de partes aéreas obtenidos de *H. pustulata* mediante HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF.

EXTRACTOS DE PARTES AÉREAS							
Compuesto	[M-1] (m/z)	Testigo			Extractos		
		t _R	Fragmentos MS/MS (m/z)	UV-Vis (nm)	t _R	Fragmentos MS/MS (m/z)	UV-Vis (nm)
2-OH-3-CH ₃ -AQ (AQ9)	237	26,7 ± 0,2	209	277, 328 (sh), 385	26,5 ± 0,2	209	281, 340 (sh), 371 (1, 2, 3, 4)
Rubiadina (AQ1)	253	35,1 ± 0,1	----	245, 278, 337, 411	35,2 ± 0,1	225	277, 337 (sh), 414 (1, 2, 3, 4)
Soranjidiol (AQ3)		35,3 ± 0,2	225	269, 291 (sh), 411	35,5 ± 0,1	----	270, 291 (sh), 413 (1, 2, 3, 4)
1-metil éter de soranjidiol (AQ4)		24,15 ± 0,07	252, 224	269, 288 (sh), 353	24,2 ± 0,0	252, 224	269, 288 (sh), 353 (1, 2)
1-metil éter de rubiadina (AQ2)	267	24,8 ± 0,2	252, 224	280, 356	24,5 ± 0,0	252, 224	280, 356 (1, 2)
Pustulina (AQ6)		26,5 ± 0,0	252, 224	254 (sh), 283, 342 (sh), 400 (sh)	26,5 ± 0,0	252, 224	256 (sh), 283, 337 (sh), 380 (sh) (1, 2, 3, 4)
Damnacantol (AQ8)	283	19,8 ± 0,2	239, 183	242, 278, 317 (sh), 362 (sh)	19,7 ± 0,1	253, 210	273, 369 (2)
Heterofillina (AQ5)		34,2 ± 1,1	268, 240	286, 305 (sh), 406 (sh), 426, 442 (sh)	33,5 ± 0,0	268, 240	287, 304 (sh), 408 (1, 2, 3)
Quercetina (Quer)	301	18,1 ± 0,2	255	257, 268 (sh), 299 (sh), 374	18,3 ± 0,0	---	256, 267 (sh), 371 (3)
Isoquercitrina	463	15,97 ± 0,06	300	257, 265 (sh), 297 (sh), 356	16,0 ± 0,0	301	257, 265 (sh), 300 (sh), 355 (3, 4)
3-O-β-D-(6"-acetilglucosil) quercetina	505	16,7 ± 0,01	301	258, 268 (sh), 299 (sh), 362	16,7 ± 0,0	301	255, 264 (sh), 296 (sh), 357 (3, 4)
5, 5'-bisoranjidiol (AQ10)		36,06 ± 0,09	456, 253	276, 298 (sh), 441	36,05 ± 0,05	455,253	272, 304 (sh), 386 (sh)

1: extracto Hex, 2: extracto Ben, 3: extracto AcOEt, 4: extracto EtOH

Otro logro de esta tesis, fue el desarrollo de dos métodos para identificar AQs y flavonoides: HPLC-UV-Vis y HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF. Además, se realizó la validación del método HPLC-UV-Vis, lo cual permitió además cuantificar el contenido de los metabolitos en los extractos. Así, se demostró que las AQs aglicones son los metabolitos secundarios mayoritarios, especialmente en los extractos apolares debido a su naturaleza aglicón. Además, se pudo determinar que sólo los extractos más polares contienen flavonoides.

Esta caracterización química de los extractos de *H. pustulata* por HPLC, permitió estimar que el efecto fotodinámico del extracto Ben podría ser atribuido al alto contenido de AQs con propiedades fotosensibilizantes y a la ausencia de flavonoides antioxidantes (Núñez Montoya *et al.*, 2003; Marioni *et al.*, 2016a). Se destaca como principal constituyente rubiadina (**AQ1**) que ha mostrado propiedades fotosensibilizantes Tipo I (generación de $O_2^{\bullet-}$) y Tipo II (producción de 1O_2) (Núñez Montoya *et al.*, 2005; Comini *et al.*, 2007).

IV.4- SEPARACIÓN, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ANTRAQUINONAS

A partir del análisis por HPLC del extracto Ben de partes aéreas de *H. pustulata* que resultó activo sobre biofilm de *C. tropicalis* CRF6, se estableció que AQ1 (Fig. 1.6 en Introducción) es una de las AQs mayoritarias (Tabla 4.7). Por tal motivo, se decidió probar su actividad antibiofilm fotoactivada in vitro, y compararla con otra AQ relacionada estructuralmente, su derivado metilado: 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**).

En la búsqueda de la cantidad necesaria y suficiente de ambas AQs, se llevó a cabo una estrategia de purificación que resultara más simple. Como los extractos de raíces de esta planta no poseen clorofilas que interfieren en el proceso de purificación, se analizó la composición química de los mismos. A partir de 90 g de raíces de esta especie vegetal se obtuvieron los extractos Hex $0,4325 \pm 0,0002$ g, Ben $0,3036 \pm 0,0002$ g, AcOEt $0,3350 \pm 0,0002$ g y EtOH $2,3893 \pm 0,0002$ g. Mediante el análisis por HPLC se demostró que las raíces poseen un alto contenido de derivados antraquinónicos, sin presencia de flavonoides (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en extractos de raíces obtenidos de *H. pustulata* mediante HPLC-UV-Vis.

METABOLITOS SECUNDARIOS	IDENTIFICACIÓN	CUANTIFICACIÓN (% p/p)*			
ANTRAQUINONAS	t_R in extracts (min)	Hex	Ben	AcOEt	EtOH
Damnacantal (AQ7)	-	-	-	-	-
Damnacantol (AQ8)	$19,8 \pm 0,2$	$0,61 \pm 0,05$	$29,47 \pm 0,02$	$11,27 \pm 0,04$	$3,13 \pm 0,03$
1-metil éter de soranjidiol (AQ4)	-	-	-	-	-
1-metil éter de rubiadina (AQ2)	$24,85 \pm 0,07$	$9,79 \pm 0,02$	$38,49 \pm 0,05$	$16,15 \pm 0,04$	$7,38 \pm 0,02$
2-OH-3-CH3-AQ (AQ9)	$26,95 \pm 0,07$	$2,9 \pm 0,1$	$14,21 \pm 0,02$	$4,57 \pm 0,02$	$1,46 \pm 0,02$
Pustulina (AQ6)	-	-	-	-	-
Rubiadina (AQ1)	$34,95 \pm 0,07$	$13,26 \pm 0,03$	$35,82 \pm 0,04$	$8,51 \pm 0,03$	$5,02 \pm 0,03$
Soranjidiol (AQ3)	-	-	-	-	-
Heterofilina (AQ5)	-	-	-	-	-
5,5'-bisoranjidiol (AQ10)	$36,05 \pm 0,07$	$0,45 \pm 0,03$	$7,58 \pm 0,02$	$4,07 \pm 0,03$	$2,49 \pm 0,02$
ω -metil éter de Lucidina	$28,75 \pm 0,07$	-	$0,36 \pm 0,06$	$0,44 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,07$
FLAVONOIDES					
Quercetina (Quer)	-	-	-	-	-
Isoquercitrina	-	-	-	-	-
3-O- β -D-(6"-acetilglucosil) quercetina	-	-	-	-	-

*(g de compuesto en 100 g de extracto desecado). Hex: extracto hexano. Ben: extracto benceno. AcOEt: extracto acetato de etilo. EtOH: extracto etanol

Esto también constituye una ventaja en la obtención de las AQs, ya que la ausencia de flavonoides facilita el proceso de purificación. Al igual que en partes aéreas, el extracto Ben se destacó por su alto contenido de AQs, especialmente de **AQ1** y **AQ2**. Incluso, la concentración de **AQ1** fue mayor en raíces ($35,82 \pm 0,04$ % p/p), que en las partes aéreas ($2,74 \pm 0,84$ % p/p en partes aéreas) (Tabla 4.9 y Tabla 4.7). En consecuencia, se seleccionó el extracto Ben de raíces para purificar **AQ1** y su derivado metilado.

IV.4.1- Separación y purificación de rubiadina y 1-metil éter de rubiadina

Una fracción del extracto bencénico de raíces (1,018 g), se procesó por cromatografía en columna de sílica gel con el gradiente de FM que se muestra en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10: Gradiente de FM de la columna de sílica gel del extracto Benceno de raíces.

Gradiente FM	Alícuotas
Ben	1-27
Ben - AcOEt (8:2)	28-50
Ben - AcOEt (1:1)	51-60
Ben - AcOEt (2:8)	61-66
AcOEt	67-68
AcOEt - Acetona (8:2)	69-76
AcOEt - Acetona (1:1)	77-91
AcOEt - Acetona (2:8)	92-97
Acetona	98
EtOH	99

Posteriormente, las 99 alícuotas obtenidas se testearon por TLC analítica en dos FM: CHCl_3 -AcOEt (8:2) y Ben-MeOH (95:5). De esta forma, se agruparon en 23 fracciones, teniendo en cuenta su patrón cromatográfico (I a XXIII).

A continuación, las 23 fracciones obtenidas se testearon por TLC contra testigo de **AQ1** y **AQ2**, usando las mismas FM anteriores, con el fin de determinar las fracciones donde estaban presentes.

A partir de la fracción III, se aisló **AQ2** mediante TLCp utilizando como FM Ben-MeOH (95:5). Esta AQ se observó de color opaco cuando fue revelada con luz UV, incluso con vapores de NH₃ y a simple vista se observó de color rojizo.

AQ1 fue aislada y purificada de la fracción V por TLCp con MeOH-Ácido fórmico 0,16 M (8:2). Esta AQ se reveló a la luz UV con un color naranja-opaco, que se intensificó con vapores de NH₃ bajo luz UV, siendo a simple vista observada como una mancha rojiza.

A su vez, ambas AQs también se obtuvieron de la fracción IV. Al estar juntas, se necesitó realizar una cromatografía columna similar a la anterior. Se utilizó la misma FE y el mismo gradiente de elución, obteniéndose 31 fracciones analizadas por TLC (I a XXXI-bis). La fracción IVbis (proveniente de esta segunda columna) se purificó por TLCp en varios pasos: primero se realizaron dos corridas sucesivas en CHCl₃ y posteriormente, una tercera corrida en CHCl₃- AcOEt (9:1) a frente fluente para obtener en forma separada **AQ1** y **AQ2**.

IV.4.2- Identificación de rubiadina y 1-metil éter de rubiadina

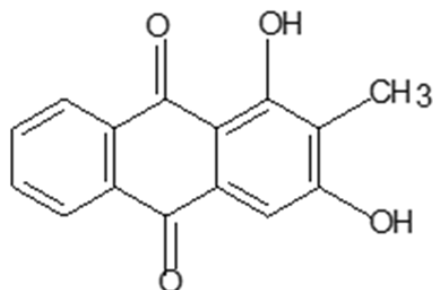
AQ1 y **AQ2** se identificaron siguiendo la metodología descrita por Núñez Montoya (2002). En primer lugar, se identificaron por comparación de sus R_f contra testigo en TLC, específicamente se realizó co-cromatografía en varias FM. En la Tabla 4.11 se muestran sus R_f en las FM utilizadas, que fueron coincidentes con los compuestos estándares.

Tabla 4.11 R_f de las AQs purificadas: Rubiadina (**AQ1**) y 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**)

AQ	R _f x100			Revelado	Testigo
	Ben-AcOEt (8:2)	Ben-MeOH (95:5)	CHCl ₃ -AcOEt (9:1)		
AQ1	95	55	58	Nop/ Nop/ R	rubiadina
AQ2	38	47	80	Op/ Op/ R	1-metil éter de rubiadina

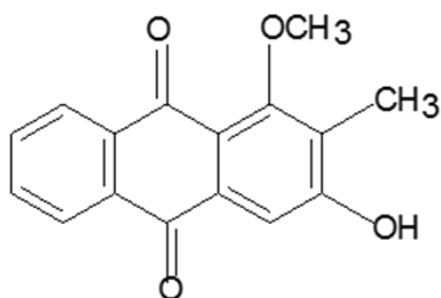
UV: luz UV; UV+NH₃: vapores de NH₃ bajo luz UV; Vis+NH₃: vapores de NH₃ bajo luz visible. Nop: naranja-opaco; Op: opaco; R: rojizo

En la Tabla 4.12 se muestran los datos espectrales (UV-Vis, EM, RMN ¹H y ¹³C) de las AQs purificadas, los cuales fueron coincidentes con los de los testigos (Núñez Montoya, 2002).

Tabla 4.12 Datos espectrales de las AQs purificadas: **(A)** rubiadina (**AQ1**) y **(B)** 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**).**A**

EM-IE m/z (rel.int.)		254 (100)	[M ⁺]		
		236 (7)	[M ⁺ - 18]		
		226 (13)	[M ⁺ - 28]		
		225 (10)	[M ⁺ - 29]		
		208 (5)	[M ⁺ - 18 - 28]		
		197 (12)	[M ⁺ - 28 - 29]		
		180 (7)	[M ⁺ - 18 - 28 - 28]		
		169 (5)	[M ⁺ - 28 - 29 - 28]		
		152 (16)	[M ⁺ - 28 - 29 - 28 - 17]		
		141 (12)	[M ⁺ - 28 - 29 - 28 - 28]		
		115 (18) y			
		105 (11)			
RMN-¹H δ (ppm)	(Acetona-d ₆)	2,30	[3H; s; CH ₃ -2];	8,36	[2H; m; H-5 y 8];
		7,48	[1H; s; H-4];	10,07	[1H; s; OH-2];
		8,01	[1H; m; H-6 y 7];	13,32	[1H; s; OH-1]
	(DMSO-d ₆)	2,05	[3H; s; CH ₃ -2]	8,14	[2H; m; H-5 y 8]
		7,22	[1H; s; H-4]	11,17	[1H; s; OH-2]
		7,89	[2H; m; H-6 y 7]	12,49	[1H; s; OH-1]
RMN-¹³C (DMSO-d ₆) δ (ppm)		C-1	162,45;	C-6	134,38;
		C-1a	108,94;	C-7	134,48;
		C-2	no aparece;	C-8	126,66;
		C-3	162,80;	C-8a	132,97;
		C-4	107,36;	C-9	186,18;
		C-4a	131,69;	C-10	181,74 y
		C-5	126,33;	CH ₃ -2	8,04
		C-5a	132,88;		
IR γ max. (cm-1)		3400 [OH libre]; 2956; 2925; 2848; 1675 [C=O libre]; 1645; [C=O quelado]; 1581; 1451; 1381.			
UV-V λ max (nm). [log ε]	(EtOH)	243,0 [0,13]; 279,0 [0,18]; 315,0 (sh) [0,03] y 411,0 [0,03]			
	(EtOH/MeONa)	240,2 [0,16]; 314,0 [0,17]; 341,0 (sh) [0,07] y 494,0 [0,05]			
	(CHCl ₃)	246,0 [0,57]; 279,0 [0,80]; 333,0 [0,07] y 411,0 [0,14]			

B

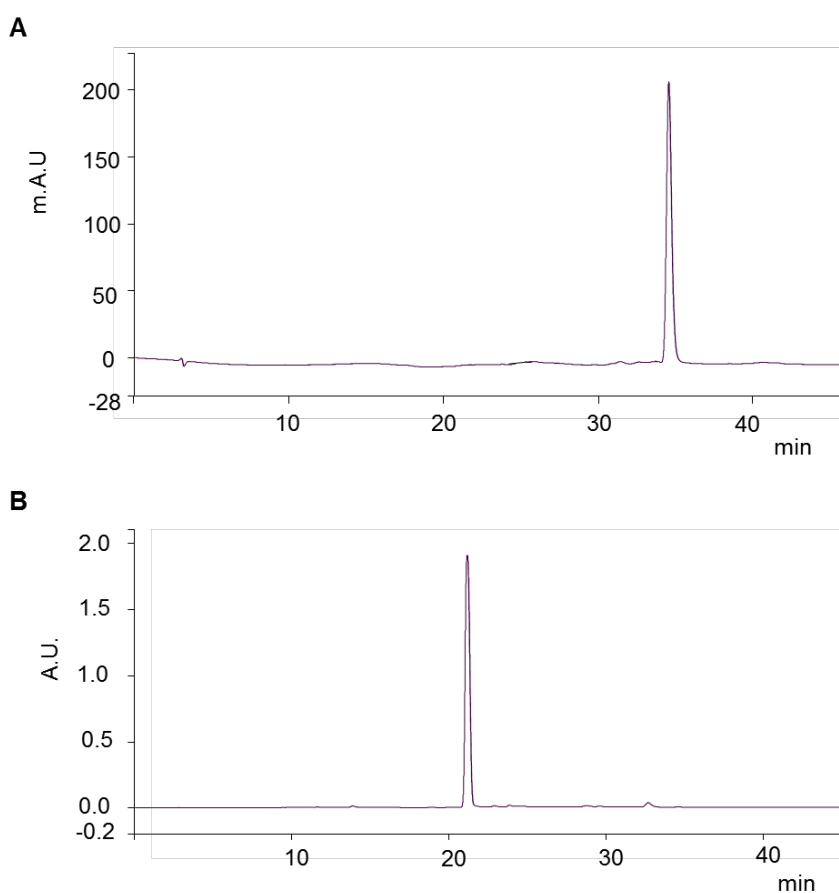


EM-IE m/z (rel.int.)	268 (100)	[M ⁺]		
	253 (52)	[M ⁺ - 15]		
	251 (34)	[M ⁺ - 17]		
	250 (35,5)	[M ⁺ - 18]		
	240 (30)	[M ⁺ - 28]		
	239 (34)	[M ⁺ - 29]		
	223 (18)	[M ⁺ - 17 - 28]		
	222 (22)	[M ⁺ - 18 - 28]		
	212 (7,6)	[M ⁺ - 28 - 28]		
	210 (7)	[M ⁺ - 29 - 29]		
	195 (10)	[M ⁺ - 17 - 28 - 28]		
	194 (14,5)	[M ⁺ - 18 - 28 - 28]		
	181 (20)	[M ⁺ - 29 - 29 - 29]		
166 (10)	[M ⁺ - 17 - 28 - 28 - 29]			
165 (21,6)	[M ⁺ - 18 - 28 - 28 - 29]			
152 (25)	[M ⁺ - 29 - 29 - 29 - 29] y			
139 (16,6)				
RMN-¹H (DMSO-d ₆) δ (ppm)	2,18	[3H; s; CH ₃ -2];	7,90	[2H; m; H-6 y 7];
	3,81	[3H; s; OCH ₃ -1];	8,16	[2H; m; H-5 y 8] y
	7,53	[1H; s; H-4];		OH-3 no aparece.
RMN-¹³C (DMSO-d ₆) δ (ppm)	C-1	160,60;	C-6	133,29;
	C-1a	117,90;	C-7	134,48;
	C-2	126,10;	C-8	126,58;
	C-3	161,57;	C-8a	133,70;
	C-4	108,98;	C-9	182,56;
	C-4a	132,03;	C-10	180,14;
	C-5	125,99;	OCH ₃ -1	60,55 y
	C-5a	134,48;	CH ₃ -2	8,96
IR γ max. (cm ⁻¹)	3316 [OH libre]; 2923; 2854; 1670 y 1648 [C=O libre];			
	1562; 1460; 1374; 1166.			
UV-V λ max (nm). [log ε]	(EtOH)	240,0 [0,38]; 279,0 [0,68]; 330,0 [0,08] y 351,0 (sh) [0,07]		
	(EtOH/MeONa)	245,0 [1,24]; 314,0 [1,22] y 479,0 [0,22]		
	(CHCl ₃)	276,0 [1,78]; 339,0 [0,22] y 360,0 (sh) [0,19]		

Al finalizar la purificación e identificación de ambas AQs, se obtuvo $8,9 \pm 0,2$ mg de **AQ1** y $9,4 \pm 0,2$ mg de **AQ2**. Esto corresponde a un rendimiento de 0,88 % y 0,92 %, respectivamente respecto de la fracción de extracto procesado. Este procedimiento se repitió en la medida que se necesitó más cantidad de estas AQs, para estudiar su actividad antifúngica sobre biofilms de *Candida*.

Se determinó el grado de pureza de las AQs por HPLC-UV-Vis, siguiendo la metodología descrita previamente. La misma fue calculada por el programa del equipo, en base a los cromatogramas obtenidos para cada una (Fig. 4.10). La pureza de **AQ1** fue de $91,9 \pm 0,1$ % y de **AQ2** $94,0 \pm 0,1$ %.

Figura 4.10 Pureza de las AQs ensayadas: (A) rubiadina (**AQ1**) y (B) 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**), determinada por HPLC-UV-Vis.



Habiendo establecido que rubiadina (**AQ1**), una AQ con propiedades fotosensibilizantes (Núñez Montoya *et al.*, 2005), es una de las AQs mayoritarias presente en el extracto que resultó fotoactivo sobre biofilms de *C. tropicalis* (Ben), se

planteó una estrategia de purificación. El propósito fue obtener esta AQ en cantidad necesaria para evaluar su actividad antibiofilm *in vitro* bajo la acción de luz. A su vez, se decidió purificar su derivado metilado, 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**), a fin de correlacionar los efectos fotobiológicos con la diferencia estructural, dada por un grupo metilo en posición 1- (Fig. 1.6).

Dado que los extractos de raíces presentaron mayor contenido de estas AQs, sin presencia de flavonoides y otros pigmentos, especialmente clorofilas, que pudieran interferir en su purificación, la estrategia fue obtener **AQ1** y **AQ2** a partir del extracto Ben de raíces, en donde se encontraron en mayor proporción. Mediante la combinación de cromatografía en columna y TLCp, se logró el aislamiento y purificación de ambas AQs. La identidad se corroboró por sus datos espectrales, especialmente RMN- ^1H y ^{13}C . Con el fin de ser utilizadas en ensayos fotobiológicos, fotoquímicos y/o fotofísicos, se obtuvieron estas AQs con un alto grado de pureza determinado por HPLC-UV-Vis.

IV.5- DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD DE LAS ANTRAQUINONAS

La citotoxicidad de las AQs a ensayar como posibles agentes antifúngicos sobre biofilms, se determinó sobre células Vero, una línea celular eucariota de mamífero que se toma como modelo de célula hospedadora para este tipo de ensayos. El objetivo no sólo fue establecer la CC_{50} para cada AQ, si no conocer las concentraciones en donde la VC es \geq al 90 % (MCNC) o \geq al 80 % (CSubT). De esta manera, se estableció el rango de concentraciones en donde cada AQ puede ser ensayada como agente antifúngico, con baja o nula citotoxicidad sobre una célula eucariota hospedadora.

Los valores de CC_{50} , CSubT y MCNC estimados para cada AQ, se muestran en la Tabla 4.13. Estos valores nos indican que **AQ2** es menos citotóxica que **AQ1**. De esta forma, la presencia de un grupo metoxi (-OCH₃) en lugar de un grupo hidroxilo (-OH) en posición 1, estaría otorgando una menor citotoxicidad a la AQ, lo cual se reflejó en mayores valores de MCNC, CSubT y CC_{50} para **AQ2** (Konigheim *et al.*, 2012b).

Tabla 4.13 Valores de citotoxicidad para rubiadina (**AQ1**) y 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**)

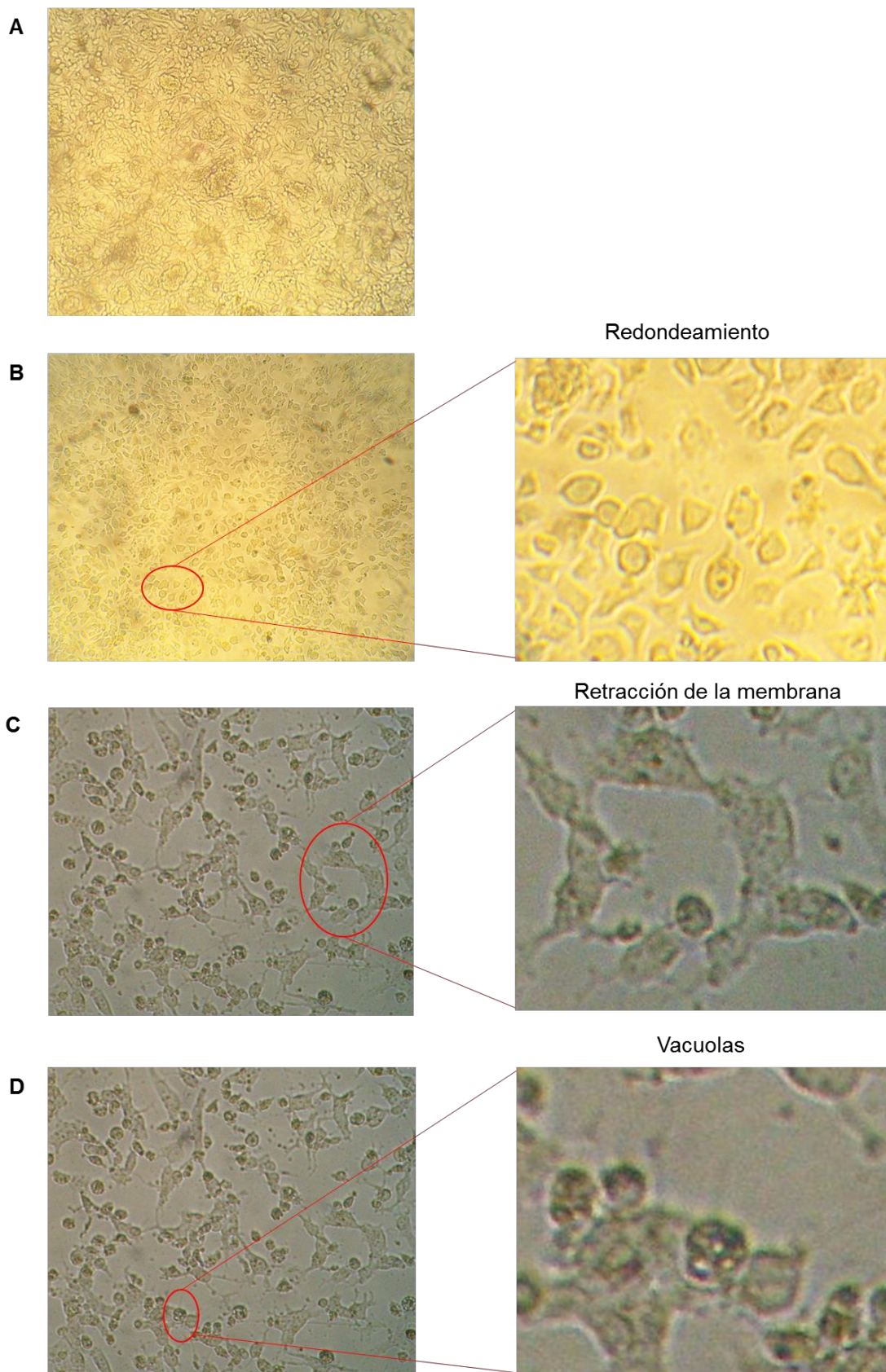
AQ	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CSubT ($\mu\text{g/mL}$)	MCNC ($\mu\text{g/mL}$)
AQ1	14,9 \pm 0,2	8,2 \pm 0,1	5,3 \pm 0,3
AQ2	34,4 \pm 0,2	26,8 \pm 0,1	22,2 \pm 0,4

CC_{50} : Concentración citotóxica al 50% de VC; CSubT: Concentración subtóxica (corresponde al 80% de VC); MCNC: Máxima concentración no citotóxica (corresponde a > 90% de VC)

En la Fig. 4.11, a modo de ejemplo, se puede observar el efecto citopático (EC) causado por **AQ1** en comparación al control celular (CC). Se muestra la monocapa homogénea del CC (**A**), la cual se perdió cuando fue tratada con **AQ1** a la CC_{50} (**B**). En toda la monocapa celular como un efecto masivo se observó la retracción de la membrana con redondo de las células y desprendimiento de las mismas principalmente (**C**).

Mediante el estudio de citotoxicidad en células Vero *in vitro*, se pudo establecer el rango de concentraciones en el cual cada AQ no posee o presenta bajo efecto citotóxico. Este rango quedó limitado por la CSubT y MCNC: para **AQ1** hasta 8,2 \pm 0,1 $\mu\text{g/mL}$ y para **AQ2** hasta 26,8 \pm 0,1 $\mu\text{g/mL}$. Se demostró además, que **AQ1** es más citotóxica que **AQ2**, con un rango de concentraciones menor que **AQ2**.

Figura 4.11 Efecto citopático de rubiadina (**AQ1**) a la CC_{50} (**B, C y D**), comparado con el CC (**A**).



A y B magnificación 40x; C y D magnificación 400x con microscopía óptica de fase invertida. Representativa de 20 campos.

IV.6- ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA FOTOESTIMULADA DE ANTRAQUINONAS AISLADAS DE *H. pustulata* SOBRE BIOFILMS DE *C. tropicalis*

Antes de probar el efecto de las AQs sobre biofilms de *C. tropicalis* se consideró necesario evaluar su actividad sobre las levaduras en forma planctónica. Así, se determinó la CIM y la CIM fotoactiva. El objetivo fue tener un parámetro de concentración a la cual cada AQ podía ser ensayada sobre el biofilm.

IV.6.1- Determinación de la CIM y CIM fotoactiva de las antraquinonas en levaduras planctónicas de *C. tropicalis*

La CIM de rubiadina y 1-metil éter de rubiadina se realizó siguiendo las normas del CLSI en condiciones de luz y oscuridad, explicadas en materiales y métodos, sobre una cepa clínica CRF6 y una cepa de referencia *C. tropicalis* NCPF 3111. Se observó que los valores de CIM resultaron menores bajo la acción de la luz para ambas cepas (Tabla 4.14). La CIM de ambas AQs con irradiación disminuyó 8 veces en la cepa clínica y 2 veces en la de referencia.

Tabla 4.14 Valores de CIM de las AQs en oscuridad e irradiación, determinados según las normas del CLSI y expresadas en µg/mL.

Cepas	AQ1		AQ2		AMB	
	Oscuridad	Irradiación	Oscuridad	Irradiación	Oscuridad	Irradiación
<i>C. tropicalis</i> CRF6	15,6	1,96	250	31,3	0,5	0,5
<i>C. tropicalis</i> NCPF 3111	1,96	0,98	31,3	15,6	0,5	0,5

AQ1: rubiadina; AQ2: 1-metil éter de rubiadina; AMB: anfotericina B

Se utilizó AMB como control positivo para evaluar los resultados obtenidos con las AQs fotosensibilizantes en comparación con un fármaco usualmente usado en la terapia clínica para tratar infecciones fúngicas. Como AMB (control positivo) no es un compuesto fotosensibilizador, se obtuvo el mismo valor de CIM bajo las condiciones ensayadas (luz/oscuridad).

Los resultados muestran que ambas AQs son más activas al ser irradiadas, ya que con menor concentración se obtiene un efecto similar al de oscuridad (100 % de inhibición en el crecimiento de las levaduras). De esta manera, se determinó la CIM fotoactiva para cada AQ, es decir, la concentración en donde la AQ es activada por la luz para producir un efecto antifúngico. De las dos AQs ensayadas, **AQ1** fue más activa sobre ambas cepas (16 veces), al necesitar menos concentración para producir el mismo efecto que **AQ2**, con un valor de CIMf cercano al de la CIM de AMB sobre la

cepa de referencia. Además, la CIMf de ambas AQs está por debajo de la MCNC, excepto para **AQ2** sobre la cepa clínica. Esto significa que a la concentración activa sobre levaduras planctónicas, no se observaría citotoxicidad sobre células Vero.

En función de la CIMf obtenida sobre cada cepa en estado planctónico, se eligieron las concentraciones a ensayar sobre el biofilm (Marioni *et al.*, 2016b).

IV.6.2- Actividad antibiofilm fotoestimulada de rubiadina y su derivado metilado

Cada AQ se ensayó sobre biofilms de *C. tropicalis* a su CIMf, la mitad de ésta (Sub-CIMf) y el doble (Supra-CIMf), incluida AMB (Tabla 4.15).

Tabla 4.15 Concentraciones de las AQs ensayadas sobre biofilms de *C. tropicalis* en oscuridad e irradiación.

<i>C. tropicalis</i> CRF6		<i>C. tropicalis</i> NCPF 3111	
Concentración (µg/mL)	Compuesto	Concentración (µg/mL)	
AQ1			
0,98	Sub-CIMf	0,49	
1,96	CIMf	0,98	
3,92	Supra-CIMf	1,96	
AQ2			
15,6	Sub-CIMf	7,8	
31,3	CIMf	15,6	
62,6	Supra-CIMf	31,3	
AMB			
0,25	Sub-CIM	0,25	
0,5	CIM	0,5	
1	Supra-CIM	1	

AQ1: rubiadina; AQ2: 1-metil éter de rubiadina; AMB: anfotericina B; CIMf: Concentración inhibitoria mínima fotoactiva; Sub-CIMf: CIMf/2; Supra-CIMf: CIMfx2

La Tabla 4.16 muestra la actividad de ambas AQs sobre biofilms de *C. tropicalis* (clínica y referencia), a las tres concentraciones ensayadas. Las dos AQs no fueron activas en oscuridad a las concentraciones probadas. Sin embargo, bajo la acción de la luz se observó un efecto antibiofilm sobre ambas cepas.

Resultados y Discusión

Sobre el biofilm de la cepa clínica, las dos AQs mostraron actividad desde la concentración más baja probada (Sub-CIMf). **AQ1** y **AQ2** redujeron 4,6 y 3,8 veces el biofilm, respectivamente, valores que no son significativamente diferentes entre sí ($p > 0,05$). Además, las dos AQs produjeron la mayor reducción (5,6 veces) a la SupraCIMf: 3,92 µg/mL de **AQ1** y 62,6 µg/mL de **AQ2**.

Sobre el biofilm de la cepa de referencia, el efecto reductor de las AQs comienza recién a la CIMf y a su vez fue menor respecto de la cepa clínica. A esta concentración, **AQ1** redujo 1,8 veces las UBB, y **AQ2** 2,0 veces ($p > 0,05$). Además, sólo **AQ1** logró una mejor reducción del biofilm (2,6 veces) a la SupraCIMf (1,96 µg/mL). Para **AQ2** no se observa un incremento de la actividad la SupraCIMf (31,3 µg/mL) debido probablemente a un efecto de agregación

Tabla 4.16 Cuantificación del efecto de las AQs sobre biofilms de *C. tropicalis* en condiciones de oscuridad e irradiación, expresado en Unidades de Biomasa del Biofilm (UBB).

	<i>C. tropicalis</i> CRF6		<i>C. tropicalis</i> NCPF 3111	
	Oscuridad	Irradiación	Oscuridad	Irradiación
Biofilm no tratado	42,6 ± 6,3	44,5 ± 6,7	45,3 ± 3,7	45,10 ± 1,38
SubCIMf	44,6 ± 7,7	9,6 ± 3,8 ^{##}	46,3 ± 5,0	46,1 ± 3,1
AQ1 CIMf	41,3 ± 1,9	11,8 ± 3,8 ^{##}	45,1 ± 2,9	25,3 ± 4,6 ^{##}
SupraCIMf	35,2 ± 7,3	7,9 ± 1,4 ^{##}	43,5 ± 3,1	16,5 ± 2,0 ^{##}
SubCIMf	43,5 ± 6,2	11,4 ± 1,1 ^{##}	45,49 ± 3,85	44,6 ± 1,7
AQ2 CIMf	40,9 ± 2,1	9,5 ± 2,5 ^{##}	46,57 ± 5,42	23,6 ± 7,8 ^{##}
SupraCIMf	38,5 ± 2,9	7,9 ± 1,6 ^{##}	45,47 ± 2,29	42,2 ± 3,0

AQ1: rubiadina; AQ2: 1-metil éter de rubiadina; CIMf: Concentración inhibitoria mínima fotoactiva; Sub-CIMf: CIMf/2; Supra-CIMf: CIMfx2

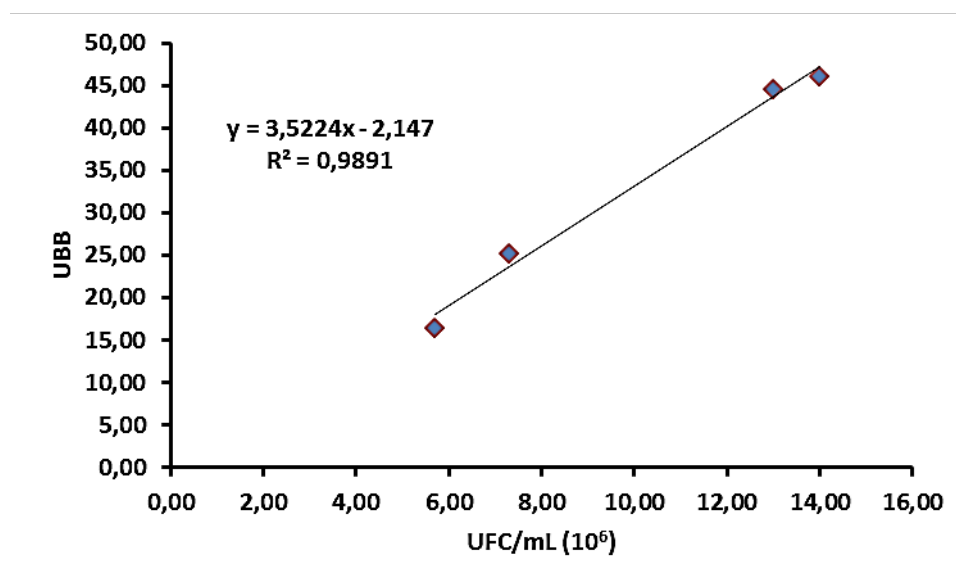
* $p < 0,005$ vs biofilm no tratado; [#] $p < 0,005$ irradiación vs. Oscuridad.

Estos resultados demuestran que **AQ1** es más activa que **AQ2** sobre los biofilms de *C. tropicalis*. Esta AQ requiere una concentración menor que **AQ2** para producir una significativa reducción del biofilm (SupraCIMf): 3,92 µg/mL sobre cepa clínica y 1,96 µg/mL sobre cepa de referencia.

Por su parte, AMB sólo fue activa a la CIM (0,5 µg/mL), produciendo una reducción de 2,5 veces sobre ambas cepas, sin observarse efecto de la luz. Por lo tanto, sobre la cepa clínica, **AQ1** y **AQ2** a la concentración más baja ensayada (SubCIMf), logran una mayor reducción de las UBB que AMB (4,6 y 3,8 veces vs. 2,5 veces). Estos resultados demuestran que bajo irradiación, **AQ1** es más activa que **AQ2** al producir similar nivel de reducción con menos concentración (0,98 µg/mL vs. 15,65 µg/mL); y a su vez, a esa concentración, genera una mayor reducción que AMB (4,6 veces vs 2,5 veces). Sobre la cepa de referencia, solo **AQ1** alcanza una reducción similar a AMB, pero a una concentración mayor (1,96 µg/mL vs 0,5 µg/mL) (Marioni *et al.*, 2016b).

Para demostrar que la disminución en la biomasa obtenida por el ensayo de CV se corresponde con una inactivación del biofilm, se realizó correlación entre el ensayo de CV y UFC/mL. Se observó que las UBB fueron proporcionales a las UFC, demostrando que hubo fotoinactivación del biofilm tratado con las AQs (Fig. 4.12).

Figura 4.12 Correlación entre Cristal Violeta (CV) y UFC/mL



En función de los resultados obtenidos, se observó que la concentración de antifúngico necesaria para disminuir un 50 % las UBB en el biofilm de la cepa de referencia (CIMS-50) fue de 1,23 µg/mL para **AQ1** y 15,6 µg/mL para **AQ2**. Este efecto fue mayor en los biofilms de la cepa clínica, logrando una reducción del 80 % a la misma concentración para **AQ2** (15,6 µg/mL = CIMS-80) y a una menor concentración para **AQ1** (0,98 µg/mL = CIMS-80) (Marioni *et al.*, 2016b).

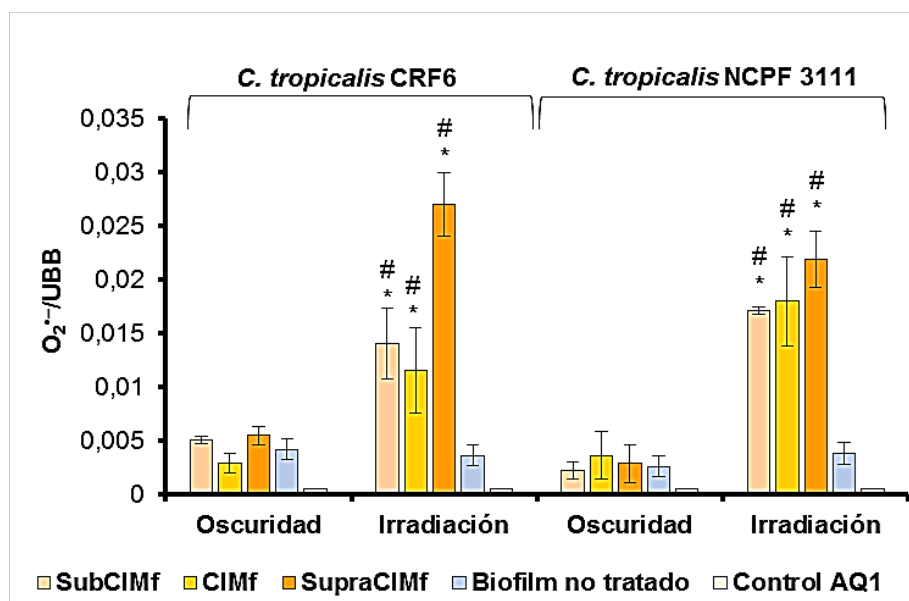
Como las propiedades fotosensibilizantes implican la generación de ERO (Núñez Montoya *et al.*, 2005), esto se evaluó como un factor determinante para

modificar la homeostasis del biofilm. La homeostasis redox tiene un rol fundamental en la supervivencia de las células, aquellas situaciones que provocan un desequilibrio entre la producción de ERO y los niveles de defensas antioxidantes pueden afectar el crecimiento microbiano y la viabilidad microbiana (Mishra y Imlay, 2012; Peralta *et al.*, 2015). Aunque las respuestas adaptativas contra el estrés oxidativo causado por esta sobreproducción de ERO han sido ampliamente estudiados en las células planctónicas, se sabe relativamente poco acerca de las respuestas del biofilm (Arce Miranda *et al.*, 2011; Angel Villegas *et al.*, 2013; Angel Villegas *et al.*, 2015; Peralta *et al.*, 2016) y la base de esta resistencia adquirida aparente se desconoce en la actualidad.

IV.6.3- Efecto de rubiadina sobre la generación de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno en el biofilm

Bajo las condiciones de experimentación (oscuridad e irradiación, a las tres concentraciones ensayadas), la generación de ERO se evaluó midiendo la producción de $O_2^{\bullet-}$ (principal precursor de las demás ERO) a través del ensayo de NBT. La producción de ERN se estudió midiendo indirectamente la formación de $NO\bullet$ con el reactivo de Griess.

Figura 4.13 Producción de $O_2^{\bullet-}$ en biofilms de *C. tropicalis* tratados con rubiadina (AQ1) en oscuridad e irradiación.

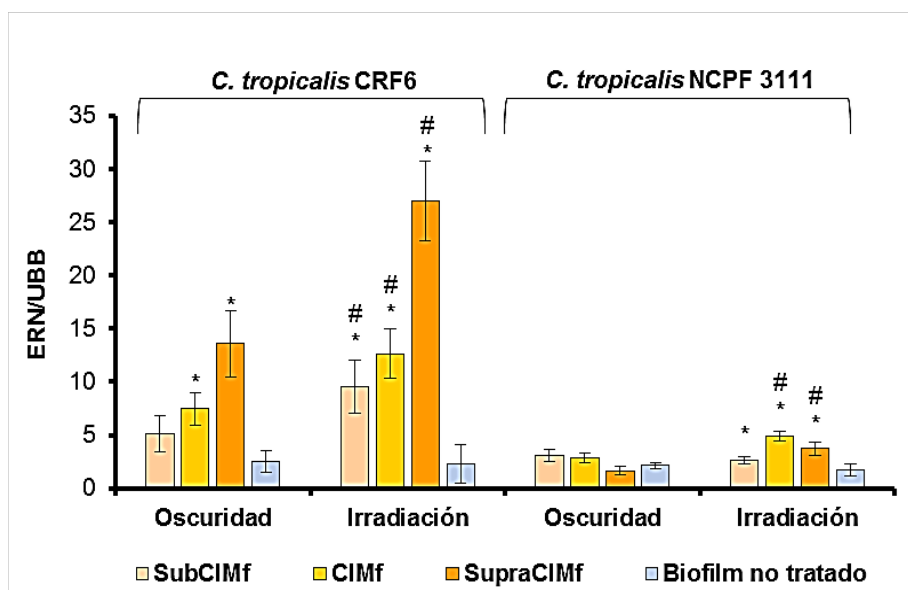


* $p < 0.005$ vs biofilm no tratado; # $p < 0.005$ irradiación vs. oscuridad. Expresada como $O_2^{\bullet-}$ /UBB.

Bajo irradiación, la producción de $O_2^{\bullet-}$ se incrementó significativamente en ambas cepas ($\#p < 0,005$) tratadas con **AQ1**. La mayor producción de $O_2^{\bullet-}$ se generó a la SupraCIMf respecto al biofilm no tratado ($*p < 0,005$) (Fig. 4.13), concentración que produce la mayor reducción del biofilm de ambas cepas (Tabla 4.16).

Dado que se ha demostrado previamente que las ERN promueven la muerte celular y la dispersión del biofilm, se midió la generación de las mismas (Arce Miranda *et al.*, 2011; Barraud *et al.*, 2009). La Fig. 4.14 muestra un aumento de los niveles de ERN en el biofilm de la cepa clínica tratado con **AQ1**, en ambas condiciones experimentales (oscuridad y luz) respecto al control ($*p < 0,005$). Se observó que los niveles de ERN fueron dependientes de la concentración de la AQ. Si bien el aumento de las ERN se produjo tanto en oscuridad como bajo la acción de la luz, en ésta última condición el incremento fue más significativo ($\#p < 0,005$). Por otro lado, en el biofilm de la cepa de referencia, sólo hubo un leve aumento en los niveles de ERN cuando fue irradiado en presencia de **AQ1**, específicamente a la CIM y SupraCIM fotoactivas.

Figura 4.14 Producción de ERN en biofilms de *C. tropicalis* tratados con rubiadina (**AQ1**) en oscuridad e irradiación.



* $p < 0.005$ vs biofilm no tratado; $\#p < 0.005$ irradiación vs. oscuridad. Expresada como ERN/UBB.

Estos resultados explicarían el mayor efecto de **AQ1** sobre la cepa clínica (alrededor del 82 %R a la SupraCIMf), ya que no sólo se observa un incremento de ERO (mediadas por $O_2^{\bullet-}$), sino también un importante aumento de las ERN (mediado por NO^{\bullet}), lo cual es menor sobre la cepa de referencia.

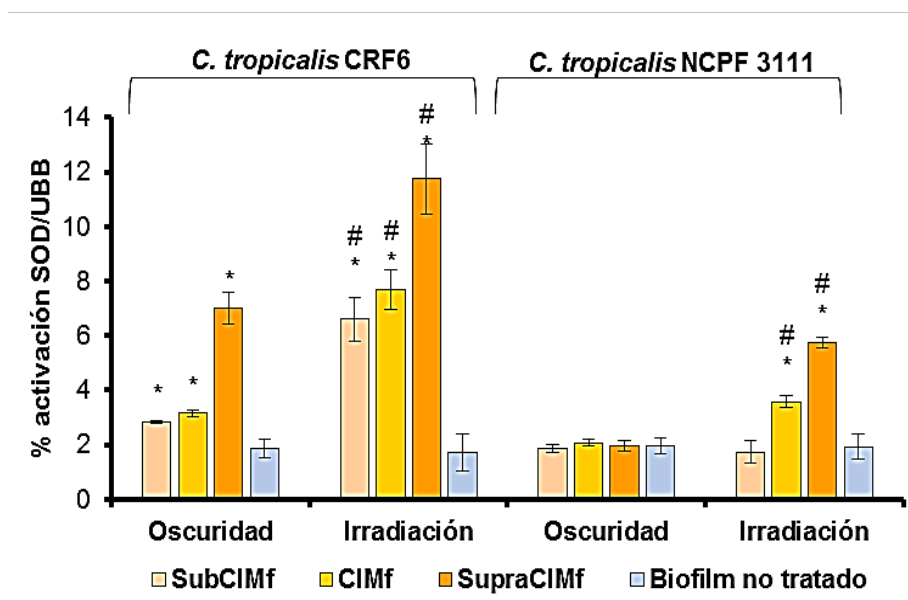
Esto indicaría que **AQ1** generaría estrés oxidativo y nitrosativo sobre el biofilm de la cepa clínica, mientras que sobre la cepa de referencia el estrés oxidativo

predomina sobre el nitrosativo. Como ya se explicó para el extracto bioactivo, una sobreproducción de $O_2^{\bullet-}$ estimula la producción de NO^{\bullet} , especialmente bajo irradiación. Así, el NO^{\bullet} actúa como secuestrante de esta ERO para producir $ONOO^{\bullet}$, una especie altamente reactiva del nitrógeno, a través de una reacción radicalaria más rápida que la reacción enzimática mediada por SOD (Brown *et al.*, 2009; Powers *et al.*, 2011, Marioni *et al.*, 2016b).

IV.6.4- Efecto de rubiadina sobre mecanismos antioxidantes: activación de la enzima SOD y capacidad antioxidante total del biofilm

Se observó una estimulación de la actividad de la enzima SOD cuando los biofilms fueron tratados con **AQ1** bajo irradiación, la cual fue dependiente de la concentración en ambas cepas (Fig. 4.15). En el biofilm de la cepa clínica, se observó estimulación de la activación de la enzima en oscuridad, así como bajo irradiación ($*p < 0,005$). De forma que en oscuridad, esta activación enzimática parecería ser suficiente para contrarrestar el aumento en la producción de $O_2^{\bullet-}$.

Figura 4.15 Activación de la SOD en biofilms de *C. tropicalis* tratados con rubiadina (AQ1) en oscuridad e irradiación.



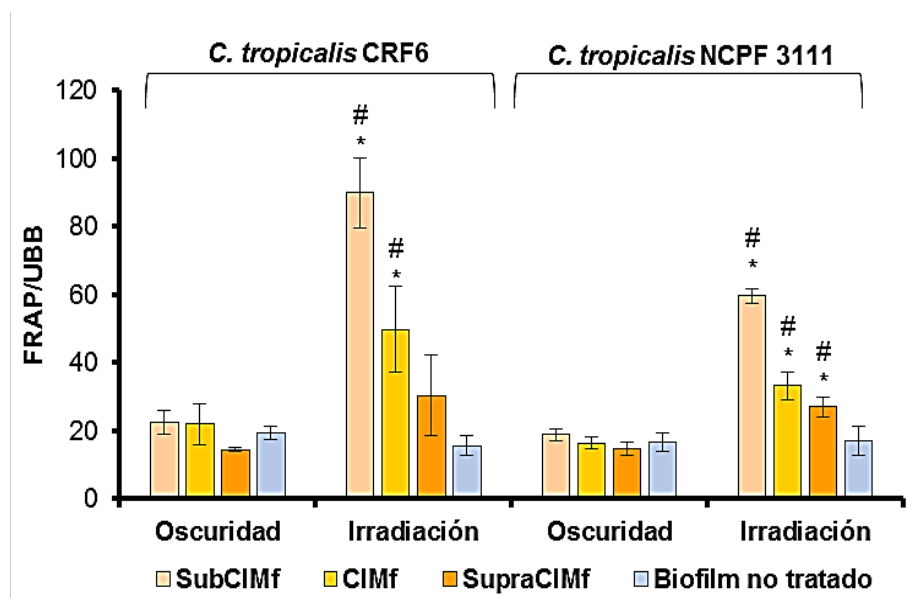
* $p < 0.005$ vs biofilm no tratado; # $p < 0.005$ irradiación vs. oscuridad. Expresada como % activación SOD/UBB.

Bajo irradiación, se observa que la actividad de la SOD fue alta en respuesta a los grandes niveles de $O_2^{\bullet-}$ mostrados anteriormente en la Fig. 4.13, en particular a la SupraCIMf por acción de la luz. En cambio, la actividad enzimática en el biofilm de

C. tropicalis NCPF 3111 se estimuló solamente bajo irradiación, mostrando que la cepa clínica tuvo mejor respuesta antioxidante. Sin embargo, esta activación de la SOD, no sería suficiente para disminuir los niveles de $O_2^{\bullet-}$ generados en la Fig. 4.13.

Además, mediante el ensayo FRAP se evaluó la capacidad antioxidante total del biofilm, tanto enzimática como no enzimática. En los biofilms (cepa clínica y de referencia) tratados con **AQ1**, la capacidad antioxidante solamente se vio incrementada por la acción de luz respecto al control (Fig. 4.16). Además, se observó que a mayores concentraciones de **AQ1**, más bajos son los niveles de FRAP en ambas cepas, probablemente debido a los altos niveles de metabolitos oxidativos y nitrosativos bajo irradiación que no pudieron contrarrestar.

Figura 4.16 Activación de la capacidad antioxidante total en biofilms de *C. tropicalis* tratados con rubiadina (**AQ1**) en oscuridad e irradiación.



* $p < 0.005$ vs biofilm no tratado; # $p < 0.005$ irradiación vs. oscuridad. Expresada como FRAP/UBB.

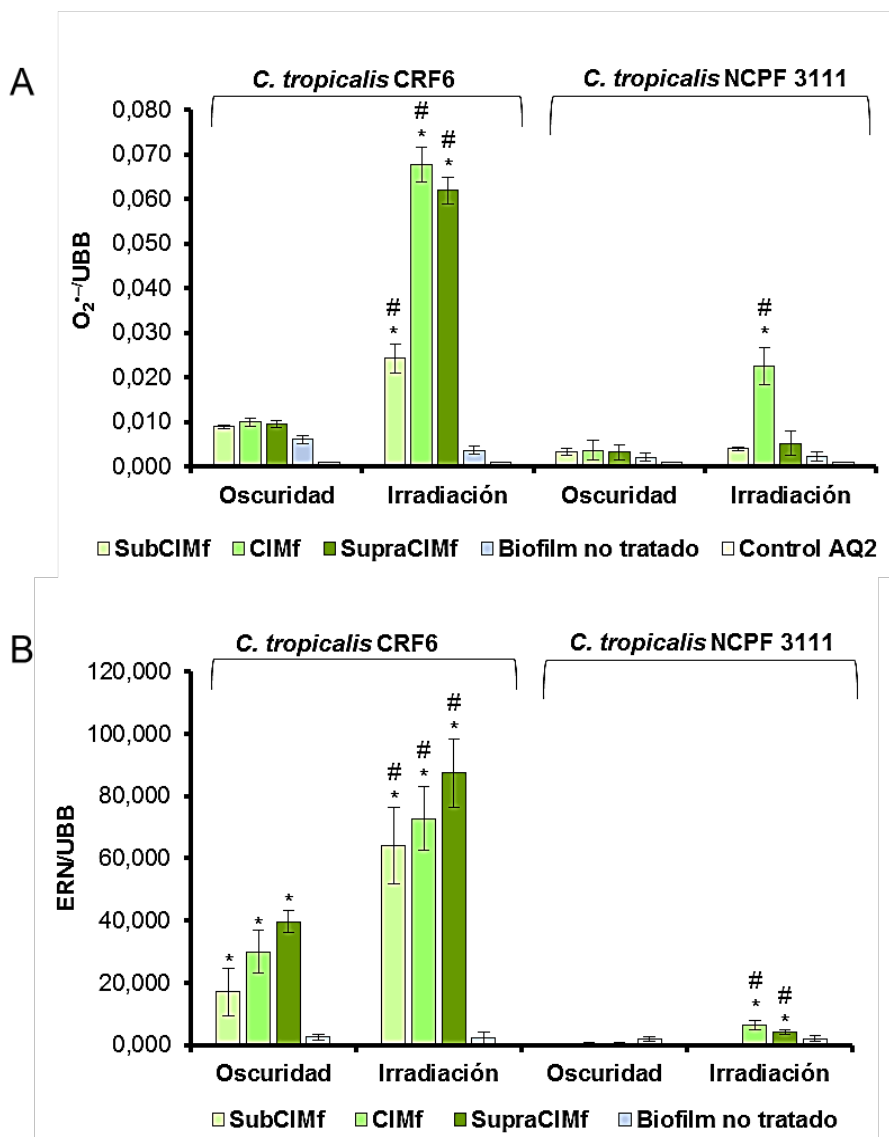
Por lo tanto, la capacidad antioxidante total del biofilm puede no ser suficiente para contrarrestar el estrés celular, lo que resulta en la reducción de las UBB aunque sin alcanzar su erradicación completa por desbalance oxidativo.

IV.6.5- Efecto de 1-metil éter de rubiadina sobre el estrés celular: Desbalance oxidativo y nitrosativo.

AQ2 presentó un comportamiento similar a **AQ1** sobre la producción de $O_2^{\bullet-}$, especialmente a las concentraciones activas en cada cepa. Así, para **AQ2** el mayor

incremento de esta ERO se observó a la CIMf en ambas cepas (Fig. 4.17 A), y este valor se mantuvo a la SupraCIMf en la cepa clínica, coincidiendo que estas concentraciones son las más activas sobre los biofilms de la cepa clínica (Tabla 4.16).

Figura 4.17 (A) Producción de $O_2^{\cdot-}$ en biofilms de *C. tropicalis* tratados con 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) en oscuridad e irradiación. **(B)** Producción de ERN en biofilms de *C. tropicalis* tratados con **AQ2** en oscuridad e irradiación.



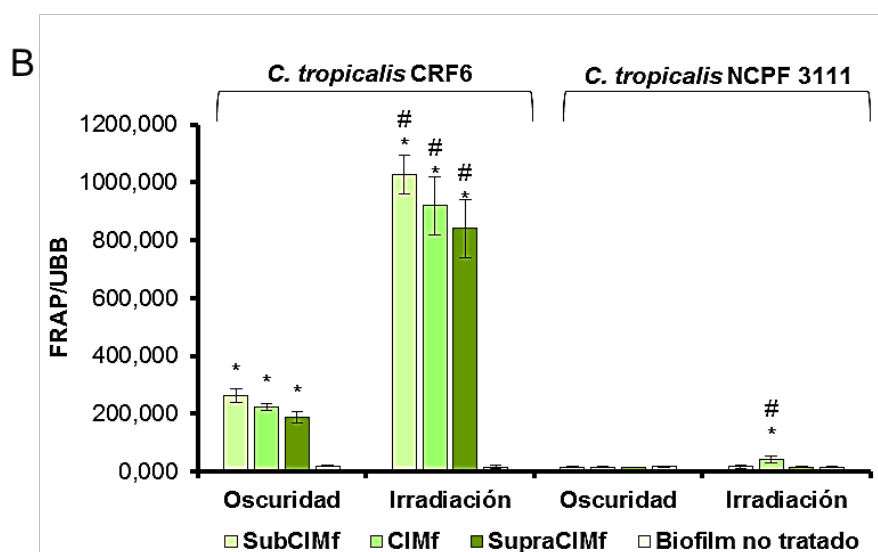
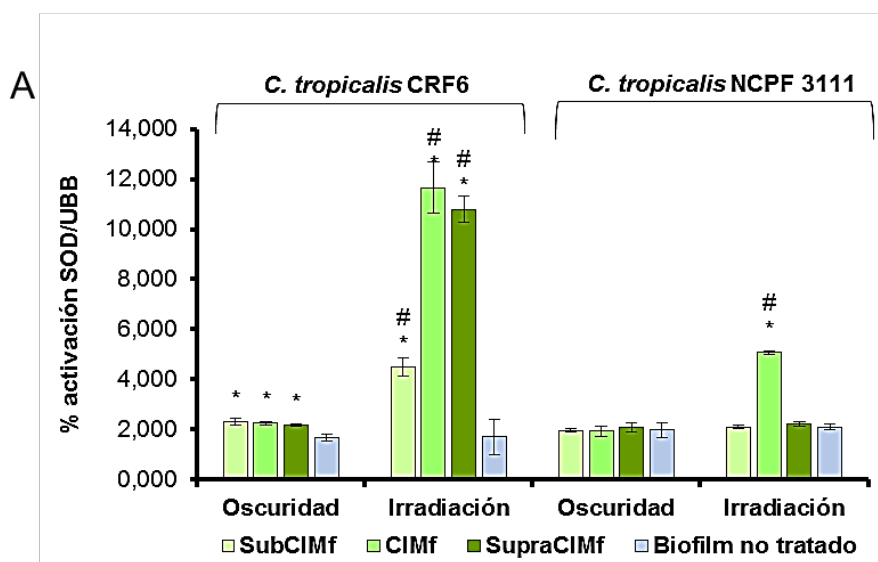
* $p < 0.005$ vs biofilm no tratado; # $p < 0.005$ irradiación vs. oscuridad. (A) Expresada como $O_2^{\cdot-}$ /UBB. (B) Expresada como ERN/UBB.

En cuanto a los niveles de ERN, la Fig. 4.17 B muestra un aumento de éstos en el biofilm de la cepa clínica tratado con **AQ2**, en oscuridad y luz respecto al control (* $p < 0,005$). De la misma forma que para **AQ1**, los niveles de ERN fueron dependientes de la concentración de AQ y bajo la acción de la luz, su incremento fue mayor (# $p < 0,005$). Además, en el biofilm de la cepa de referencia, sólo hubo un leve aumento en los niveles de ERN cuando fue irradiado en presencia **AQ2**,

específicamente a la CIMf fotoactivas. Al igual que para **AQ1**, esto explicaría el mayor efecto de **AQ2** sobre la cepa clínica, donde se observó tanto estrés oxidativo como nitrosativo.

Por otra parte, cuando se estudiaron los sistemas de defensa, **AQ2** generó una leve activación de la SOD en oscuridad cuando el biofilm de la cepa clínica fue tratado con esta AQ (Fig. 4.18 A). Este efecto fue potenciado por la acción de la luz ($p < 0,005$) y se correspondería con los niveles de $O_2^{\bullet -}$ mostrados bajo esta condición.

Figura 4.18 (A) Activación de la SOD en biofilms de *C. tropicalis* tratados con 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) en oscuridad e irradiación. **(B)** Activación de la capacidad antioxidante total en biofilms de *C. tropicalis* tratados con **AQ2** en oscuridad e irradiación.



* $p < 0.005$ vs biofilm no tratado; # $p < 0.005$ irradiación vs. oscuridad. **(A)** Expresada como % activación SOD/UBB. **(B)** Expresada como FRAP/UBB.

En el biofilm de la cepa de referencia, la activación de la SOD sólo ocurrió bajo irradiación a la CIMf, la concentración que resultó activa (Tabla 4.16) y que incrementó los niveles de $O_2^{\bullet-}$ (Fig. 4.18 A).

Además, cuando se estudió la estimulación de la capacidad antioxidante total por **AQ2**, se observó que en el biofilm de la cepa clínica hubo una estimulación en oscuridad, aumentada notablemente con la irradiación (Fig. 4.18 B). Al igual que **AQ1** la activación del sistema antioxidante total fue menor a mayor concentración de la AQ y mayor incremento de las ERO y ERN. Por otro lado, en el biofilm de la cepa de referencia, la capacidad antioxidante sólo se estimuló levemente en irradiación a la CIM, lo que se corresponde con el efecto antibiofilm y el desbalance redox mostrado.

Los resultados obtenidos para **AQ2** también se traducen en una reducción del biofilm que en función de la activación de los sistemas antioxidante no permitió la erradicación de los biofilms, necesitando en el caso de esta AQ mayor concentración que **AQ1** para obtener un efecto similar.

En los biofilms tratados con cada una de las AQs, la producción de $O_2^{\bullet-}$ se incrementó significativamente en ambas cepas bajo irradiación, lo que confirma su acción fotosensibilizante sobre el biofilm. Se observó una diferencia significativa entre las condiciones de oscuridad y de irradiación, con una menor producción de metabolitos de estrés en oscuridad. Cabe notar que ninguna de las **AQs** en solución de CSG y en ausencia de biofilm (Control AQ), produjo incremento de $O_2^{\bullet-}$ en presencia de irradiación. Además, como respuesta a este estrés oxidativo, los niveles de SOD aumentaron significativamente, en particular bajo irradiación.

Por otro lado, el estrés nitrosativo se produce cuando la producción de NO^{\bullet} u otra ERN, aumenta en cantidades importantes. El NO^{\bullet} reacciona con el oxígeno, el $O_2^{\bullet-}$ y agentes reductores para generar otros productos generadores de eventos tóxicos, ya que si sobrepasan la capacidad de la célula para eliminarlos, producen daño irreversible en varios componentes celulares (Hughes, 2008). Se demostró que el biofilm de la cepa clínica genera mayores niveles de NO^{\bullet} respecto al de la cepa de referencia, siendo con **AQ2** más notable esta respuesta (Cuéllar-Cruz *et al.*, 2014). Esto podría estar relacionado con la menor capacidad antioxidante total determinada por FRAP a las concentraciones más activas en este biofilm, ya que otras investigaciones en células eucariotas han indicado que el agotamiento químico de las defensas antioxidantes aumentó significativamente la citotoxicidad del NO^{\bullet} . Además,

altos niveles de defensas antioxidantes no enzimáticas son críticas para la protección celular contra los efectos de las ERN (Ridnour *et al.*, 2004).

Por lo tanto, fue necesario considerar varios factores para comprender el desequilibrio redox en los biofilms de *C. tropicalis*, específicamente para contrarrestar el estrés oxidativo y nitrosativo generado por las AQs. De esta manera, una posible disminución en los niveles de FRAP se estudió como otro factor involucrado en el desequilibrio. Así, el efecto antibiofilm de las AQs podría explicarse por el desequilibrio redox, el cual interfiere en el crecimiento celular y la viabilidad en el interior de los biofilms, desencadenado por la acción de la luz.

IV.6.6- Cuantificación de la biomasa del biofilm y de la producción de especies reactivas del oxígeno intracelular por MCEL

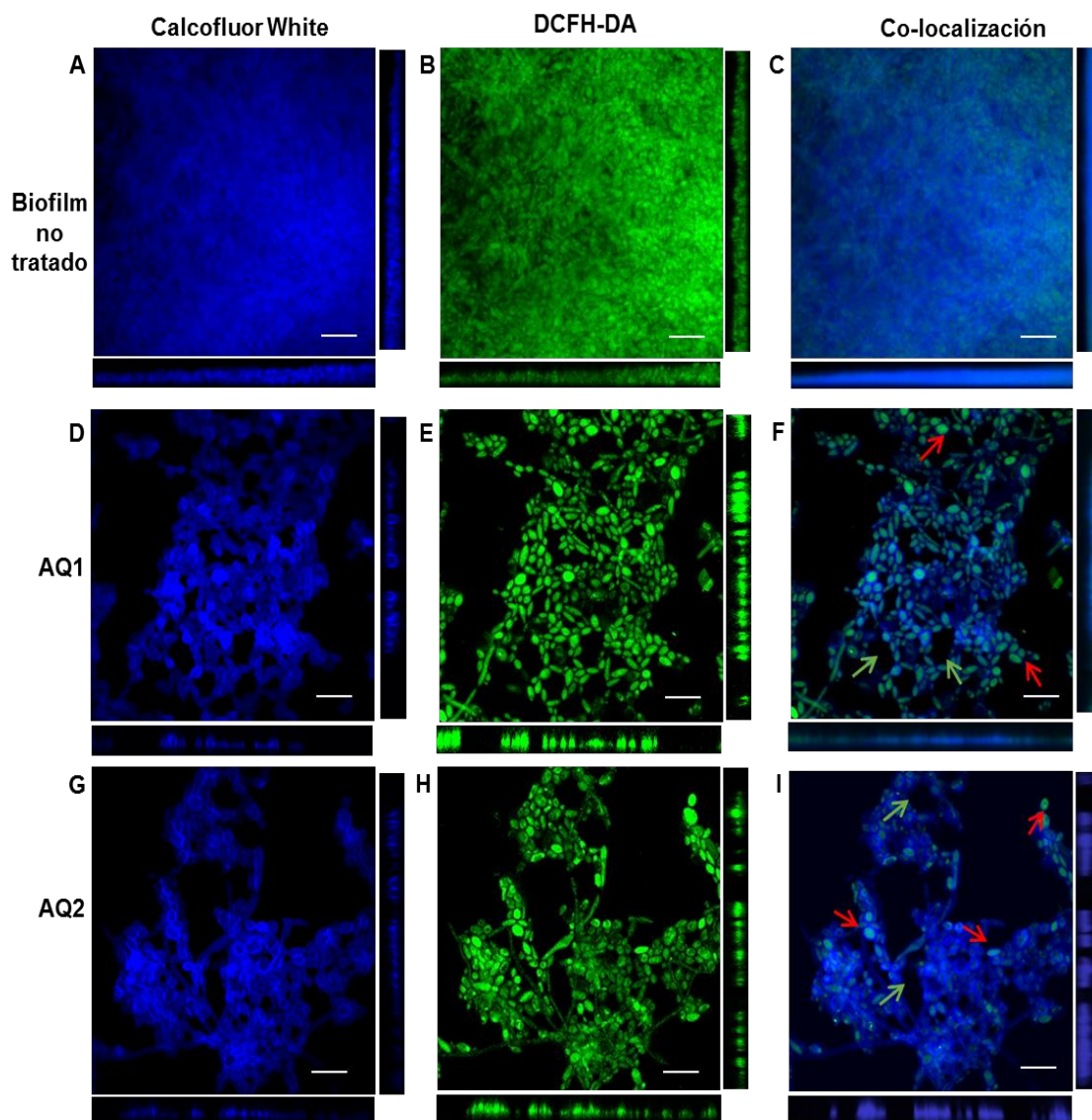
La estructura tridimensional del biofilm se estudió por MCEL, metodología que permitió además cuantificar el espesor del biofilm de *C. tropicalis* tratado con cada AQ, en comparación con el biofilm no tratado. Además, se determinó las ERO generadas en el interior del biofilm.

En las imágenes de MCEL (Fig. 4.19 A, D y G), tanto para los ejes XY (arriba) y XZ (parte inferior), las células sésiles del biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 se tiñeron con Calcofluor-White (azul).

Mediante esta metodología, se evaluó la acción de cada AQ sobre el biofilm, ensayadas a las concentraciones que resultaron más activas bajo irradiación. Se observó que el espesor del biofilm se redujo un 68,8 % por acción de **AQ1** (SupraCIM) (Fig. 4.19 D), y un 53 % por acción de **AQ2** (CIM) (Fig. 4.19 G) en comparación con el control (Fig. 4.19 A, Tabla 4.17). Estos valores fueron similares a los obtenidos por tinción con CV, expresados como reducción de UBB, en donde **AQ1** generó un $63,5 \pm 4,5$ % y **AQ2** un 47 ± 10 % de reducción (Tabla 4.16).

Además, se observó que la rugosidad del biofilm se estaría afectada por el tratamiento por las AQs respecto al control, lo cual muestra una leve heterogeneidad de la biomasa respecto al biofilm no tratado (Tabla 4.17).

Figura 4.19 Imágenes de MCEL de biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 tratados con rubiadina (**AQ1**) y 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) bajo irradiación, incluyendo la visualización de ERO intracelular



El canal azul muestra la tinción de la pared de células sésiles con Calcofluor-White (**A, D y G**); el canal verde muestra la oxidación de la sonda DCFH como un indicador de la producción de ERO dentro del biofilm (**B, E y H**). Co-localización de los dos canales (**C, F e I**). Magnificación 60x y escala 10 μ m. Representativa de 20 campos.

La producción de ERO se observó dentro de las células sésiles, resultando en una alta intensidad de fluorescencia del DCF en los biofilms tratados con **AQ1** y **AQ2** bajo irradiación (Fig. 4.19 E y H, respectivamente), en comparación con el biofilm no tratado (basal) (Fig. 4.19 B). En las Fig. 4.19 C, F e I, se observa la superposición de los dos canales, la tinción de la pared de células sésiles con Calcofluor-White (A, D y G) y la oxidación de la sonda DCFH como un indicador de la producción de ERO dentro del biofilm (B, E y H), cuando las imágenes se fusionaron en una sola imagen de dos colores.

Tabla 4.17: Análisis COMSTAT de biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 tratados con rubiadina (**AQ1**) y 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**).

	AQ1	AQ2	Biofilm no tratado
Biomasa ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)	9,12 \pm 0,40	13,7 \pm 0,4	29,1 \pm 0,7
Coefficiente de rugosidad	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,10	1,0 \pm 0,1
Distribución del espesor (μm)	9,03 \pm 0,40	12,14 \pm 0,40	27 \pm 1

Midiendo las intensidades de fluorescencia de DCF (verde), en función de las células sésiles, se cuantificó la generación de ERO. Este análisis cuantitativo, muestra que ambas AQs incrementaron las ERO dentro de las células, bajo la acción de la luz. Se estableció que la generación de ERO para **AQ1** fue 3 veces mayor respecto al control y 1,5 veces para **AQ2** (Tabla 4.18).

Tabla 4.18: Cuantificación de las ERO intracelular en biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 tratados con rubiadina (**AQ1**) y 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**), expresado en intensidad relativa de fluorescencia.

	Oscuridad	Luz
Biofilm no tratado	0,4 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1
AQ1	0,4 \pm 0,1	1,2 \pm 0,2*#
AQ2	0,41 \pm 0,07	0,60 \pm 0,01*#

* $p < 0.005$ vs biofilm no tratado; # $p < 0.005$ irradiación vs. oscuridad.

IV.6.7- Generación de oxígeno singlete por antraquinonas en solución

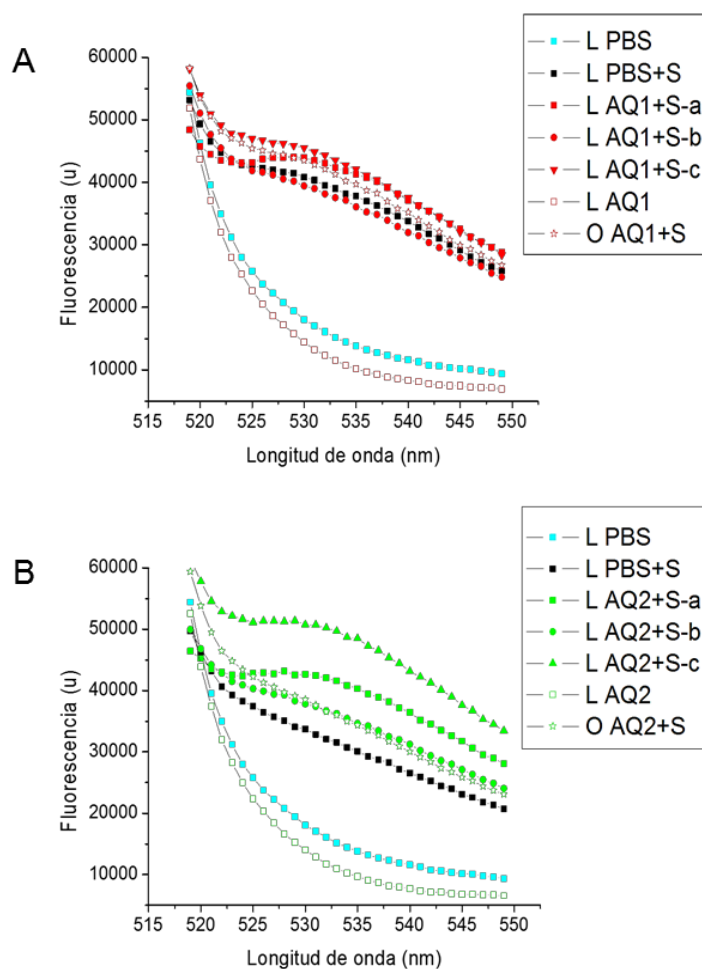
Con el objetivo de estudiar si las AQs ensayadas poseen la propiedad de generar $^1\text{O}_2$ cuando son irradiadas, se utilizó la sonda SOSG. Cada AQ se ensayó a la concentración que resultó más activa sobre el biofilm de *C. tropicalis* NCPF 3111.

En la Fig. 4.20 se muestra la generación de $^1\text{O}_2$ para **AQ1** (Supra CIMf) y para **AQ2** (CIMf) en soluciones de PBS ($n = 3$). Se puede observar que la SOSG en PBS cuando es irradiada reacciona con el $^1\text{O}_2$ del medio, produciendo emisión fluorescente que se tomó como control basal. El medio usado para disolver la sonda y las AQS (PBS) no tuvo emisión al ser irradiado. En cuanto a los controles de cada AQ, se determinó que cada AQ sin sonda e irradiada no emitió fluorescencia; mientras que el control en oscuridad de cada AQ con sonda fue similar a la curva obtenida por la

sonda irradiada. Esto último demuestra que cuando cada AQ no es irradiada en presencia de la sonda, se obtiene la curva del control basal. Al comparar la fluorescencia de cada AQ en presencia de sonda e irradiación, se estableció que la generación de $^1\text{O}_2$ de **AQ1** a $0,98 \mu\text{g/mL}$ fue despreciable ($0,7 \pm 0,4$), mientras que con **AQ2** a $15,6 \mu\text{g/mL}$ fue levemente mayor ($0,9 \pm 0,3$). Sin embargo, se puede ver que en estas condiciones no son grandes generadoras de $^1\text{O}_2$. El uso de perinaftena (PN) como control positivo produjo 100 veces más respecto a la sonda.

Estos resultados muestran que la generación de $^1\text{O}_2$ por ambas Aqs bajo irradiación es muy baja en PBS, destacándose **AQ2**. Por lo tanto, la posibilidad que este mecanismo fotosensibilizante actúe sobre el biofilm es también baja.

Figura 4.20 Generación de de $^1\text{O}_2$ por Aqs: **(A)** rubiadina (**AQ1**) a $1,96 \mu\text{g/mL}$ y **(B)** 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) a $15,6 \mu\text{g/mL}$ en solución de PBS (concentraciones que resultaron más activas sobre biofilms).



L PBS: PBS irradiado; L PBS+S: Sonda en PBS irradiada (basal); L AQ1/AQ2+S: tres mediciones (a, b y c) de cada AQ en PBS irradiada con sonda; L AQ1/AQ2: cada AQ en PBS irradiada sin sonda; O AQ1/AQ2+S: cada AQ en PBS con sonda y en oscuridad

IV.6.8- Incorporación de antraquinonas en biofilms de *Candida*

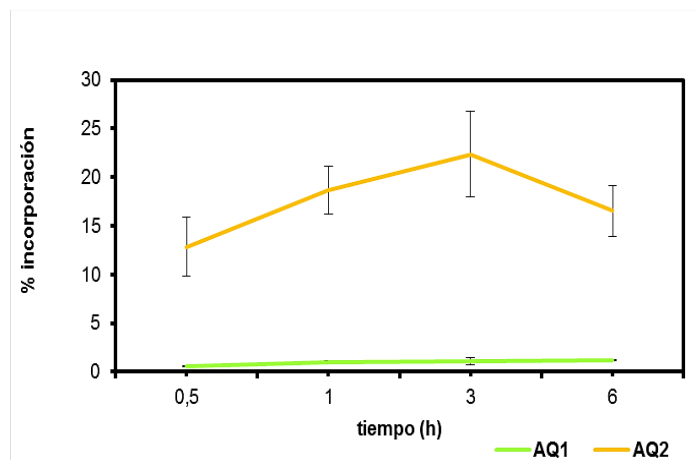
Para estudiar si las AQs ensayadas pueden o no incorporarse al modelo de biofilm utilizado, y estimar además, el porcentaje de las mismas que puede acumularse en esta estructura, se utilizó el método de HPLC previamente descrito y validado. Se eligió esta metodología porque estas AQs han demostrado tener bajo rendimientos cuánticos de fluorescencia en CHCl_3 (Comini *et al.*, 2007).

Las AQs se adicionaron en el biofilm en exceso para no limitar el proceso de incorporación por falta de compuesto en el medio; y su vez, garantizar la detección y cuantificación de cada AQ incorporada al biofilm por el método de HPLC. Teniendo en cuenta la concentración más activa de cada AQ sobre el biofilm de *C. tropicalis* NCPF 3111 (SupraCIMf para **AQ1** y CIMf para **AQ2**), se probaron concentraciones superiores a éstas. Así, **AQ2** se ensayó a 30 $\mu\text{g/mL}$ (2 veces CIMf). En cambio, utilizar el doble de la concentración más activa de **AQ1**, resultaba un valor muy bajo (3,92 $\mu\text{g/mL}$), que al incorporarse al biofilm podía no ser detectado por el método (LOQ = 0,43 $\mu\text{g/mL}$). Por lo tanto, **AQ1** se ensayó a 10 $\mu\text{g/mL}$ (5 veces SupraCIMf). De modo que la acumulación de cada AQ no está limitada por la cantidad inicial agregada; y lo que se incorpora en función del tiempo, se debe a las características lipofílicas de cada AQ y a los mecanismos presentes en el biofilm que posibilitan su acumulación. Estas concentraciones en oscuridad no mostraron actividad antibiofilm *in vitro* durante el período ensayado ($45,16 \pm 2,25$ UBB).

La Fig. 4.21 muestra el porcentaje de incorporación de cada AQ al biofilm, en función del tiempo ensayado. Se estableció que **AQ2** presenta un máximo de incorporación a las 3 h de incubación de $22,4 \pm 4,4\%$, mientras que **AQ1** tiene un bajo porcentaje de acumulación ($1,22 \pm 0,01\%$) hasta las 6 h de incubación.

Esta diferencia observada se debería a que **AQ2** es un compuesto con menor polaridad que **AQ1**, debido a la metilación del grupo OH en posición 1- de rubiadina (Fig. 1.6 en Introducción). Previamente, se ha demostrado la naturaleza no polar de ambas AQs, con valores de LogP de 2,26 para **AQ1** y 2,83 para **AQ2** (Comini *et al.*, 2006). La comparación de estos valores con el valor de LogP de metoprolol, una droga que posee una alta permeabilidad en membranas (95 %) (Kasim *et al.*, 2003), permitió categorizar estos compuestos como fármacos altamente permeables. Si bien, las 2 AQs usadas en este trabajo, tendrían una elevada posibilidad de atravesar membranas biológicas; **AQ2** presentó mayor facilidad para ingresar a la fase lipofílica del biofilm por difusión pasiva.

Figura 4.21 Porcentaje de incorporación en biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 de rubiadina (**AQ1**) y 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) en función del tiempo.



Conocer el porcentaje máximo de incorporación de los compuestos en el biofilm y el tiempo en que se alcanza éste es importante para establecer el momento oportuno en el cual la irradiación tendría un mayor efecto estimulante sobre el FS (Rezusta *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2013). Así, mediante este ensayo se determinó el tiempo requerido por las AQs para alcanzar su máxima incorporación en el biofilm (6h para **AQ1** y 3h para **AQ2**). Esto permite diseñar un tratamiento de irradiación para mejorar la fotoinactivación.

IV.7- ACCIÓN FOTOSENSIBILIZANTE *IN VITRO* DE ANTRAQUINONAS NATURALES SOBRE BIOFILM DE *C. tropicalis*

Con los experimentos realizados, se demostró que las AQs aisladas de *H. pustulata*, **AQ1** y **AQ2**, poseen actividad antifúngica sobre biofilms de *C. tropicalis* sólo si la luz actúa como promotor (Marioni *et al.*, 2016b). Estas AQs producen fotoinactivación del biofilm a través de un desbalance oxidativo que es consecuencia de la producción excesiva de ERO, generadas por mecanismos fotosensibilizantes.

Es conocido que en todo proceso fotodinámico, el FS en estado excitado (en este caso la AQ*), puede interactuar con el oxígeno molecular a través de reacciones de transferencia de electrones y/o hidrógenos (mecanismo fotosensibilizante Tipo I) para generar $O_2^{\bullet-}$, y/o procesos de transferencia de energía (mecanismo fotosensibilizante Tipo II) produciendo 1O_2 . Se demostró que la fotoactivación de estas AQs, resulta en una elevada producción de $O_2^{\bullet-}$ (fotosensibilización Tipo I) que estimula las defensas antioxidantes del biofilm, las cuales a su vez no son suficientes para contrarrestar las ERO generados. Así, se produjo un desbalance redox que sería el responsable de la reducción observada en la biomasa del biofilm (Marioni *et al.*, 2016b).

A pesar que previamente establecimos que **AQ2** en PBS, puede generar un leve incremento en los niveles 1O_2 medido por la SOSG (IV-6.7), no se podría afirmar que estas AQs generarían una concentración suficiente de esta ERO como para tener un efecto antifúngico sobre el biofilm a través de la fotosensibilización Tipo II.

Con el propósito de estudiar los mecanismos fotosensibilizantes de estas AQs sobre biofilms, especialmente el Tipo II, se realizaron una serie de experimentos que incluyen el estudio de algunas propiedades fotofísicas y fotoquímicas de estas AQs.

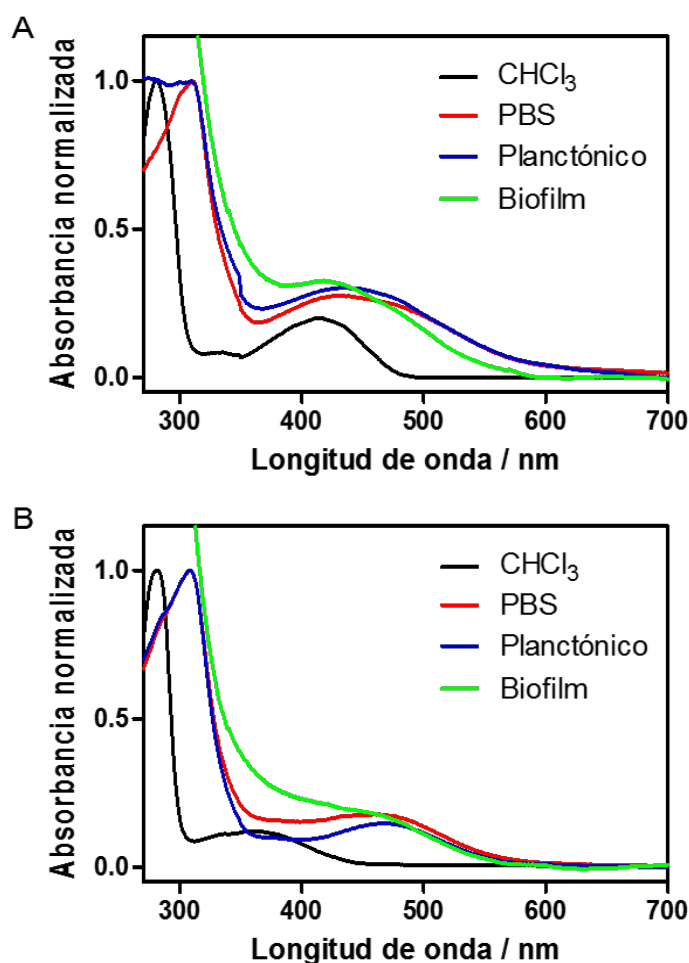
IV.7.1- Medidas espectroscópicas de antraquinonas

A- Espectros de absorción y fluorescencia

Se registraron los espectros de absorción de ambas AQs (56 μ M) en distintos medios: $CHCl_3$, PBS, en presencia de levaduras en estado plantónico ($\sim 10^3$ UFC/mL) y biofilms de *C. tropicalis* ($47,9 \pm 2,6$ UBB) (Fig. 4.22). Se eligió esta concentración porque la absorbancia en PBS fue de 0,2 a 355 nm, de manera que el mismo número de fotones es absorbido por las soluciones de ambas AQS, y en definitiva son estas concentraciones las que se ensayan sobre el biofilm.

Los espectros de absorción de las AQs en PBS y en levaduras en estado planctónico fueron similares, con bandas más anchas y corridas al rojo respecto al espectro de las AQs en CHCl_3 . Los corrimientos son más marcados para **AQ2**. Estos desplazamientos hacia al rojo son debido a la agregación de estas AQs en medio acuoso, siendo agregados de tipo J (producen desplazamientos batocrómicos) (Eisfeld & Briggs, 2006; Gouloumis *et al.*, 2006). Los espectros de las AQs en los biofilms mostraron comportamientos diferentes a los observados en CHCl_3 y PBS, lo cual indicaría que su interacción con el biofilm es preferentemente en zonas apolares, debido al carácter lipofílico de las AQs, y ésta localización favorecería la desagregación (Comini *et al.*, 2006; Gouloumis *et al.*, 2006).

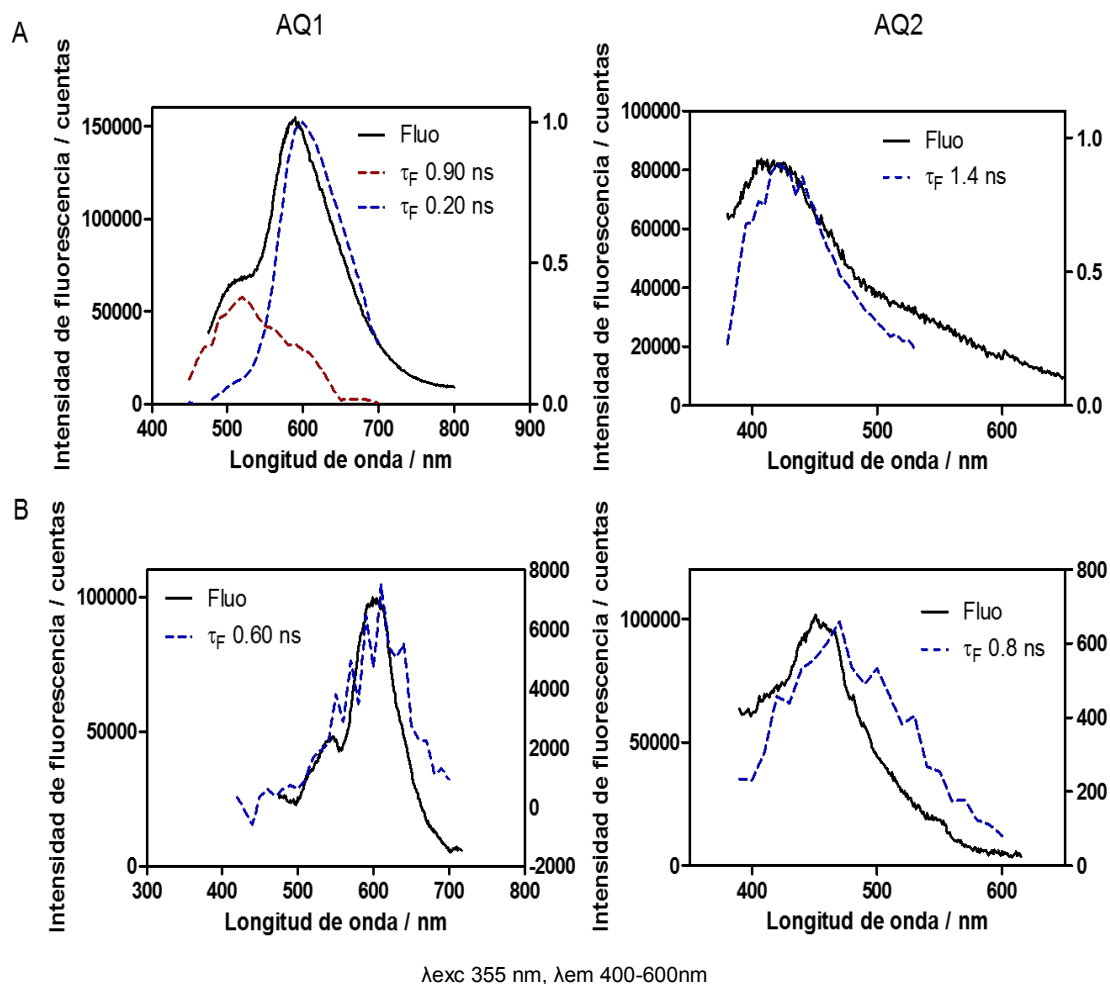
Figura 4.22 Espectros de absorción de AQs en CHCl_3 , PBS, *C. tropicalis* NCPF 3111 en estado planctónico y en biofilm: **(A)** rubiadina (**AQ1**) y **(B)** 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**).



Se registraron los espectros de fluorescencia para las AQs en CHCl_3 y PBS. Se observó que estas AQs son muy poco fluorescentes en estos medios (Fig. 4.23). Aun

así, se pudo determinar el tiempo de vida de fluorescencia de los estados singlete excitado ($^1AQ^*$) para cada una.

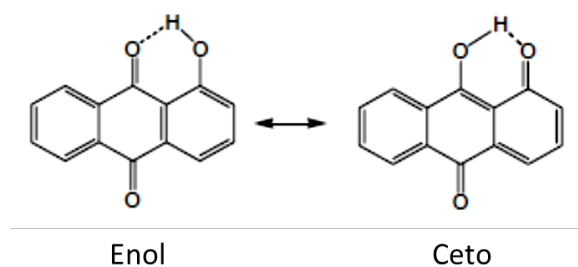
Figura 4.23 Espectros de emisión de fluorescencia de rubiadina (**AQ1**) y 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) en $CHCl_3$ (**A**) y en PBS (**B**).



Para **AQ1** en $CHCl_3$, se observa un decaimiento bi-exponencial, ya que mostró una componente corta de 0,2 ns con una contribución aproximadamente de 2/3 y una componente larga de 0,8 ns (contribución aproximadamente de 1/3) (Fig. 4.23). Esto indicaría que hay dos especies en el estado excitado que se debería a una transferencia intramolecular de protones (ESIPT), entre el grupo hidroxilo en posición 1- y el grupo ceto (Choi *et al.*, 2004). El primer decaimiento (alrededor de 450 nm) sería la fluorescencia del estado excitado de la AQ; y el segundo (alrededor de 600 nm) se debería probablemente a otra especie en estado excitado, en donde hay una transferencia de protón. Este decaimiento bi-exponencial no se observa para **AQ2** porque no es posible el equilibrio ceto-enólico al tener un grupo $-OCH_3$ en posición 1- (Fig. 4.24).

Además este ESIPT en **AQ1** se corrobora porque en PBS, la señal del tiempo de vida de mayor contribución desaparece, ya que en solvente prótico el equilibrio tautomérico está favorecido hacia la forma ceto, dado el puente hidrógeno se forma con el medio (Palit *et al.*, 1990; Smulevich *et al.*, 1987).

Figura 4.24 Proceso de transferencia intramolecular de protones en el estado excitado (ESIPT) de 1-hidroxi antraquinona.



Dados que se trata de compuestos débilmente fluorescentes, no fueron determinados sus rendimientos cuánticos.

Sabiendo que la *Candida* exhibe fluorescencia por si misma (Graham, 1983), estas mediciones no se realizaron en presencia de levaduras en estado planctónico y formando biofilms.

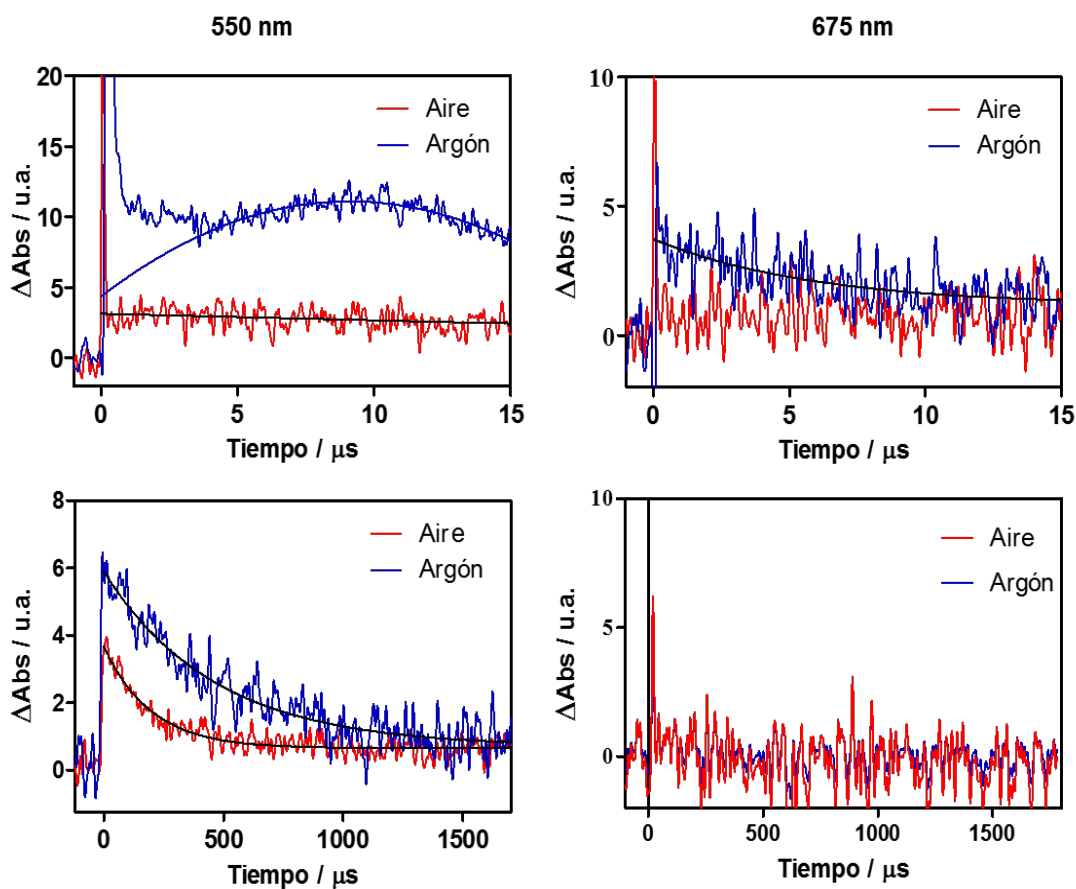
B- Absorción de estados transitorios

Mediante espectroscopia de absorción transitoria, se estudió la formación del estado triplete ($^3AQ^*$) y el anión radical ($AQ^{\bullet-}$) de cada AQ, en $CHCl_3$, PBS, levaduras en estado planctónico ($\sim 10^3$ UFC/mL) y formando biofilm ($47,9 \pm 2,6$ UBB). Las longitudes de onda correspondientes para detectar cada estado transitorio de las AQS fueron: 675 nm para $^3AQ^*$ y 550 nm para $AQ^{\bullet-}$ (Shida, 1998).

Para **AQ1** no fue posible detectar ningún estado transitorio en ninguno de los sistemas anteriores.

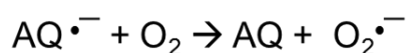
Para **AQ2** se detectaron señales importantes del $AQ^{\bullet-}$ solo en solución de $CHCl_3$ (Fig. 4.25).

Figura 4.25 Absorción de los estados transitorios de 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) en soluciones de CHCl_3 saturadas con argón y aire, tomadas a dos longitudes de onda.



Las señales tomadas a 550 nm corresponden a $\text{AQ}^{\bullet-}$, mientras que las señales a 675 nm corresponden a ${}^3\text{AQ}^*$.

Los resultados muestran que en solución de CHCl_3 saturada con argón, el radical anión de **AQ2** se genera con un tiempo de vida de $4 \mu\text{s}$ y desaparece con un tiempo de $450 \mu\text{s}$. Cuando se introduce O_2 al sistema (CHCl_3 saturado de aire), este radical anión se forma con un tiempo de vida inferior al tiempo de resolución del equipo ($<100 \text{ ns}$) y desaparece con un tiempo de $150 \mu\text{s}$. Esto indica que tanto la formación como la desaparición del $\text{AQ}^{\bullet-}$ están afectadas por la concentración de O_2 . Se propone que la especie $\text{AQ}^{\bullet-}$ se forma parcialmente a partir del ${}^3\text{AQ}^*$, ya que en presencia de oxígeno en el medio se observa una desactivación parcial, pero no total del transitorio atribuible al $\text{AQ}^{\bullet-}$. Y esto permitiría la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$, siguiendo la reacción característica del mecanismo fotosensibilizante Tipo I:

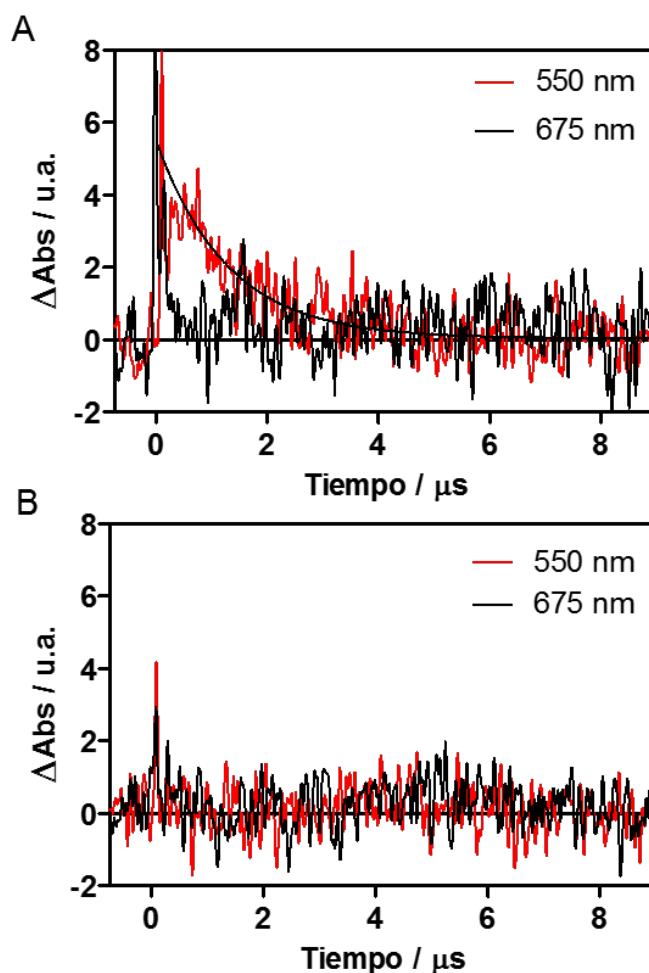


En concordancia con las observaciones anteriores, el $^3\text{AQ}^*$ decayó con un tiempo de vida similar ($5 \mu\text{s}$), en soluciones saturadas de argón y también desapareció cuando se dejó el oxígeno en el sistema.

Cuando se realizaron estos mismos experimentos en PBS, únicamente se pudieron observar transitorios débiles a 550 y 675 nm, los cuales vivieron aproximadamente $1 \mu\text{s}$ en ambas longitudes de onda. Además, el oxígeno no tuvo efecto en su cinética de decaimiento. Estos transitorios se atribuyen a las especies agregadas, las cuales parecen que prácticamente no interactúan con el $^3\text{O}_2$.

En suspensiones de levaduras en estado planctónico, sólo se observó un transitorio débil a 550 nm ($\text{AQ}^{\bullet-}$) ($1,7 \mu\text{s}$) (Fig. 4.26).

Figura 4.26 Absorción de los estados transitorios de 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) en suspensiones de levaduras saturadas con aire (**A**) y control de levaduras (**B**).

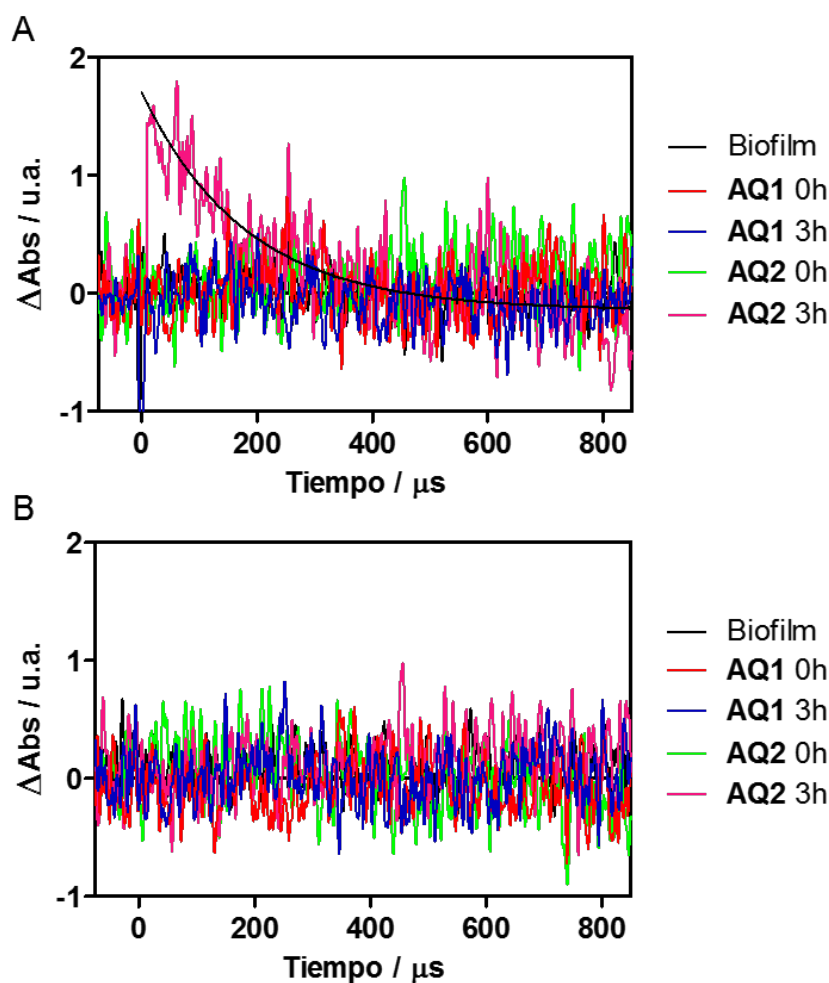


Las señales tomadas a 550 nm corresponden a $\text{AQ}^{\bullet-}$, mientras que las señales a 675 nm corresponden a $^3\text{AQ}^*$.

En los biofilms, el $AQ^{\bullet-}$ pudo detectarse sólo cuando se incubaron durante 3 h (Fig. 4.27), observándose un tiempo de vida de 170 μ s. Esto estaría correlacionado con los resultados obtenidos en los ensayos de incorporación, donde a tiempo 0, la AQ se encontraría agregada en PBS y no da una señal apreciable; mientras que cuando se va incorporando a las partes internas del biofilm (22 % a las 3 h), se iría desagregando y consecuentemente aumentaría su capacidad para formar el $AQ^{\bullet-}$.

No se observa la presencia del ${}^3AQ^*$ en biofilms como se observó en las mediciones de absorción transitoria anteriores (Fig. 4.27). La falta de evidencia de la presencia de ${}^3AQ^*$ en biofilms, podría explicarse por la baja sensibilidad de la técnica para la medición en biofilms (reducción de la sensibilidad por un factor 10, comparar eje y de las Fig. 4.25 y 4.27).

Figura 4.27 Absorción de los estados transitorios de rubiadina (**AQ1**) y 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) en biofilms saturados de aire a $t = 0$ y luego de 3 horas de incubación. Las señales tomadas a 550 nm (**A**) corresponden a $AQ^{\bullet-}$, mientras que las señales a 675 nm (**B**) corresponden a ${}^3AQ^*$.



IV.7.2- Determinación de oxígeno singlete

La detección de la luminiscencia resuelta en el tiempo en el IR cercano es una técnica altamente sensible para estudiar el proceso de fotosensibilización por $^1\text{O}_2$ (Tipo II), ya que esta ERO se puede monitorear directamente a través de su fosforescencia a 1275 nm (Jimenez-Banzo *et al.*, 2008; López- Chicón *et al.*, 2012; Snyder *et al.*, 2006; Ragás *et al.*, 2010). Se observaron señales de $^1\text{O}_2$ para **AQ1** y **AQ2** en CHCl_3 y PBS. Los rendimientos cuánticos de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ) en PBS fueron bajos: $\Phi_\Delta < 0,01$ para **AQ1** y $\Phi_\Delta = 0,02$ para **AQ2**. Los valores en CHCl_3 ya fueron informados por Núñez Montoya *et al.* (2005).

Las señales de luminiscencia también se obtuvieron para las levaduras en estado planctónico ($\sim 10^3$ UFC/mL) y formando biofilm ($47,9 \pm 2,6$ UBB) (Φ_Δ aparentes). En la Fig. 4.28 y 4.29 se muestran las señales obtenidas para el cultivo planctónico y el biofilm, respectivamente. Estas señales se han asignado a la fosforescencia del $^1\text{O}_2$ por su distribución espectral (desaparición de la señal a 1325 nm, en donde el $^1\text{O}_2$ casi no muestra fosforescencia), y por el incremento del tiempo de vida del decaimiento cuando se incubaron las levaduras en medios deuterados (el $^1\text{O}_2$ vive más en medios deuterados, ya que su decaimiento no radiativo es menor) (Snyder *et al.*, 2006, Ogilby, 1982).

Para las levaduras en estado planctónico, se detectó una señal débil de $^1\text{O}_2$ cuando fueron incubadas con las AQs en PBS (Fig. 4.28), la cual se incrementó cuando las levaduras se incubaron con PBS-d (Tabla 4.19). Podría estar sucediendo que la producción de $^1\text{O}_2$ ocurra con un rendimiento cuántico apreciable, pero que la desactivación química o física de la especie sea muy alta, y consecuentemente su detección no sea apreciable. Esto explicaría la baja intensidad de la señal de $^1\text{O}_2$ en ambos medios, ya que sólo se detecta el $^1\text{O}_2$ que no ha sido desactivado. A su vez, el incremento de esta señal en PBS-d, estaría indicando que el transiente $^3\text{AQ}^*$ realmente se forma para ambas AQs, aun cuando este transiente no fue capaz de producir una señal (Fig. 4.26). Por medio de la comparación de las señales de fosforescencia, se observó que para **AQ2** éstas son mayores que para **AQ1**, tanto en PBS como en PBS-d (1,6 y 1,3 veces respectivamente).

Figura 4.28 Cinética del $^1\text{O}_2$ para (A) rubiadina (AQ1) y (B) 1-metil éter de rubiadina (AQ2) en levaduras de *C. tropicalis* NCPF 3111 en PBS y en PBS-d, observada a 1275 nm y a 1325 nm (control negativo).

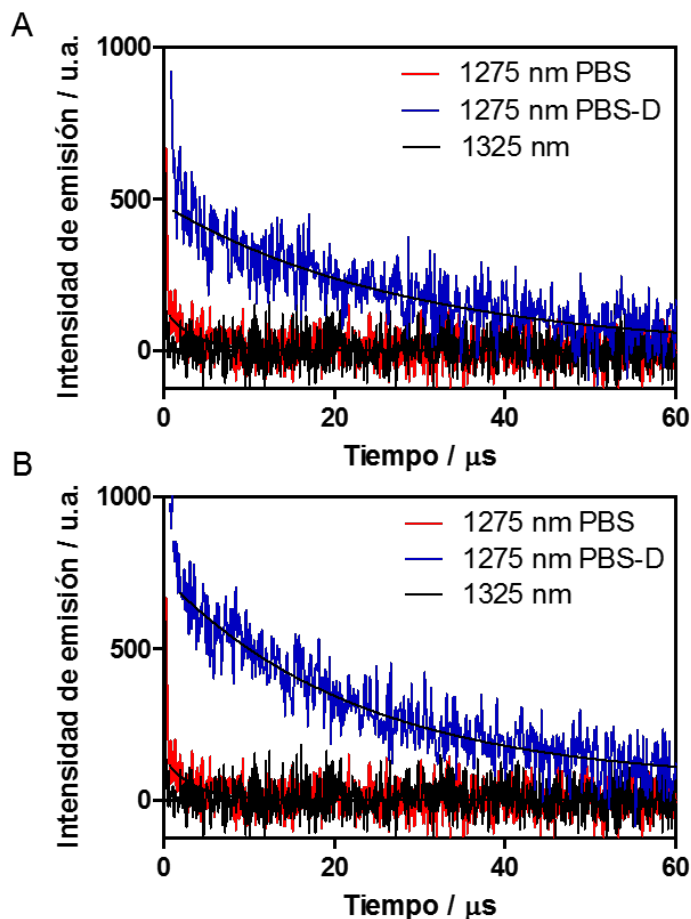


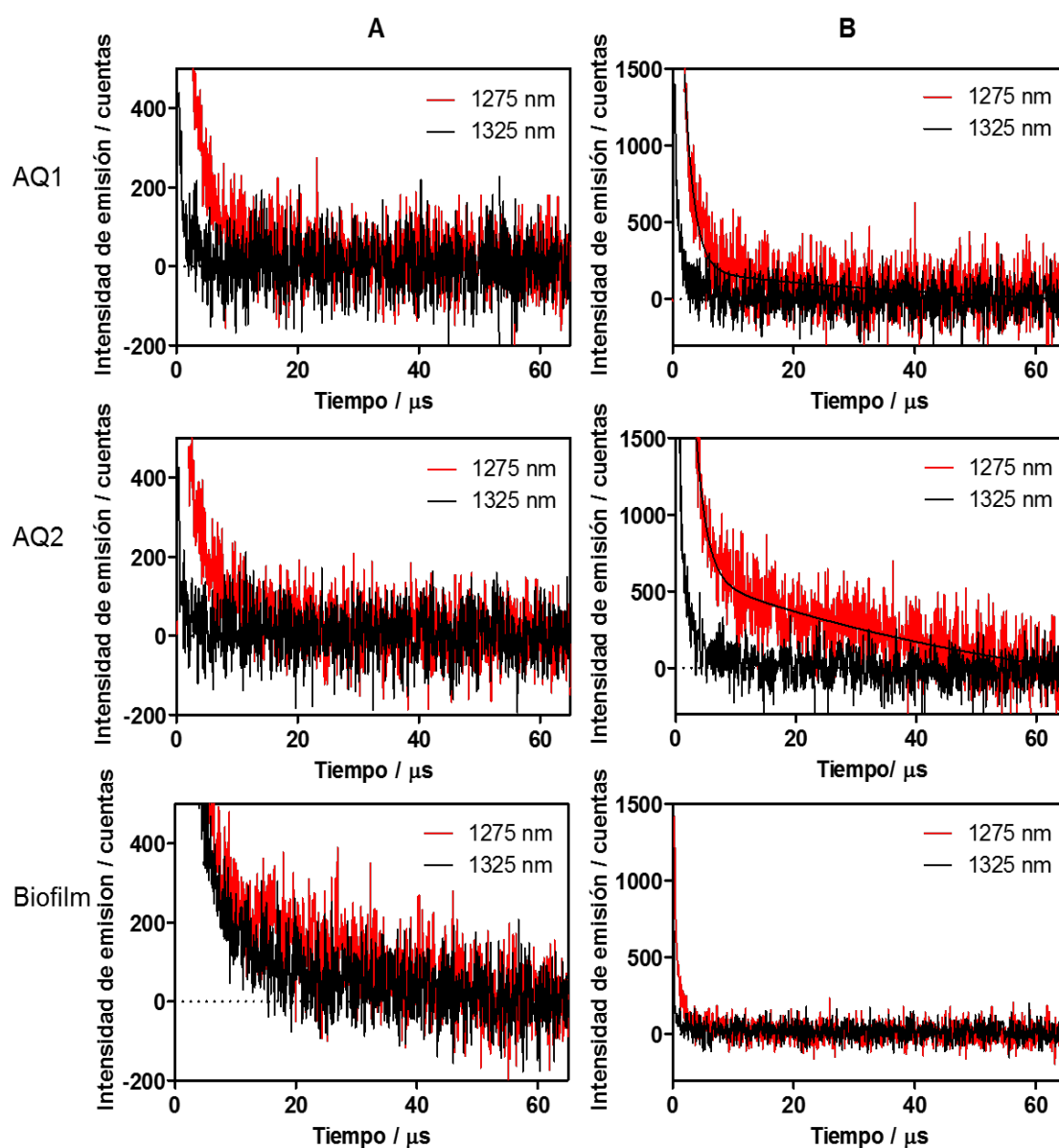
Tabla 4.19 Producción de $^1\text{O}_2$ de rubiadina (AQ1) y 1-metil éter de rubiadina (AQ2) en levaduras en forma planctónica de *C. tropicalis* NCPF 3111 en PBS y PBS-d.

AQ	PBS		PBS-d	
	Intensidad de emisión	Tiempo de vida (μs)	Intensidad de emisión	Tiempo de vida (μs)
AQ1	114	3,4	193	28,5
AQ2	460	5	623	23,4

Para las levaduras en estado de biofilm, no se pudo detectar la emisión de $^1\text{O}_2$ cuando las AQs se incubaron en PBS (Fig. 4.29 A). En cambio, en PBS-d se observó la fosforescencia atribuible a $^1\text{O}_2$ con un tiempo de vida de 56 μs para AQ1 y 64 μs

para **AQ2** (Fig. 4.29 B). Para los biofilms, además de la desactivación que puede estar afectando a la producción de $^1\text{O}_2$, se suma el estado fisiológico de las células que forman el biofilm que podría afectar la disponibilidad de $^3\text{O}_2$ necesario para generar esta ERO. Sin embargo, es necesario destacar que el comportamiento de las AQs en el biofilms fue similar al observado en las levaduras en forma planctónica. Por otro lado, se observó que en la primera parte del decaimiento hay una fuerte dispersión de la señal (Fig. 4.29 B), que en general está asociada a las muestras que no son transparentes y que no se debería a $^1\text{O}_2$.

Figura 4.29 Cinética del $^1\text{O}_2$ de rubiadina (**AQ1**) y 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) en biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 en PBS (**A**) y en biofilms incubados con PBS-d (**B**), observada a 1275 nm y a 1325 nm (control negativo).



Por lo tanto, las señales de $^1\text{O}_2$ confirmarían que se genera el estado $^3\text{AQ}^*$, pero su concentración es demasiado pequeña para producir una señal de absorción transitoria. Mediante la comparación de la intensidad de las señales de fosforescencia de las dos AQs, es evidente que para **AQ2** se detecta una señal de $^1\text{O}_2$ aproximadamente tres veces mayor que para **AQ1** en el biofilm de *C. tropicalis* (Fig. 4.29 B).

Si bien en los experimentos en medios biológicos se detectó la señal de $^1\text{O}_2$, no se pudo estimar los valores de rendimiento cuántico, ya que la principal desventaja es su baja sensibilidad. Se estima que el rendimiento cuántico de fosforescencia del $^1\text{O}_2$ en medios biológicos es inferior a 10^{-6} (Snyder *et al.*, 2006); lo cual unido a los bajos rendimientos de los detectores en esta región dificultan su cuantificación. Sin embargo, la principal ventaja de esta técnica es la selectividad, ya que en esa región del IR cercano prácticamente ninguna otra especie emite fosforescencia.

A pesar que no se pudo detectar el estado $^3\text{AQ}^*$ para ambas AQs en el biofilm, se pudo demostrar indirectamente que este estado transitorio se genera. Esto debido principalmente, a que se detecta una leve generación de $^1\text{O}_2$ para ambas AQ en los biofilms con PBS-d, siendo esta producción más significativa para **AQ2** (Fig. 4.29 B). Además, el estado $^3\text{AQ}^*$ se detectó brevemente para **AQ2**, solo en soluciones de CHCl_3 saturadas con argón (Fig. 4.25). Asimismo, en el biofilm se detectó el transitorio $\text{AQ}^{\bullet-}$ para **AQ2**, luego de 3 h de incubación. A pesar que el $\text{AQ}^{\bullet-}$ para **AQ1** no pudo ser detectado, los bajos valores de $^1\text{O}_2$ medidos en el biofilm para ambas AQs, sugieren que el $^3\text{AQ}^*$ que se estaría generando se deriva principalmente en la formación del $\text{AQ}^{\bullet-}$. Por lo tanto, la reacción de esta especie transitoria con el oxígeno molecular para generar $\text{O}_2^{\bullet-}$ sería predominante (mecanismo fotosensibilizante Tipo I).

IV.7.3- Efecto de secuestrantes/desactivantes de especies reactivas del oxígeno en la fotoinactivación de biofilms fúngicos

Cuando los biofilms fueron tratados con las AQs a la concentración utilizada para estudiar los estados transitorios y la generación de $^1\text{O}_2$ ($56 \mu\text{M}$), las UBB se redujeron 3,3 veces por acción de **AQ1** y 2,6 veces para **AQ2** bajo irradiación (Tabla 4.20). Esta concentración testeada corresponde a la concentración activa de **AQ2** sobre el biofilm de *C. tropicalis* (CIMS-50), y es una concentración superior a la más activa de **AQ1** (7,9 veces). Se puede observar, que ambas AQs tuvieron una actividad similar, alrededor del 65 %R ($p > 0,05$ cuando se compararon ambas AQs).

Tabla 4.20 Actividad antibiofilm *in vitro* de las Aqs, ensayadas a 56 μM bajo oscuridad e irradiación, expresada en UBB.

Condición	OSCURIDAD	IRRADIACIÓN
AQ1	54,5 \pm 3,1	17,8 \pm 3,8
AQ2	50,1 \pm 6,3	22,3 \pm 7,8
Biofilm no tratado	56,9 \pm 6,9	58,5 \pm 4,5

* $p < 0,05$ cuando rubiadina (**AQ1**) se comparó con 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**).

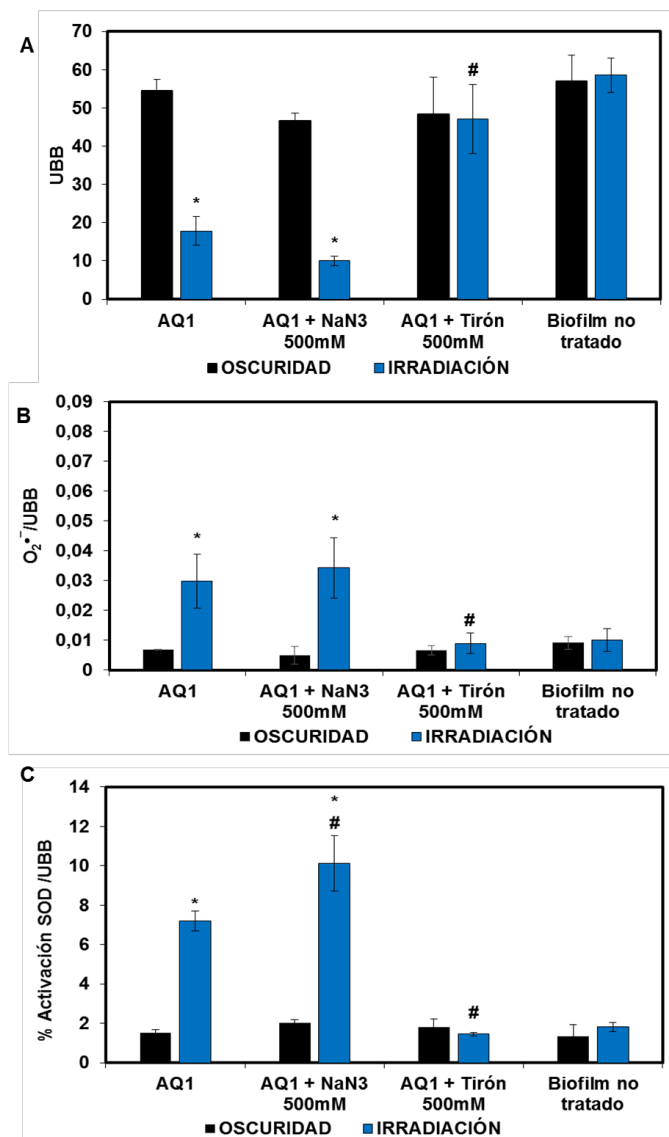
En función de los resultados obtenidos, la ausencia de la señal del $^3\text{AQ}^*$ y la detección de una señal leve de $^1\text{O}_2$ en presencia de PBS-d, no sería posible correlacionar la fotoinactivación producida por las Aqs con el mecanismo fotodinámico Tipo II. Por lo tanto, se proyecta que el mecanismo Tipo I sería el predominante en el efecto antibiofilm de estas Aqs naturales. Con el objetivo de corroborar esto, esta condición de fotoinactivación (biofilm, tratado con 56 μM de cada Aq), se repitió para evaluar el efecto de diferentes secuestrantes/desactivantes de ERO.

Se usó Tiron que es un secuestrante de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Angel Villegas *et al.*, 2015; Meerovich *et al.*, 2014), y azida de sodio que es un desactivador de $^1\text{O}_2$ (quencher, López- Chicón *et al.*, 2012). Se observó que la actividad antibiofilm fotoinducida de **AQ1** y **AQ2** no fue modificada en presencia de azida de sodio (Fig. 4.30, 4.31).

Sin embargo, el efecto fue completamente revertido por Tiron, alcanzando los niveles de UBB del biofilm no tratado (Fig. 4.30 A, 4.31 A). Esto implica que las Aqs fotoestimuladas actuarían principalmente a través de la generación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (mecanismo fotosensibilizante Tipo I), ya que en presencia de Tiron, éste actúa secuestrando el $\text{O}_2^{\bullet-}$ generado y así contrarresta la actividad antifúngica. Esto fue corroborado por el ensayo de reducción del NBT (Fig. 4.30 B, 4.31 B), el cual demostró que la actividad antibiofilm bajo irradiación de ambas Aqs se correlacionó con mayores niveles de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y consecuentemente, se produjo un incremento en la activación de la enzima SOD (Fig. 4.30 C, 4.31 C). Sólo en presencia de Tiron, la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y la activación de la enzima SOD regresaron a sus niveles basales (biofilm sin tratar).

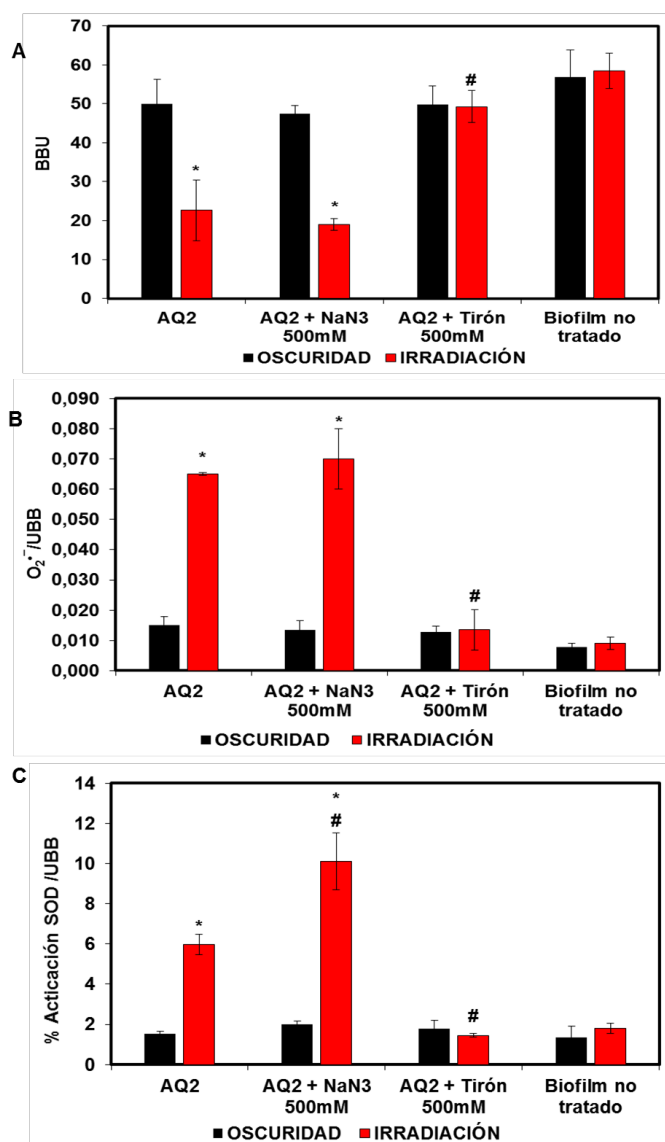
Por lo tanto, se estimó que la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y activación de la enzima SOD estarían en un equilibrio que sería el responsable del efecto similar observado para ambas Aqs en presencia de irradiación (Fig. 4.30 C, 4.31 C).

Figura 4.30 (A) Fotoinactivación del biofilm de *C. tropicalis* NCPF 3111 por acción de rubiadina (**AQ1**) (56 μ M), en presencia de secuestrante de $O_2^{\bullet-}$ (Tiron) y desactivante de 1O_2 (azida sódica). **(B)** Producción de $O_2^{\bullet-}$ en biofilms de *C. tropicalis* por acción de las AQs y en presencia de los secuestrante/desactivante. **(C)** Activación de la enzima SOD en biofilms de *C. tropicalis* tratados con **AQ1** y en presencia de secuestrante/desactivante.



* $p < 0.05$ respecto al biofilm # $p < 0.05$ AQs vs. secuestrante.

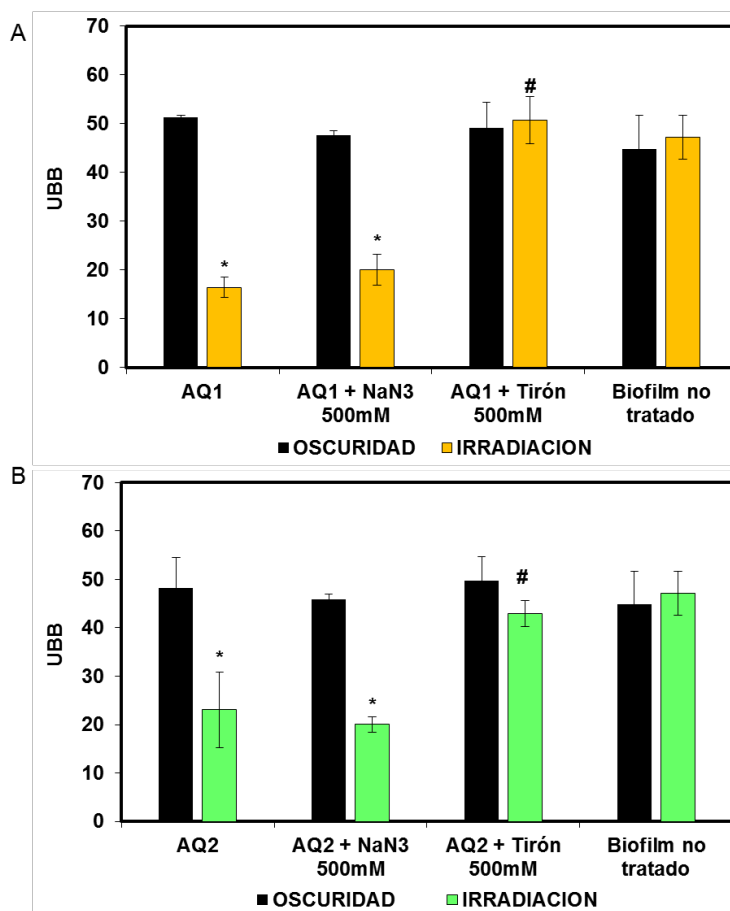
Figura 4.31 (A) Fotoinactivación del biofilm de *C. tropicalis* NCPF 3111 por acción de 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) (56 μM), en presencia de secuestrante de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Tiron) y desactivante de $^1\text{O}_2$ (azida sódica). **(B)** Producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en biofilms de *C. tropicalis* por acción de las AQs y en presencia de los secuestrante/desactivante. **(C)** Activación de la enzima SOD en biofilms de *C. tropicalis* tratados con **AQ2** y en presencia de secuestrante/desactivante.



* $p < 0.05$ respecto al biofilm # $p < 0.05$ AQs vs. secuestrante.

Este experimento de fotoinactivación del biofilm de *C. tropicalis*, en presencia de secuestrante de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Tiron) y desactivante de $^1\text{O}_2$ (azida sódica), se llevó a cabo también a las concentraciones más activas de ambas AQs: 1,96 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para **AQ1** (SupraCIMf) y 15,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para **AQ2** (CIMf) (Fig. 4.32), obteniéndose similares resultados.

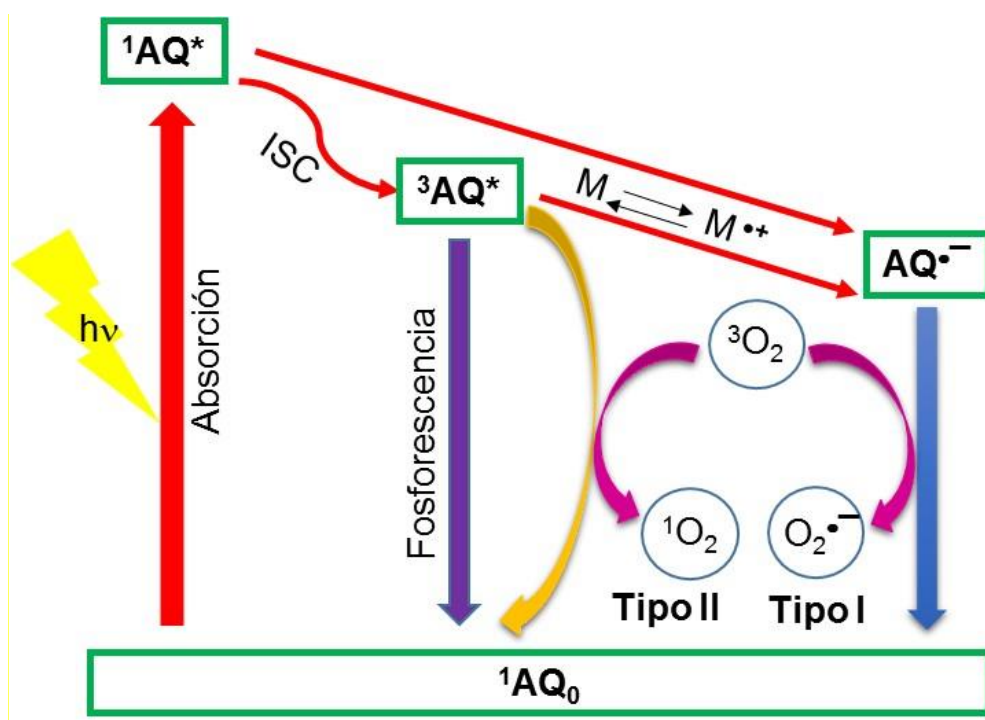
Figura 4.32 (A) Fotoinactivación del biofilm de *C. tropicalis* NCPF 3111 por acción de rubiadina (**AQ1**) a 1,96 µg/mL y **(B)** 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) a 15,6 µg/mL, en presencia de secuestrante de $O_2^{\bullet-}$ (Tirón) y desactivante de 1O_2 (azida sódica)



* $p < 0.05$ respecto al biofilm # $p < 0.05$ AQs vs. secuestrante.

Al estudiar los estados transitorios de ambas AQs, especialmente $AQ^{\bullet-}$ y $^3AQ^*$, se observó mediante los experimentos de absorción transitoria que sólo **AQ2** produce cantidades detectables de estas especies transitorias. Teniendo en cuenta que la acumulación en el biofilm también es más favorable para **AQ2**, se puede anticipar que el $O_2^{\bullet-}$ formado por el quenching de oxígeno de $AQ^{\bullet-}$, se forma preferiblemente para **AQ2**. Aunque no fue posible detectar la absorción del estado de triplete para ninguna de las AQs en los biofilms, la observación de la fosforescencia de 1O_2 indicaría que esta especie se forma realmente. Una vez más, **AQ2** mostró una eficiencia superior a **AQ1** para generar esta ERO, en concordancia con la determinada mediante SOSG.

En función estos resultados obtenidos, en la Fig. 4.33 se postulan los posibles procesos fotofísicos y fotoquímicos que presentarían las AQs.

Figura 4.33 Procesos foto físicos y fotoquímicos de las antraquinonas (AQ).

Teniendo en cuenta que la producción de $O_2^{\bullet-}$ implica la formación del radical catión del FS, en este caso la formación de éstos transitorios para este tipo de AQ no estaría favorecida, aunque se ha descrito su formación sobre matrices poliméricas (Ahmed & Khan, 1995; Fujita *et al.*, 1996; Del Giacco *et al.*, 2003).

Sin embargo, la contribución de 1O_2 en la fotoinactivación de los biofilms parece ser insignificante, ya que la azida de sodio (un quencher específico de 1O_2) no fue capaz de contrarrestar el efecto antibiofilm. La observación de que Tiron es un scavenger más eficaz en la fotoinactivación de biofilms de *C. tropicalis* por acción de estas AQs, sugiere que el $O_2^{\bullet-}$ formado por transferencia de electrones de los estados excitados de las AQs, es el mecanismo fotosensibilizante principal implicado en la fotoinactivación.

Los últimos resultados indican que estas AQs naturales reducen la formación de biofilms de *C. tropicalis* bajo la acción de la luz, sobre todo por medio de un mecanismo fotodinámico Tipo I (generación de $O_2^{\bullet-}$). A pesar que observó la producción de 1O_2 en biofilms incubado con PBS-d, su participación en la fotoinactivación del biofilm no sería significativa.

Por otra parte, los espectros de absorción revelaron la presencia de agregados de AQs en PBS, levaduras en estado planctónico y formando biofilms, como se indicó por la ampliación de las bandas y los cambios en su intensidad relativa, en comparación con $CHCl_3$. Sin embargo, el efecto observado en biofilms sugiere un

comportamiento intermedio en el que la desagregación parcial se produce tras la acumulación de las Aqs en el biofilm.

Los resultados obtenidos coinciden con lo que ya se ha demostrado para otros FS, como hipericina y azul de dimetil metileno, en donde el mecanismo de fotoinactivación depende no solamente del FS utilizado, sino también de la especie de *Candida* sobre la que se ensayaron y la acumulación intracelular de los FS (López Chicón *et al.*, 2012; Paz-Cristobal *et al.*, 2013).

IV.8- OTRAS ESTRATEGIAS ANTIMICROBIANAS PARA OPTIMIZAR LA ACTIVIDAD ANTIBIOFILM DE ANTRAQUINONAS DE *H. pustulata*

Los resultados mostraron que las dos AQs ensayadas fueron más activas sobre los biofilms de la cepa clínica de *C. tropicalis* CRF6 que sobre los de la cepa de referencia NCPF 3111, logrando una reducción de alrededor del 80 % (%R). Así, para las AQs se pudo estimar la CIMS-80 sobre los biofilms de cepa clínica y solo la CIMS-50 sobre los biofilms de la cepa de referencia.

Para tratar de mejorar la actividad antifúngica fotoactivada de **AQ1** y **AQ2**, específicamente sobre biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111, se probaron dos estrategias principales:

1) Aumentar la frecuencia de irradiación durante el período de incubación del biofilm tratado con estas AQs fotosensibilizantes.

2) Combinar estas AQs entre sí y con un antifúngico habitualmente usado en la clínica como AMB, incluso evaluando el aumento de la frecuencia de irradiación sobre estas combinaciones.

IV.8.1- Aumento en la frecuencia de irradiación sobre la actividad antibiofilm de las AQs: Efecto sobre estrés oxidativo y nitrosativo del biofilm y respuesta de los mecanismos antioxidantes

En la Tabla 4.21 se muestran los %R obtenidos a las concentraciones activas de cada AQ, sobre el biofilm de *C. tropicalis* NCPF 3111, con un único período de irradiación (15 min) previo a la incubación ($t = 0$).

Tabla 4.21 Actividad antibiofilm *in vitro* de las AQs sobre *C. tropicalis* NCPF 3111, porcentajes de reducción obtenidos bajo oscuridad y una única irradiación antes de la incubación ($t = 0$).

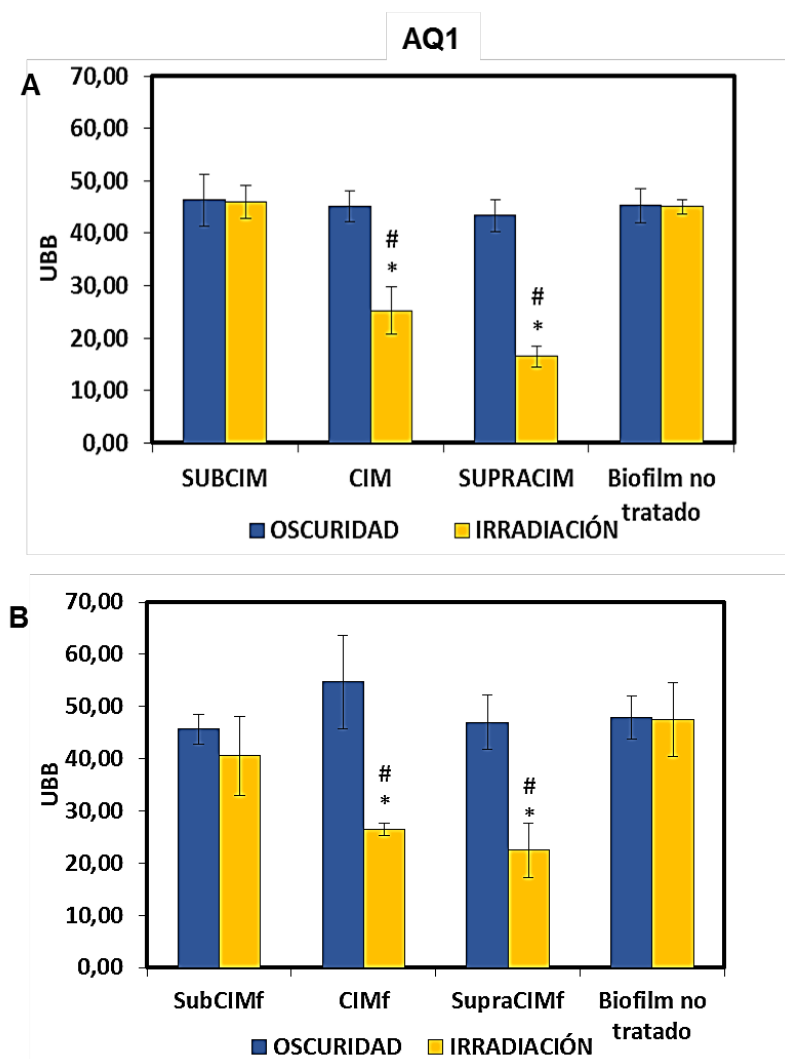
AQ	Concentración	Porcentaje de reducción (%R)	
		Oscuridad	Irradiación
AQ1	SubCIMf	0	0
	CIMf	0	44 ± 10
	SupraCIMf	0	63,5 ± 4,5
AQ2	SubCIMf	0	0
	CIMf	0	47 ± 10
	SupraCIMf	0	0

AQ1: rubiadina; AQ2: 1-metil éter de rubiadina; CIMf: Concentración inhibitoria mínima fotoactiva; Sub-CIMf: CIMf/2; Supra-CIMf: CIMfx2

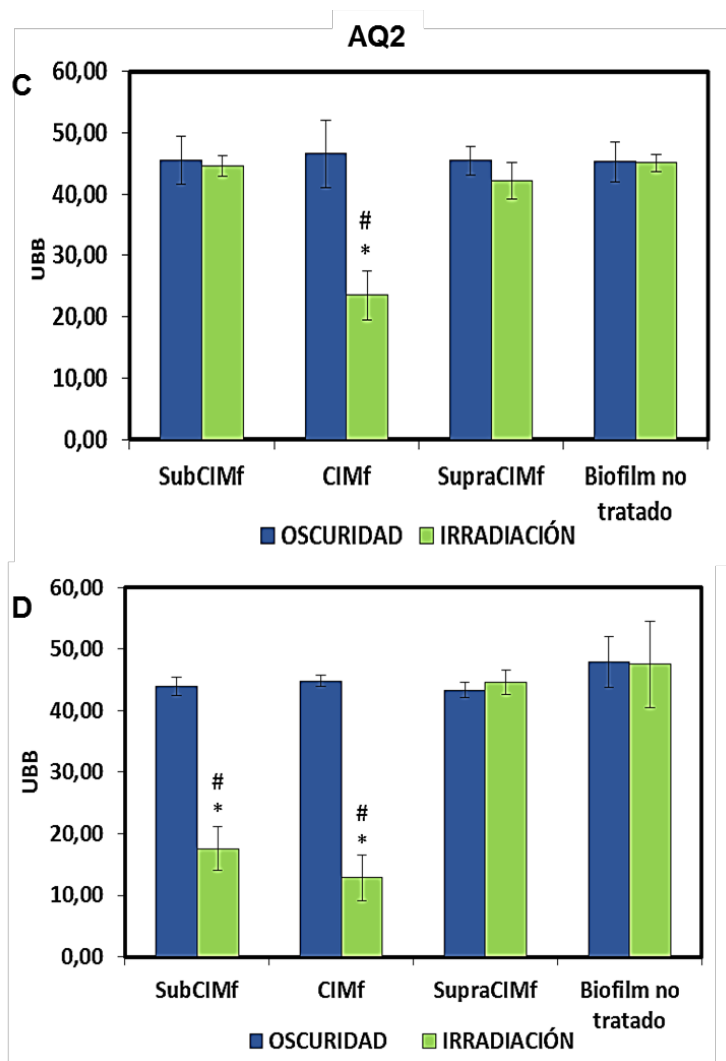
En la Fig. 4.34 se puede observar la reducción en las UBB producida por cada AQ cuando el biofilm tratado se irradió una sola vez antes de la incubación ($t = 0$) (Fig. 4.34 A y B), en comparación cuando se realizaron sucesivas irradiaciones durante la incubación: $t = 0, 3, 6, 24, 27$ y 30 h (Fig. 4.34 C y D). Al aumentar la frecuencia de irradiación, ambas AQs produjeron mayores %R a concentraciones menores. **AQ1** alcanzó un $52,7 \pm 10,1$ %R a la CIMf y **AQ2** logró un $62,9 \pm 7,4$ %R a la SubCIMf.

A pesar que para **AQ1** no se logró mejorar su %R, se disminuyó la CIMS-50 a la mitad ($0,98 \mu\text{g/mL}$). Para **AQ2**, este aumento en la frecuencia de irradiación fue más beneficioso porque no sólo aumentó el %R sino que también disminuyó la concentración más activa.

Figura 4.34 Actividad antibiofilm de las AQs en *C. tropicalis* NCPF 3111, irradiadas antes de la incubación ($t = 0$ h) (A y C) y con un tratamiento de irradiación a $t = 0, 3, 6, 24, 27, 30$ h durante incubación (B y D).



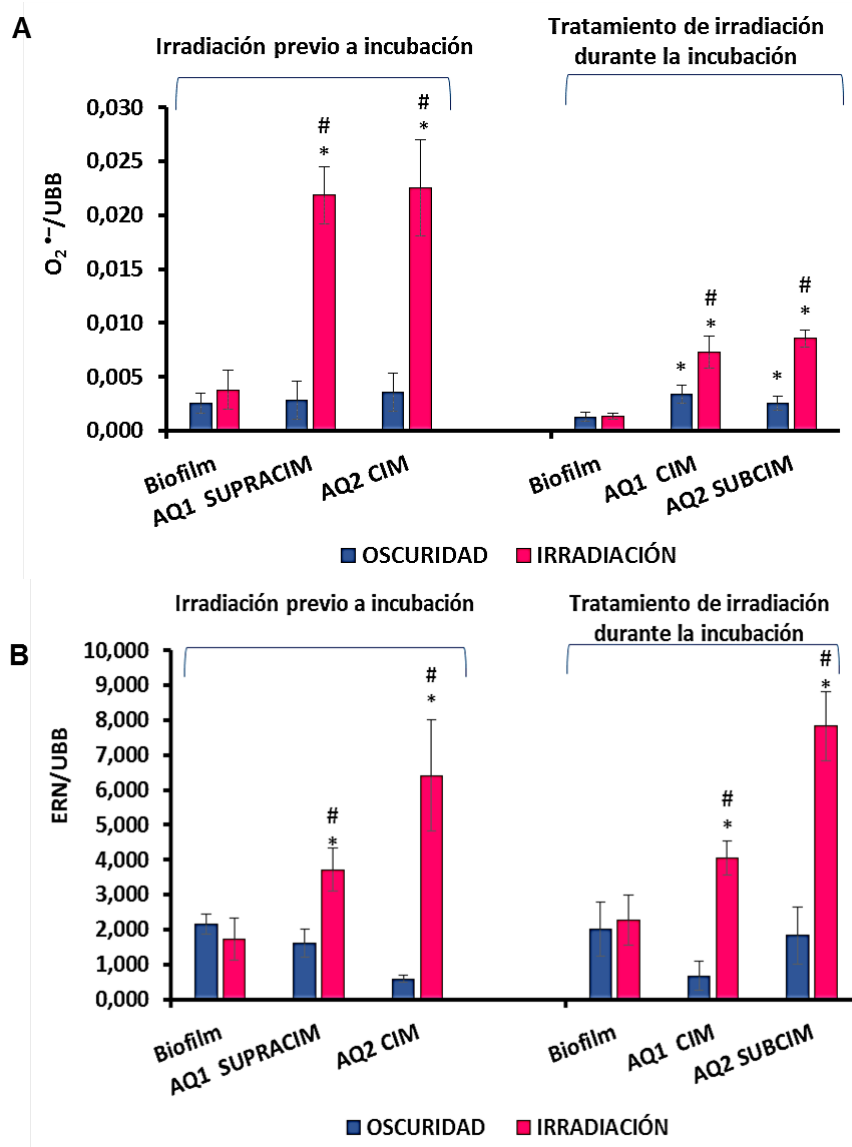
Resultados y Discusión



AQ1: rubiadina y **AQ2:** 1-metil éter de rubiadina
^{*}*p*<0.05 respecto al biofilm, [#]*p*<0.05 Oscuridad vs. Irradiación.

Cuando se estudió el desbalance oxidativo y nitrosativo para las concentraciones que resultaron activas bajo el tratamiento con irradiación, se observó un incremento en los niveles de $O_2^{\bullet-}$ respecto a el biofilm no tratado y respecto a oscuridad (Fig. 4.35 A). Sin embargo, estos niveles de $O_2^{\bullet-}$ fueron menores comparado con la irradiación a $t = 0$. Respecto al incremento observado en las ERN bajo irradiación, éste fue comparable en ambos tratamientos con luz (Fig. 4.35 B).

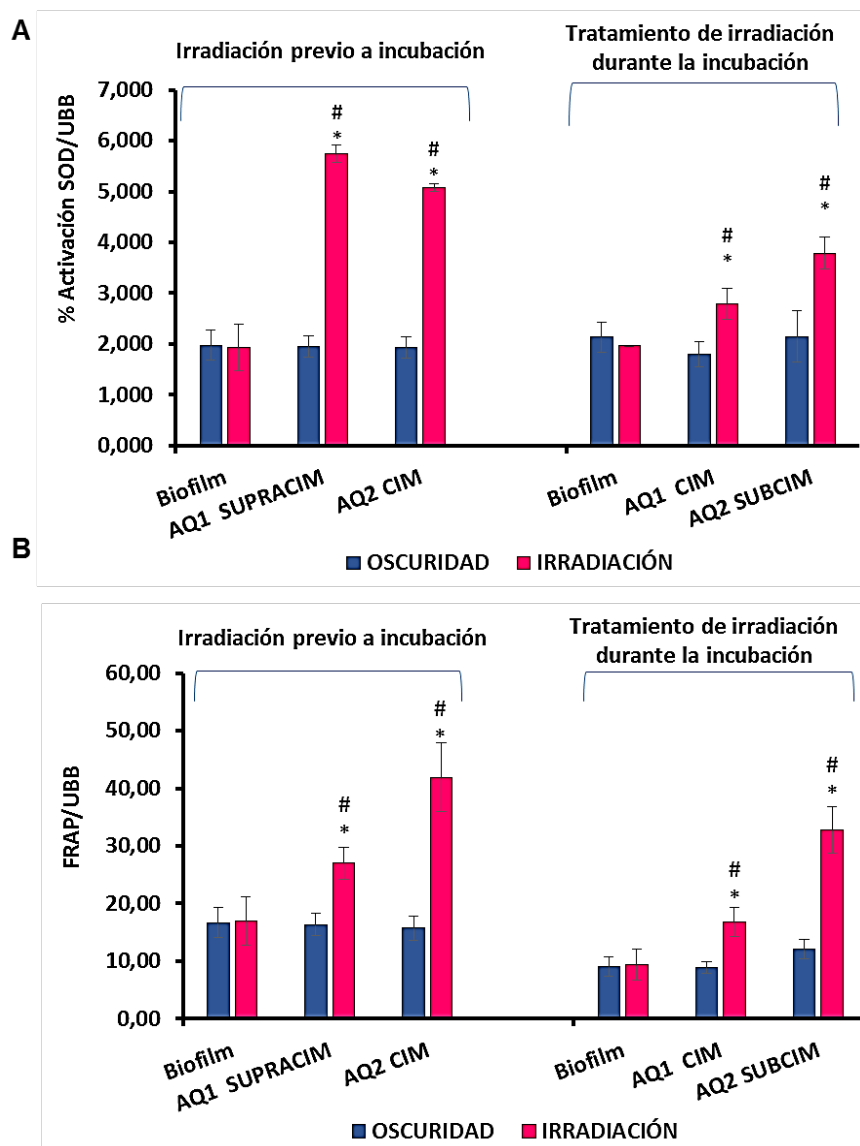
Figura 4.35 Desbalance redox generado por rubiadina (AQ1) y 1-metil éter de rubiadina (AQ2) a las concentraciones más activas, con irradiación antes de la incubación (t = 0h) y con el tratamiento de luz (t = 0, 3, 6, 24, 27, 30 h) durante la incubación. (A) Producción de $O_2^{\bullet-}$. (B) Generación de ERN.



* $p < 0.05$ respecto al biofilm, # $p < 0.05$ Oscuridad vs. Irradiación.

Además, se observó que tanto la enzima SOD como la capacidad antioxidante total fueron estimuladas a las concentraciones activas con este nuevo tratamiento de irradiación, aunque a menores niveles respecto a la irradiación a t = 0 (Fig. 4.36 A y B).

Figura 4.36 Desbalance redox generado por rubiadina (AQ1) y 1-metil éter de rubiadina (AQ2) a las concentraciones más activas, con irradiación antes de la incubación (t = 0h) y con el tratamiento de luz (t = 0, 3, 6, 24, 27, 30 h) durante la incubación. (A) Activación de la enzima SOD. (B) Capacidad antioxidante total.



* $p < 0.05$ respecto al biofilm, # $p < 0.05$ Oscuridad vs. Irradiación.

Con el tratamiento de irradiación, se observó un predominio del estrés nitrosativo sobre el oxidativo. Seguramente como una respuesta al alto nivel de $O_2^{\bullet-}$, en donde se estimuló la generación de NO^{\bullet} que actuaría como secuestrante de esta ERO (Astuti *et al.*, 2016, Powers *et al.*, 2011). Se debe tener en cuenta que estas mediciones, se realizaron al finalizar la incubación del biofilm (48 h), y es probable que el $O_2^{\bullet-}$ generado haya sido contrarrestado con la producción de NO^{\bullet} y la activación de la SOD y el sistema antioxidante total del biofilm (FRAP). Además, el mayor %R

obtenido por **AQ2**, estaría relacionado con la mayor producción de ERN en relación a **AQ1** bajo el tratamiento de irradiación.

IV.8.2- Ensayo de combinación con irradiación

A- Efecto antibiofilm de las combinaciones de antraquinonas entre sí y con AMB

Se estudió el efecto de las combinaciones de cada AQ con AMB y de la combinación de ambas AQs entre sí sobre biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111. Se ensayaron las combinaciones posibles que se pueden obtener con las tres concentraciones de cada compuesto ensayadas previamente: SubCIMf, CIMf y SupraCIMf. Esta evaluación se realizó en oscuridad y bajo dos condiciones de irradiación: **1**) antes de la incubación (t = 0) y **2**) con tratamiento de irradiación durante la incubación del biofilm (t = 0, 3, 6, 24, 27, 30 h).

En oscuridad (Tabla 4.22), se observó que el efecto de las combinaciones fue menor o comparable al de AMB sola a su CIMS (61,1 ± 4,1 %R). Esto podría explicarse por el hecho que las AQs por sí mismas no fueron activas en ausencia de luz a las concentraciones ensayadas, por lo cual sólo estaríamos observando el efecto de AMB.

Tabla 4.22 Actividad antibiofilm *in vitro* de las combinaciones de AQs con AMB en oscuridad: **(A)** rubiadina (**AQ1**) + AMB y **(B)** 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) + AMB, expresada como porcentajes de reducción (%R).

A		Concentración en la combinación (µg/mL)			% R
CIMS AQ1 (µg/mL)	CIMS AMB (µg/mL)	AQ1	AMB		
nd	0,5	0,49	0,25	16,1 ± 1,4	
			0,5	49,7 ± 1,7	
			1	71,8 ± 9,1	
		0,98	0,25	15,9 ± 0,2	
			0,5	61,5 ± 8,6	
			1	65,4 ± 10,1	
		1,96	0,25	65,1 ± 5,3	
			0,5	79,0 ± 10,0	
			1	70,4 ± 11,2	

B		Concentración en la combinación (µg/mL)			% R
CIMS AQ2 (µg/mL)	CIMS AMB (µg/mL)	AQ2	AMB		
nd	0,5	7,81	0,25	28,2 ± 10,7	
			0,5	42,9 ± 1,2	
			1	68,2 ± 7,8	
		15,6	0,25	59,4 ± 8,4	
			0,5	55,4 ± 9,4	
			1	52,8 ± 8,9	
		31,3	0,25	53,5 ± 11,7	
			0,5	60,1 ± 10,0	
			1	47,2 ± 10,4	

CIMS: Concentración inhibitoria mínima sobre células sésiles. nd: no detectada

En la Fig. 4.37 se muestra el efecto de las combinaciones de cada AQ con AMB y de la combinación de las dos Aqs, cuando fueron irradiadas antes de la incubación ($t = 0$). Se puede observar que todas las combinaciones de cada AQ con AMB disminuyen la biomasa del biofilm significativamente respecto al efecto de cada compuesto en forma individual (Fig. 4.37 A y B). Para la combinación de las dos Aqs, sólo se observó una reducción de la biomasa cuando las Aqs se combinaron a sus SubCIMf (Fig. 4.37 C).

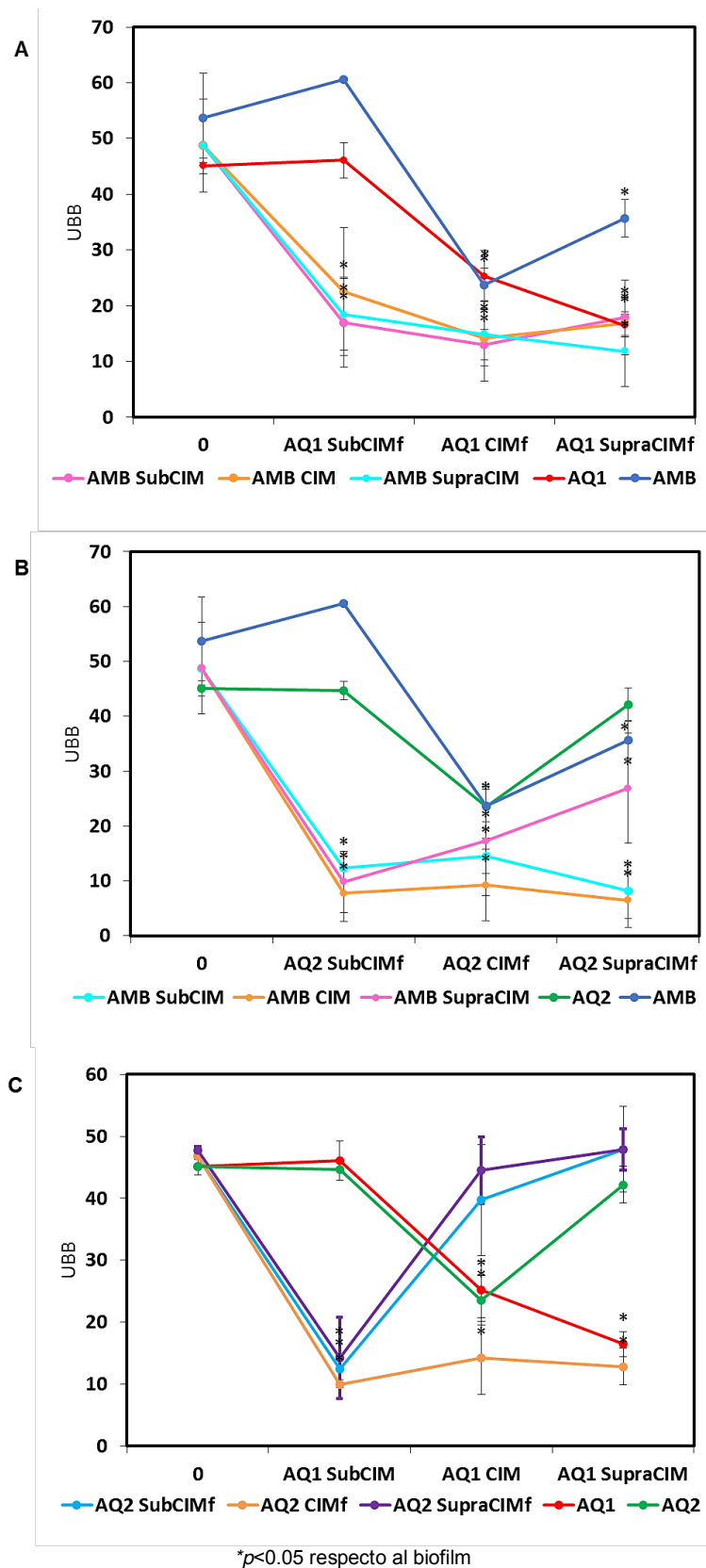
Cuando **AQ1** + AMB se combinaron a sus respectivas SubCIMf se redujo la biomasa a $16,9 \pm 8,1$ UBB, lo cual en comparación al control ($48,8 \pm 8,4$ UBB) corresponde a una reducción del $65,4 \pm 1,6$ %. En este caso, no se mejoró la reducción en la biomasa alcanzada por ambos compuestos a la concentración más activa (**AQ1** a la SupraCIMf y AMB a la CIM), pero se logró bajar la concentración activa de ambos compuestos a la SubCIM (Fig. 4.37 A).

La disminución de las UBB para la combinación **AQ2** + AMB ($12,3 \pm 2,2$ UBB) fue mayor que para la combinación anterior, mejorando el %R logrado ($74,8 \pm 2,2$ %). A su vez, la actividad alcanzada en la combinación se incrementó respecto a cada compuesto en forma individual (47 % para **AQ2** a su CIMf y 61,1 % para AMB a su CIM), incluso se disminuyó la concentración activa a la SubCIM tanto para **AQ2** como para AMB (Fig. 4.37 B). La combinación de estos dos compuestos no fue dependiente de la concentración. Ambos compuestos combinados a la SupraCIM tuvieron un efecto comparable al obtenido en forma individual ($p > 0,05$), lo cual podría deberse a un efecto de agregación de la AQ como quedó demostrado en la Fig. 4.22 correspondiente a los espectros de absorción (Eisfeld & Briggs, 2006; Gouloumis *et al.*, 2006).

La combinación de ambas Aqs produjo una disminución en las UBB similar a la combinación **AQ2** + AMB ($12,4 \pm 1,7$, $73,6 \pm 2,6$ %R), reduciendo también las concentraciones activas a las SubCIMf (Fig. 4.37 C). Para la combinación de ambas Aqs a la SupraCIMf se observó un menor efecto reductor sobre el biofilm, similar al observado para la combinación de **AQ2** + AMB a la SupraCIM, debido también a la agregación de ambas Aqs.

Resultados y Discusión

Figura 4.37 Efecto de las combinaciones: **(A)** rubiadina (**AQ1**) con anfotericina B (**AMB**), **(B)** 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) con AMB y **(C)** **AQ1** con **AQ2**, bajo irradiación antes de la incubación (t = 0).



Resultados y Discusión

Con el fin de establecer si existe sinergismo, adición o indiferencia entre los compuestos, los resultados obtenidos para cada combinación fueron expresadas como FICI. Así, se estableció sinergismo para valores de $FICI \leq 0,5$, sinergismo parcial cuando $FICI > 0,5$ y < 1 , adición para $FICI = 1$, indiferencia cuando $FICI > 1$ y < 4 y antagonismo para valores de $FICI > 4$ (Dastgheyb *et al.*, 2013).

Los valores de Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (FICI) de las AQs combinadas con AMB y entre sí, sobre biofilms de *C. tropicalis* bajo irradiación ($t = 0$), se muestran en la Tabla 4.23.

Tabla 4.23 Valores de Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (FICI) de las AQs combinadas con AMB y entre sí, sobre biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 bajo irradiación a $t = 0$. **(A) AQ1 + AMB**, **(B) AQ2 + AMB** y **(C) AQ1 + AQ2**.

A		Concentración en la combinación (µg/mL)				FICI	%R
		CIMSf AQ1 (µg/mL)	CIMS AMB (µg/mL)	AQ1	AMB		
1,96	0,5	0,49	0,25	0,25	0,75	65,4 ± 1,6	
				0,5	1,25	73,4 ± 5,6	
				1	2,25	63,3 ± 1,4	
		0,98	0,25	0,25	1,00	53,8 ± 8,8	
				0,5	1,50	70,8 ± 10,4	
				1	2,50	65,5 ± 4,5	
		1,96	0,25	0,25	1,50	62,2 ± 6,5	
				0,5	2,00	69,4 ± 9,7	
				1	3,00	75,2 ± 7,1	

B		Concentración en la combinación (µg/mL)				FICI	%R
		CIMSf AQ2 (µg/mL)	CIMS AMB (µg/mL)	AQ2	AMB		
15,6	0,5	7,81	0,25	0,25	1,00	74,8 ± 2,2	
				0,5	1,50	67,3 ± 6,6	
				1	2,50	71,3 ± 3,3	
		15,6	0,25	0,25	1,50	81,2 ± 6,5	
				0,5	2,00	70,1 ± 3,4	
				1	3,00	83,7 ± 6,9	
		31,3	0,25	0,25	2,51	76,8 ± 6,3	
				0,5	3,01	53 ± 11	
				1	4,01	45 ± 10	

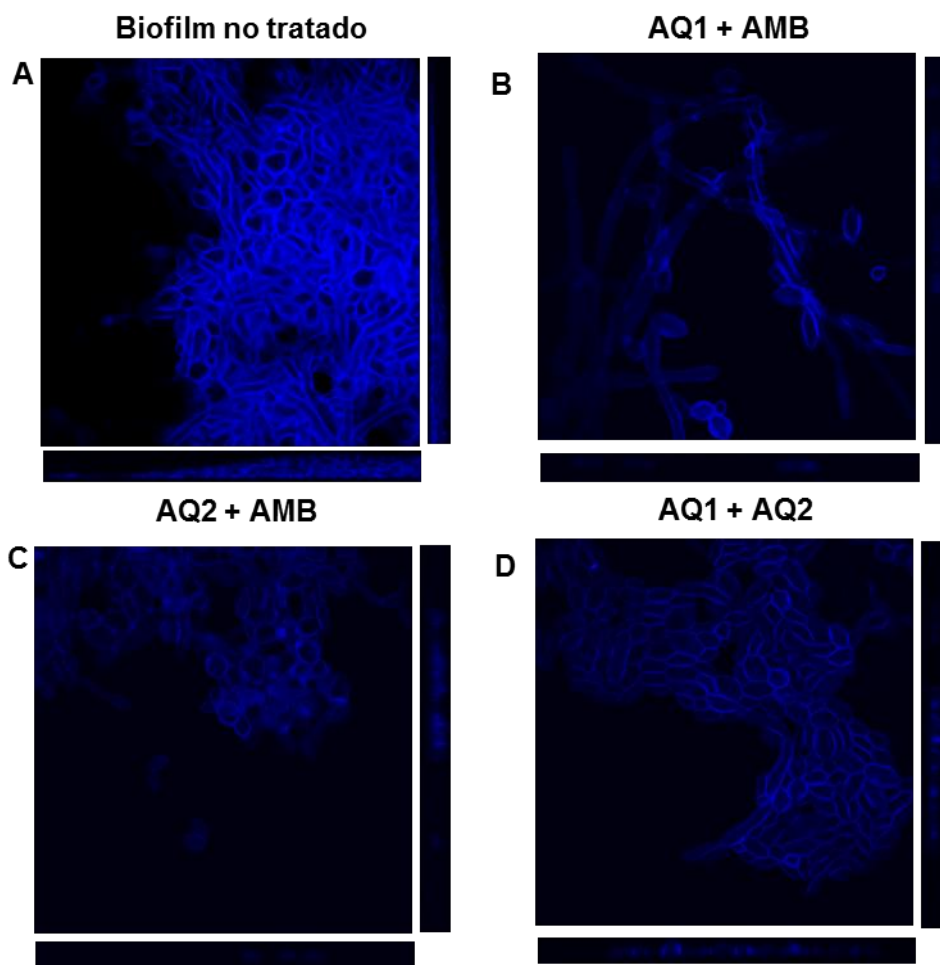
C		Concentración en la combinación (µg/mL)				FICI	%R	
		CIMSf AQ1 (µg/mL)	CIMS AQ2 (µg/mL)	AQ1	AQ2			
1,96	15,6	0,49	7,81	7,81	0,75	73,6 ± 2,6		
				15,6	1,25	2,3 ± 9,9		
				31,3	2,26	nd		
				0,98	7,81	7,81	1,00	78 ± 1
						15,6	1,50	65 ± 10
						31,3	2,51	72 ± 6
		1,96	7,81	7,81	1,50	69 ± 10		
				15,6	2,00	5 ± 11		
				31,3	3,01	nd		

AQ1: rubiadina; AQ2: 1-metil éter de rubiadina; AMB: anfotericina B; CIMS/f: Concentración inhibitoria mínima sobre células sésiles/ fotoactiva, nd: no detectada

Cuando las AQs se combinaron con AMB, bajo la acción de la luz, se demostró sinergismo parcial (FICI = 0,75) para la combinación de **AQ1** SubCIMf y AMB SubCIM; adición (FICI = 1) para las combinaciones de **AQ2** SubCIMf con AMB SubCIM (Tabla 4.23). Las combinaciones de ambas AQs sólo fueron activas bajo irradiación, alcanzándose sinergismo parcial cuando se combinaron a la SubCIMf (FICI = 0,75).

La actividad antibiofilm de las combinaciones se corroboró por MCEL (Fig. 4.38, Tabla 4.24), mediante la cuantificación del espesor del biofilm de *C. tropicalis* NCPF 3111 tratado con las combinaciones respecto al biofilm no tratado. Para lo cual, las células sésiles del biofilms se tiñeron con Calcofluor-White (azul).

Figura 4.38 Imágenes de MCEL de biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 tratados con las combinaciones de: (A) rubiadina (**AQ1**) con anfotericina B (AMB), (B) 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) con AMB y (C) **AQ1** con **AQ2**, bajo irradiación antes de la incubación (t = 0).



El canal azul muestra la tinción de la pared de células sésiles con Calcofluor-White. Magnificación 60x y escala 10 μm . Representativa de 20 campos.

Se observó que el espesor del biofilm se redujo un 64 ± 6 % por acción de **AQ1** + AMB (Fig. 4.38 B), un 70 ± 4 % por efecto de **AQ2** + AMB (Fig. 4.38 C), y un 71 ± 5 % por la combinación de **AQ1** + **AQ2** (Fig. 4.38 D), en comparación con el control (Fig. 4.38 A, Tabla 4.24). Todas las combinaciones tuvieron mayor actividad antibiofilm cuando se utilizaron concentraciones SubCIM de las AQs y AMB. Estos valores fueron similares a los obtenidos por tinción con CV, expresados como reducción de UBB, en donde **AQ1** + AMB generó un $65,4 \pm 1,6$ %, **AQ2** + AMB un $74,8 \pm 2,2$ % y **AQ1** + **AQ2** un $73,6 \pm 2,6$ % de reducción (Fig. 4.37).

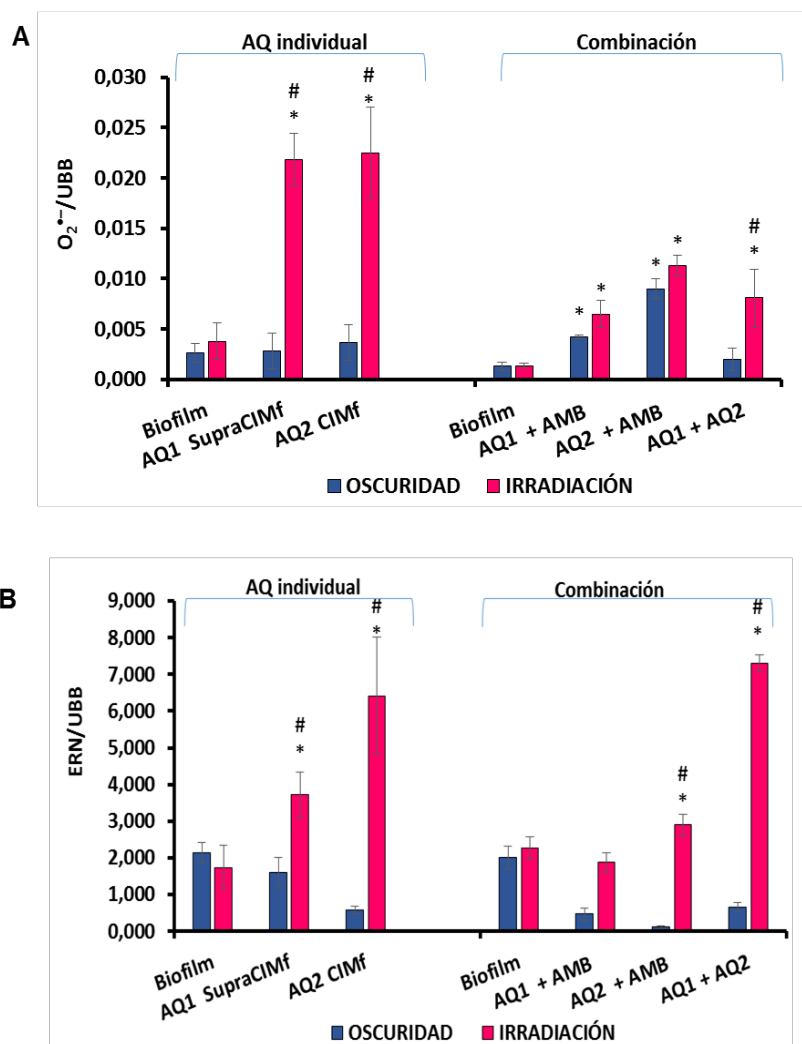
Tabla 4.24 Análisis COMSTAT de biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 tratados con las combinaciones de: (A) rubiadina (**AQ1**) con anfotericina B (AMB), (B) 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) con AMB y (C) **AQ1** con **AQ2**, bajo irradiación antes de la incubación ($t = 0$).

	AQ1 + AMB	AQ2 + AMB	AQ1 +AQ2	Biofilm no tratado
Biomasa ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)	$5,78 \pm 0,06$	$4,72 \pm 0,17$	$4,55 \pm 0,18$	$15,9 \pm 0,3$
Coefficiente de rugosidad	$0,94 \pm 0,02$	$1,0 \pm 0,10$	$1,0 \pm 0,10$	$1,0 \pm 0,1$
Distribución del espesor (μm)	$5,09 \pm 0,80$	$4,2 \pm 0,50$	$4,6 \pm 0,33$	$13,9 \pm 0,2$

B- Efecto de las combinaciones en el estrés oxidativo y nitrosativo del biofilm y respuesta de los mecanismos antioxidantes

Las combinaciones más activas de cada AQ con AMB y de **AQ1** con **AQ2** produjeron incrementos significativos en los niveles de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (expresados como ERO) y de las ERN respecto de oscuridad, destacándose la combinación **AQ1** + **AQ2** (Fig. 4.39 A y B). En todas las combinaciones (AQ + AMB y AQs entre sí) se observó un predominio de las ERN sobre las ERO; y a su vez estos valores de ERO fueron menores en comparación con los generados por las AQs en forma individual. Los valores de AMB no se graficaron porque no generan aumento de ERO ni ERN, e incluso la activación de SOD y del sistema antioxidante total (FRAP) no fue significativa (Fig. 4.40 A y B).

Figura 4.39 Desbalance redox en las combinaciones (AQ + AMB; AQ + AQ) a las concentraciones más activas, bajo irradiación y oscuridad, en comparación con las concentraciones más activas de las Aqs en forma individual. **(A)** Producción de $O_2^{\bullet-}$. **(B)** Generación de ERN.



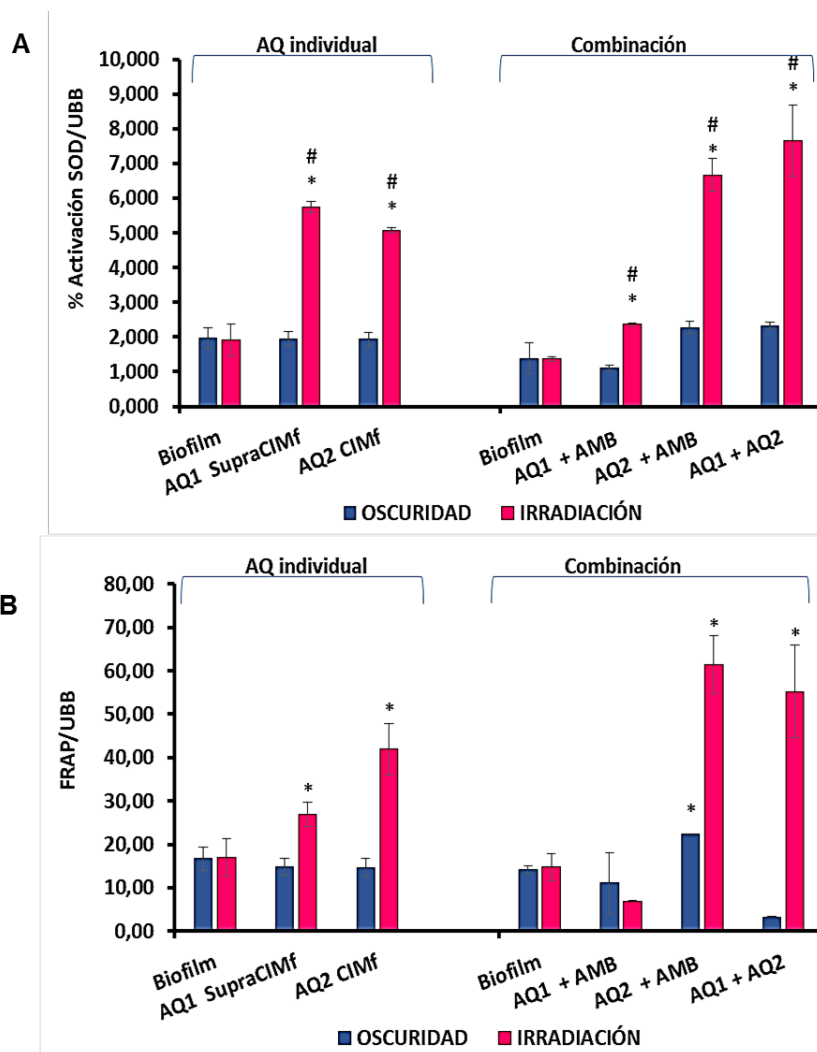
AQ1: rubiadina, AQ2: 1-metil éter de rubiadina; AMB: anfotericina B
^{*} $p < 0.05$ respecto al biofilm, [#] $p < 0.05$ Oscuridad vs. Irradiación.

Especialmente, para las combinaciones **AQ2 + AMB** y **AQ1 + AQ2** se observa la consecuente activación de los sistemas antioxidantes enzimáticos (SOD) y no enzimáticos (FRAP) (Fig. 4.40 A y B). Esta activación fue mayor que la promovida por las Aqs de forma individual.

Para la combinación de **AQ1 + AMB**, además de un importante incremento en ERN, que a su vez no fue significativo respecto de las otras combinaciones, sólo se observó un incremento en la activación de la SOD que podría ser suficiente para

contrarrestar la moderada producción de $O_2^{\bullet-}$ (Fig. 4.39, Fig. 4.40). Esto explicaría el menor %R alcanzado por esta combinación respecto de las otras.

Figura 4.40 Desbalance redox en las combinaciones (AQ + AMB; AQ + AQ) a las concentraciones más activas, bajo irradiación y oscuridad, en comparación con las concentraciones más activas de las Aqs en forma individual. **(A)** Activación de la enzima SOD. **(B)** Capacidad antioxidante total.

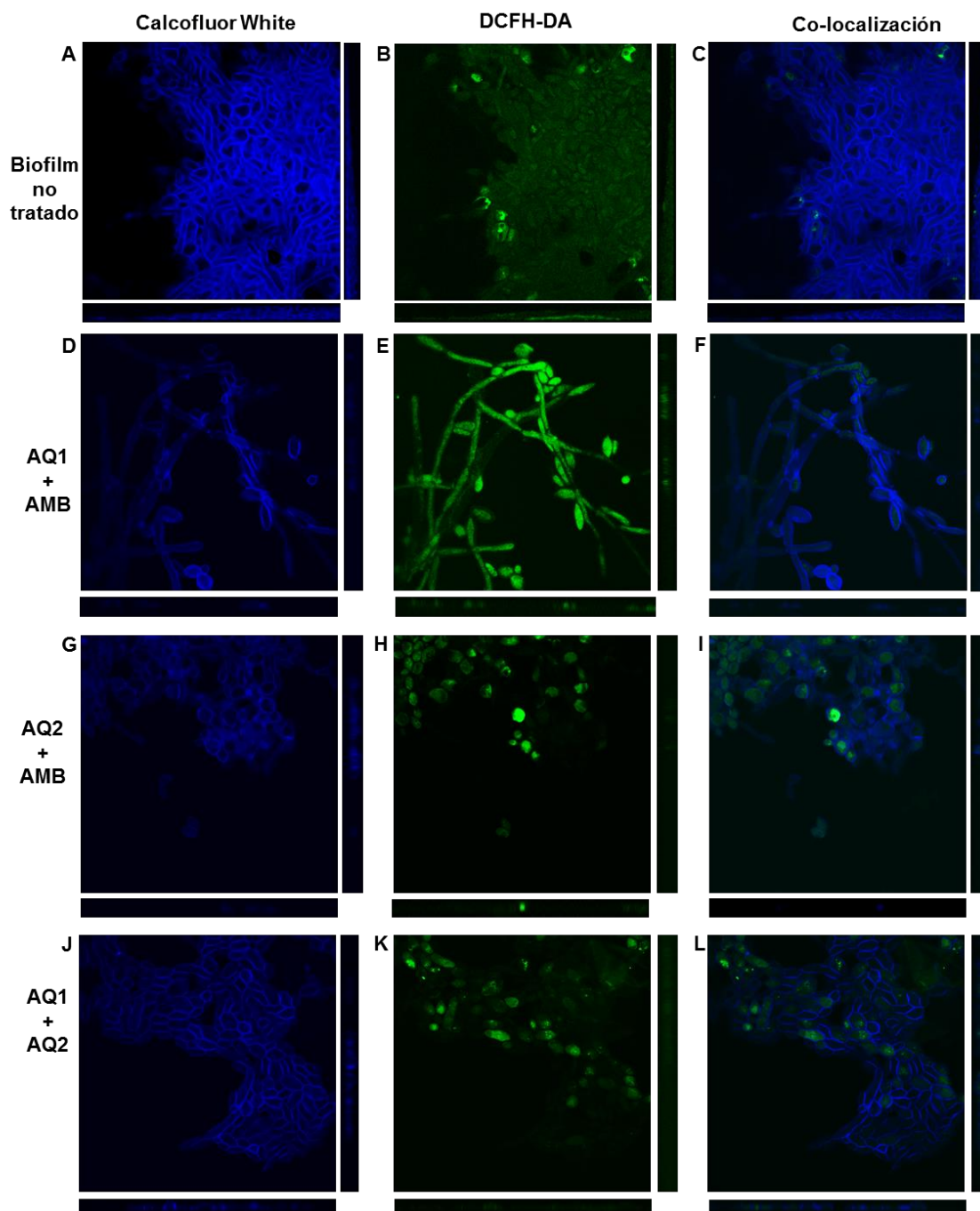


AQ1: rubiadina, AQ2: 1-metil éter de rubiadina; AMB: anfotericina B
^{*}*p*<0.05 respecto al biofilm, [#]*p*<0.05 Oscuridad vs. Irradiación.

Paralelamente, con el ensayo de MCEL se observó la producción de ERO intracelular en los biofilms tratados con las combinaciones, en comparación con las células sésiles no tratadas (Fig. 4.41). La producción de ERO se observó dentro de las células sésiles, resultando en una alta intensidad de fluorescencia del DCF en los biofilms tratados con las combinaciones de las Aqs con AMB y combinadas entre sí

bajo irradiación (Fig. 4.41 E, H y K, respectivamente), en comparación con el biofilm no tratado (Fig. 4.41 B). En las Fig. 4.41 C, F, I y L, se observa la superposición de los dos canales, la tinción de la pared de células sésiles con Calcofluor-White (A, D, G y J) y la oxidación de la sonda DCFH como un indicador de la producción de ERO dentro del biofilm (B, E, H y K), cuando las imágenes se fusionaron en una sola imagen de dos colores.

Figura 4.41 Imágenes de MCEL de biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 tratados con las combinaciones de: **(A)** rubiadina (**AQ1**) con anfotericina B (AMB), **(B)** 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) con AMB y **(C)** **AQ1** con **AQ2**, bajo irradiación antes de la incubación ($t = 0$), incluyendo la visualización de ERO intracelular.



El canal azul muestra la tinción de la pared de células sésiles con Calcofluor-White (**A**, **D** y **G**); el canal verde muestra la oxidación de la sonda DCFH como un indicador de la producción de ERO dentro del biofilm (**B**, **E** y **H**). Co-localización de los dos canales (**C**, **F** e **I**). Magnificación 60x y escala 10 μm . Representativa de 20 campos.

Midiendo las intensidades de fluorescencia de DCF (verde), en función de las células sésiles, se cuantificó la generación de ERO. Este análisis cuantitativo, muestra que las combinaciones AQs incrementaron las ERO dentro de las células, bajo la

acción de la luz. Se estableció que la generación de ERO para la combinación de **AQ1** + AMB fue 2,6 veces mayor respecto al control; 3,6 veces para **AQ2** + AMB y 3,4 veces para la combinación de las AQs (Tabla 4.25)

Tabla 4.25: Cuantificación de las ERO intracelular en biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 tratados con las combinaciones de: (A) rubiadina (**AQ1**) con anfotericina B (AMB), (B) 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) con AMB y (C) **AQ1** con **AQ2**, bajo irradiación antes de la incubación ($t = 0$), expresado en intensidad relativa de fluorescencia.

Condición	Oscuridad	Luz
Biofilm no tratado	0,3 ± 0,1	0,28 ± 0,13
AQ1 + AMB	0,35 ± 0,04	0,73 ± 0,11*#
AQ2 + AMB	0,38 ± 0,04	1,08 ± 0,11*#
AQ1 + AQ2	0,38 ± 0,07	0,96 ± 0,11*#

* $p < 0.005$ vs biofilm no tratado; # $p < 0.005$ irradiación vs. oscuridad.

C- Aumento en la tasa de irradiación sobre el efecto antibiofilm de las combinaciones de antraquinonas entre sí y con AMB

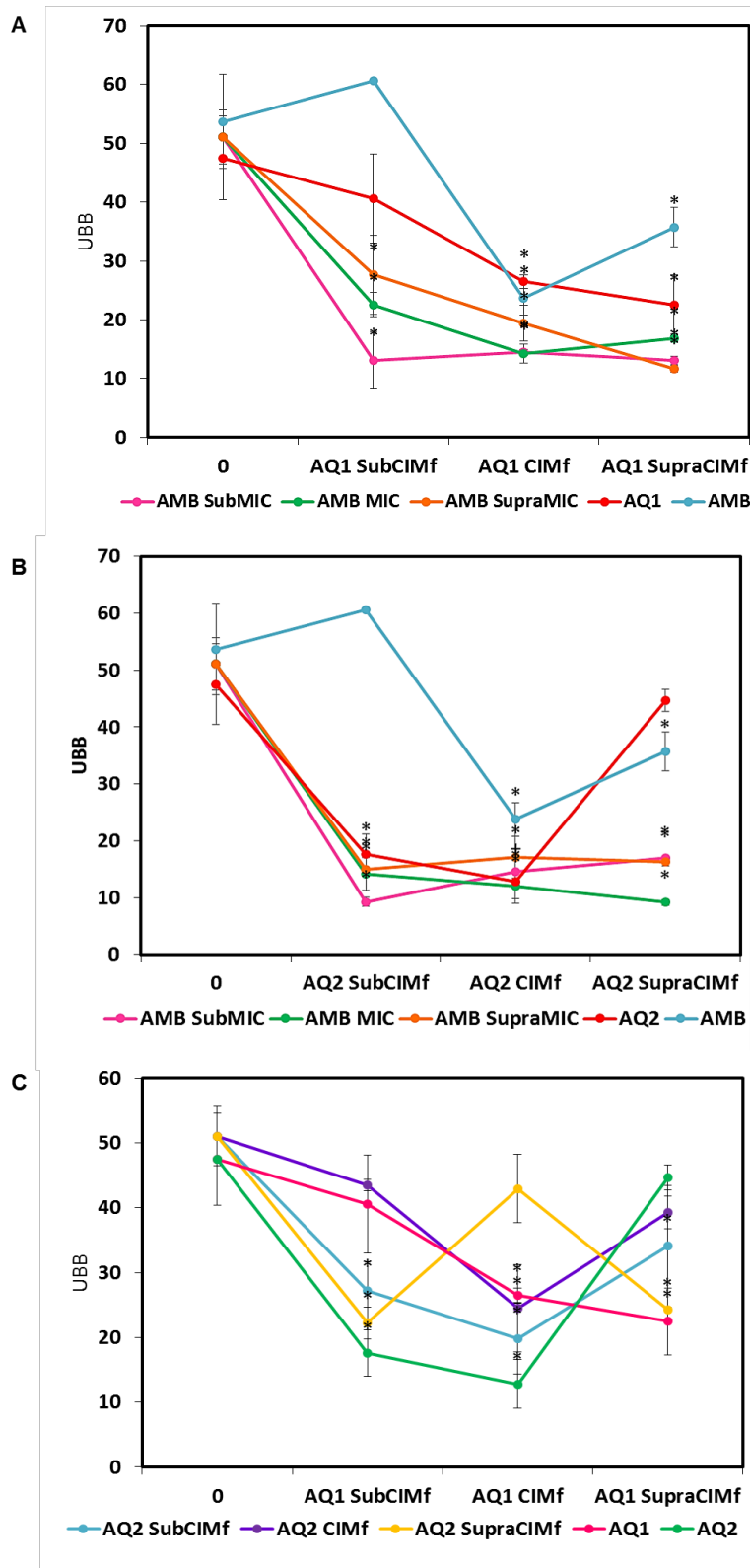
Con el tratamiento de irradiación durante la incubación, se observó una significativa potenciación del efecto para las combinaciones de cada AQ con AMB (Fig. 4.42 A y B).

La combinación de **AQ1**+AMB alcanzó un 74 ± 9 %R a la SubCIM de ambos compuestos (Fig. 4.42 A). La combinación de **AQ2** + AMB también a la SubCIM de ambas sustancias produjo una mayor disminución de las UBB, logrando un 82 ± 2 %R (Fig. 4.42 B). Sin embargo, para las combinaciones de las dos AQs, sólo se alcanzó un 50 %R a la SubCIM de ambas AQs (Fig. 4.42 C). Es importante destacar que con el tratamiento de irradiación se logra un mayor %R que al irradiar una sola vez antes de la incubación, específicamente para las combinaciones de cada AQ con AMB. Además, para la combinación de **AQ2** + AMB, ambas a la SupraCIM, no se observa el efecto de agregación manteniendo el %R alrededor del 80 %.

Figura 4.42 Efecto de las combinaciones de las AQs con AMB y entre sí sobre biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 con el tratamiento de irradiación ($t = 0, 3, 6, 24, 27, 30$ h).

Resultados y Discusión

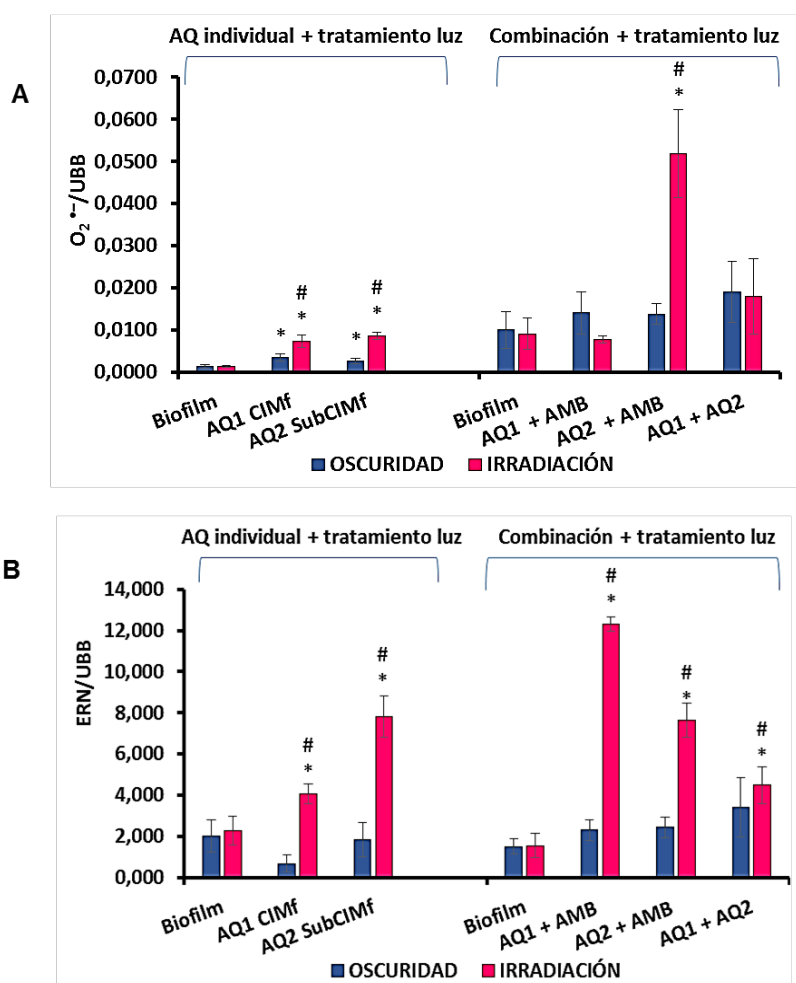
(A) rubiadina (AQ1) + AMB, (B) 1-metil éter de rubiadina (AQ2) + AMB y (C) AQ1 + AQ2.



D- Efecto de las combinaciones con tratamiento de irradiación en el estrés oxidativo y nitrosativo del biofilm y respuesta de los mecanismos antioxidantes

Cuando se analizó la producción de $O_2^{\bullet-}$, se observó que para la concentración más activa de **AQ2 + AMB** se incrementó notablemente los niveles de esta ERO, incluso en mayor proporción respecto al observado para **AQ2** sobre el biofilm cuando recibió el tratamiento de irradiación a t = 0, 3, 6, 24, 27, 30 h (Fig. 4.43 A). Por otro lado, las combinaciones de **AQ1 + AMB** y de **AQ1 + AQ2** no produjeron incremento de $O_2^{\bullet-}$.

Figura 4.43 Desbalance redox de las combinaciones a las concentraciones más activas con tratamiento de irradiación y en oscuridad (combinación + tratamiento de irradiación), en comparación con las concentraciones más activas de las Aqs en forma individual (Aqs individual + tratamiento de irradiación). (A) Producción de $O_2^{\bullet-}$. (B) Generación de ERN.

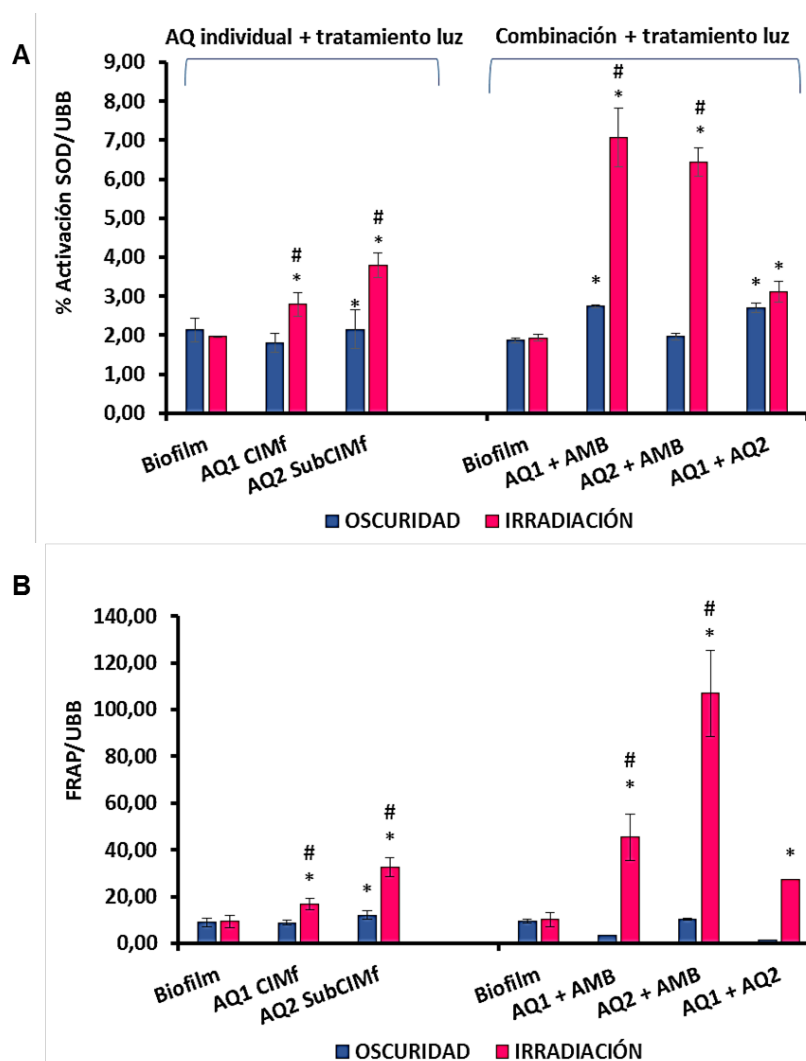


AQ1: rubiadina, AQ2: 1-metil éter de rubiadina; AMB: anfotericina B
 * $p < 0.05$ respecto al biofilm, # $p < 0.05$ Oscuridad vs. Irradiación.

Todas las combinaciones más activas aumentaron las ERN con el tratamiento de irradiación, siendo mayores los niveles para **AQ1 + AMB**, seguida por la combinación **AQ2 + AMB**, y finalmente **AQ1 + AQ2** (Fig. 4.43 B).

Además, se observó activación de la enzima SOD para todas estas combinaciones, resultando mayor su activación para las combinaciones de las Aqs con AMB (Fig. 4.44 A). Los niveles de FRAP también se incrementaron con el tratamiento de irradiación; la mayor activación se observó para la combinación de **AQ2 + AMB** (Fig. 4.44 B).

Figura 4.44 Desbalance redox de las combinaciones a las concentraciones más activas con tratamiento de irradiación y en oscuridad (combinación + tratamiento de irradiación), en comparación con las concentraciones más activas de las Aqs en forma individual (Aqs individual + tratamiento de irradiación). **(A)** Activación de la enzima SOD. **(B)** Capacidad antioxidante total.



AQ1: rubiadina, AQ2: 1-metil éter de rubiadina; AMB: anfotericina B
^{*}*p*<0.05 respecto al biofilm, [#]*p*<0.05 Oscuridad vs. Irradiación.

Estos resultados explicarían el mayor %R obtenido para la combinación **AQ2** + AMB, debido a la elevada producción de $O_2^{\bullet-}$ que es acompañada por el importante incremento en las ERN. Aunque se genera una importante activación de los sistemas antioxidantes del biofilm, no sería suficiente para impedir el desbalance oxidativo y nitrosativo. En cambio, para la combinación **AQ1** + AMB, sólo se observa un significativo desbalance nitrosativo, ya que no hay incremento en la producción de $O_2^{\bullet-}$; el cual estaría equilibrado por la significativa activación de la SOD. La actividad de la combinación de **AQ1** + **AQ2** exhibió un comportamiento similar al de **AQ1** + AMB, donde sólo se observó un desbalance nitrosativo y un leve incremento de las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas que resultarían suficientes para contrarrestar el desbalance en el estrés generado.

Dado que sobre el biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111, ambas AQs mostraron un efecto antibiofilm fotoestimulado moderado, se propuso aumentar el %R mediante un incremento en la irradiación. Teniendo en cuenta las condiciones óptimas de irradiación establecidas, se decidió mantener el mismo intervalo de tiempo (15 min), pero repitiendo esta irradiación a distintos tiempos durante la incubación. En conclusión, este aumento en la frecuencia de irradiación del biofilm tratado con cada AQ individualmente, permitió reducir la concentración activa a la mitad. Para **AQ2** no sólo permitió el uso de concentraciones SubCIMf, si no que potenció notablemente la fotoactivación de biofilms de *C. tropicalis* (62,9 %R) en comparación a cuando se irradió antes de la incubación (t = 0, 47 %R). Por lo tanto, la capacidad de acumulación de esta AQ en el biofilm, aumentaría notablemente el efecto antifúngico, pudiendo tener un importante impacto clínico. Para curcumina, un FS natural, se demostró que la mayor inactivación del biofilms de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. dubliniensis* se produjo con irradiación a los 20 min, tiempo necesario para que el FS se acumule en el biofilm (Andrade *et al.*, 2012).

Otra estrategia para mejorar el efecto antibiofilm de estas AQs fue combinarlas con AMB. Los resultados obtenidos sugieren que cada AQ fotoactivada podría utilizarse hasta en concentraciones SubCIMf para potenciar la actividad de AMB sobre biofilms de *C. tropicalis*, como así también combinadas entre sí. De la misma manera, cuando se sumaron los efectos del tratamiento de irradiación con la combinación de cada AQ con AMB, se potenció aún más el efecto antibiofilm de las combinaciones.

Hay varios mecanismos propuestos para la sinergia de compuestos antifúngicos. La potenciación del efecto de las combinaciones podría explicarse por una lado, por el aumento de la penetración de las AQs en las células fúngicas, ya que AMB actúa generando poros en la membrana celular (Ghannoum & Rice, 1999), lo

cual le permitiría a las AQS mayor acceso al interior de las células ejerciendo allí su acción. A su vez, el efecto de las combinaciones podría explicarse también por el diferente mecanismo de acción que presenta cada compuesto de manera individual (Johnson *et al.*, 2004). Así podría estar desarrollándose una inhibición simultánea de diferentes dianas de las células fúngicas, dado que AMB actúa a nivel de la membrana celular y la actividad antibiofilm de las AQS está mediada por el mecanismo fotosensibilizante Tipo I, el cual se traduce en un estrés oxidativo acompañado por estrés nitrosativo generalizado (Ghannoum & Rice, 1999; Marioni *et al.*, 2016b). También se ha demostrado que la actividad de AMB parece correlacionarse con la acumulación de ERO en la célula fúngica (Delattin *et al.*, 2014). Por lo tanto, el desbalance del sistema de defensa frente al estrés oxidativo de células fúngicas por la combinación de AMB con las AQS, incrementaría la cantidad de ERO que se acumulan, y consecuentemente mejora la actividad fungicida en el biofilm.

Es importante destacar que otro compuesto natural, la curcumina, también ha demostrado efectos sinérgicos en *C. albicans* cuando fue combinada con AMB y fluconazol. A su vez, esta sinergia estuvo relacionada con la generación de ERO (Sharma *et al.*, 2010). También se ha descrito efectos aditivos y sinérgicos al combinar TFDa, utilizando como FS una porfirina catiónica, con tobramicina o cloranfenicol sobre cepas de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Dastgheyb *et al.*, 2013).

V. CONCLUSIONES

Conclusiones

De este trabajo de tesis doctoral se puede concluir que, rubiadina y 1-metil éter de rubiadina, dos AQs naturales purificadas a partir de *H. pustulata*, con propiedades fotosensibilizantes (Núñez Montoya et al., 2005), mostraron un importante efecto antibiofilm en *C. tropicalis* bajo la acción de la luz. Este efecto estuvo regulado principalmente por el mecanismo fotosensibilizante Tipo I, generando consecuentemente un desbalance redox.

Es importante destacar que en esta tesis se ha desarrollado un modelo de biofilm de *Candida* que permite evaluar la actividad de compuestos FS y que además se podría aplicar en otras especies de *Candida*, incluso especies que son débiles productoras de biofilms.

A pesar del significativo efecto reductor de estas AQs sobre el biofilm, ninguna logró su erradicación completa. Esto podría deberse a la alta capacidad de formación de biofilms que presentaron las cepas seleccionadas, siendo esta biomasa necesaria para los estudios de los metabolitos reactivos del oxígeno y del nitrógeno. Además, como ya se mencionó, la resistencia de los biofilms es compleja ya que involucra variados mecanismos.

Por otro lado, se determinó que **AQ1** es más activa que **AQ2**, tanto en células Vero como en levaduras en forma planctónica y formando biofilms. Esto podría explicarse por la diferencia estructural, la presencia del grupo metoxi (-OCH₃) en **AQ2** le conferiría menor citotoxicidad. A su vez, **AQ2** es menos polar que **AQ1** (Comini et al., 2006). Esto favorece la capacidad de **AQ2** para atravesar membranas biológicas, así como su incorporación en el biofilm. Por lo tanto, esto explicaría el hecho de que su actividad antibiofilm se incremente cuando se aumenta la frecuencia de irradiación.

Otra estrategia aplicada para mejorar la actividad de las AQs fue la combinación con AMB, que potenció el efecto antibiofilm bajo irradiación y redujo las concentraciones activas tanto de las AQs como de AMB, respecto al tratamiento realizado con cada compuesto sólo.

Finalmente, los resultados presentados muestran que **AQ1** y **AQ2** bajo la acción de la luz actínica, producen ERO, generando un efecto fototóxico sobre biofilms de *C. tropicalis*, en concentraciones no tóxicas para células de mamífero (Vero). Por ello, se podría establecer el uso de estas AQs como potenciales fotosensibilizadores biológicos, solas o en combinación con AMB, para el tratamiento de infecciones causadas por biofilms de *C. tropicalis*.

VI. PROYECCIONES

A partir de los resultados obtenidos, se propone expandir el estudio de estos compuestos.

En una primera instancia, para complementar los estudios realizados sobre el desbalance redox (oxidativo y nitrosativo) en el biofilm, sería interesante cuantificar los niveles de otras ERO involucradas tales como H_2O_2 , $HO\cdot$; así como otras ERN como $ONOO\cdot$. Asimismo, se propone evaluar la actividad de otras enzimas que intervienen en la capacidad antioxidante, como CAT y GSH. Para complementar los estudios llevados a cabo, sería de interés el estudio del efecto de las ERO y ERN generadas sobre las principales biomoléculas (ADN, proteínas y lípidos) del biofilm. A su vez, resulta de interés estudiar como el sistema inmune responde frente al tratamiento propuesto con estas AQs.

Por otro lado, debido a la presencia de otros derivados antraquinónicos en el extracto bioactivo de *H. pustulata* (Ben), los cuales han sido caracterizados por sus propiedades fotosensibilizantes, se propone evaluar la actividad de estas otras AQs en su capacidad para inactivar fotodinámicamente biofilms de *Candida* spp.

Otras estrategias que se podrían evaluar con el fin de de mejorar la actividad de las AQs ensayadas en esta tesis (**AQ1** y **AQ2**), serían por un lado, su combinación con otros antifúngicos utilizados actualmente en los tratamientos terapéuticos. Y por el otro lado, probar su vehiculización en diferentes sistemas macro- y supermoleculares biocompatibles, de dimensiones nanométricas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abramoff, M.D., Magalhaes, P.J., Ram, S.J. (2004) "Image Processing with ImageJ". *Biophotonics International*, 11(7), 36-42.
- Administración Nacional de Alimentos y Tecnología Médica, ANMAT. Disponible en: <http://www.anmat.gov.ar/>. Último acceso septiembre 2016.
- Ahmed, M., & Khan, Z. H. (1995). Molecular Orbital Studies on Electronic Spectra of Some Substituted Anthraquinone Cation Radicals. *Acta Physica Polonica-Series A General Physics*, 87(6), 939-952.
- Al-Fattani, M. A., & Douglas, L. J. (2006). Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of medical microbiology*, 55(8), 999-1008.
- Andrade, M. C., Ribeiro, A. P. D., Dovigo, L. N., Brunetti, I. L., Giampaolo, E. T., Bagnato, V. S., & Pavarina, A. C. (2013). Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. *Archives of oral biology*, 58(2), 200-210.
- Angel Villegas, N., Baronetti, J., Albesa, I., Polifroni, R., Parma, A., Etcheverría, A., Becerra, M. C., Padola, N. & Paraje, M. G. (2013). Relevance of biofilms in the pathogenesis of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection. *The Scientific World Journal*, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/607258>.
- Angel Villegas, N., Baronetti, J.L., Albesa, I., Etcheverría, A., Becerra, M.C., Padola, N.L., Paraje, M.G. (2015). Effect of antibiotics on cellular stress generated in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 and non-O157 biofilms. *Toxicology In Vitro*, 29 (7), 1692-700.
- Arce Miranda, J. E., Sotomayor, C. E., Albesa, I., & Paraje, M. G. (2011). Oxidative and nitrosative stress in *Staphylococcus aureus* biofilm. *FEMS microbiology letters*, 315(1), 23-29.
- Astuti, R. I., Nasuno, R., & Takagi, H. (2016). Nitric oxide signaling in yeast. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(22), 9483-9497.
- Bacigalupo NM Rubiaceae. En: Cabrera AL (ed.), Flora de la Provincia de Jujuy. *Colección Científica INTA* 1993; INTA, Buenos Aires; tomo XIII, parte IX, 375-80.
- Baltazar, L. M., Ray, A., Santos, D. A., Cisalpino, P. S., Friedman, A. J., & Nosanchuk, J. D. (2015). Antimicrobial photodynamic therapy: An effective alternative approach to control fungal infections. *Frontiers in Microbiology*, 6, 202. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00202>.
- Baronetti, J. L., Villegas, N. A., Aiassa, V., Paraje, M. G., & Albesa, I. (2013). Hemolysin from *Escherichia coli* induces oxidative stress in blood. *Toxicon*, 70, 15-20.
- Baronetti, J. L., Villegas, N. A., Paraje, M. G., & Albesa, I. (2011). Nitric oxide-mediated apoptosis in rat macrophages subjected to Shiga toxin 2 from *Escherichia coli*. *Microbiology and immunology*, 55(4), 231-238.
- Barraud, N., Schleheck, D., Klebensberger, J., Webb, J. S., Hassett, D. J., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2009). Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *Journal of bacteriology*, 191(23), 7333-7342.
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1), 276-287.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.

- Bergamo, V. Z., Balbuena, E. A., Hatwig, C., Pippi, B., Dalla Lana, D. F., Donato, R. K., & Fuentefria, A. M. (2015). 1-n-Hexadecyl-3-methylimidazolium methanesulfonate and chloride salts with effective activities against *Candida tropicalis* biofilms. *Letters in applied microbiology*, *61*(5), 504-510.
- Bink, A., Kucharíková, S., Neirinck, B., Vleugels, J., Van Dijck, P., Cammue, B. P., & Thevissen, K. (2012). The nonsteroidal antiinflammatory drug diclofenac potentiates the in vivo activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Journal of Infectious Diseases*, *206*(11), 1790-1797.
- Bizerra, F. C., Nakamura, C. V., De Poersch, C., Svidzinski, T. I. E., Quesada, R. M. B., Goldenberg, S., Krieger, M. A., & Yamada-Ogatta, S. F. (2008). Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res*, *8*, 442–450.
- Bonnett, R. (2000). Chemical aspects of photodynamic therapy (Advanced chemistry texts; v1). Netherlands, British Library Cataloguing in Publication Data.
- Boots, A. W., Haenen, G. R., & Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European journal of pharmacology*, *585*(2), 325-337.
- Boren Freund E., Puerner J.A. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, *24*, 119-124.
- Brown, A. J., Haynes, K., & Quinn, J. (2009). Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. *Current opinion in microbiology*, *12*(4), 384-391.
- Calzavara-Pinton, P., Rossi, M. T., Sala, R., & Venturini, M. (2012). Photodynamic antifungal chemotherapy. *Photochemistry and photobiology*, *88*(3), 512-522. <http://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01107.x>
- Cao, Y. Y., Cao, Y. B., Xu, Z., Ying, K., Li, Y., Xie, Y., Zhu, Z. Y., Chen, W. S., Jiang, Y. Y. (2005). cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(2), 584–589.
- Choi, J. R., Jeoung, S. C., & Cho, D. W. (2004). Two-photon-induced excited-state intramolecular proton transfer process in 1-hydroxyanthraquinone. *Chemical physics letters*, *385*(5), 384-388.
- Cholewa, M., Legge, G. J. F., Weigold, H., Holan, G., & Birch, C. J. (1994). The use of a scanning proton microprobe to observe anti-HIV drugs within cells. *Life sciences*, *54*(21), 1607-1612.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Second Edition. CLSI document M27-A2 (ISBN1-56238-469-4). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2002.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Third Edition. CLSI Document M27-A3 (ISBN 1-56238-666-2). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2008.
- Colombo, A. L., Tobón, A., Restrepo, A., Queiroz-Telles, F., & Nucci, M. (2011). Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Medical mycology*, *49*(8), 785-798.
- Comini, L. R., Montoya, S. C. N., Sarmiento, M., Cabrera, J. L., & Argüello, G. A. (2007). Characterizing some photophysical, photochemical and photobiological

- properties of photosensitizing anthraquinones. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 188(2), 185-191.
- Comini, L. R., Núñez Montoya, S. C., Argüello Gustavo, A., & Cabrera, J. L. (2006). Determinación del coeficiente de partición (log P) para derivados antraquinónicos aislados de *Heterophyllaea pustulata* Hook. f.(Rubiáceas). *Acta Farmacéut. Bonaerense*, 25(2), 252-255.
- Comini, L.R., Fernandez, I.M., Rumie Vittar, N.B., Núñez Montoya, S.C., Cabrera, J.L., Rivarola, V.A. (2011). Photodynamic activity of anthraquinones isolated from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (*Rubiaceae*) on MCF-7c3 breast cancer cells. *Phytomedicine*, 18 (12), 1093-1095.
- COMSTAT. Technical University of Denmark, Kongens Lyngby, Dinamarca. Disponible en: <http://www.comstat.dk>. Último acceso marzo 2016.
- Cornistein, W., Mora, A., Orellana, N., & Caparelli, F. J., & del Castillo, M. (2013). *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no *albicans*. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(6), 380–384. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.09.011>.
- Cuéllar-Cruz, M., López-Romero, E., Ruiz-Baca, E., & Zazueta-Sandoval, R. (2014). Differential response of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to oxidative and nitrosative stresses. *Current microbiology*, 69(5), 733-739.
- Dai, T., Fuchs, B. B., Coleman, J. J., Prates, R. A., Astrakas, C., Denis, T. G. S., Ribeiro, M. S., Mylonakis, E., Hamblin, M. R., & Tegos, G. P. (2012). Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Frontiers in Microbiology*, 3(April), 1–16. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00120>.
- Dastgheyb, S. S., Eckmann, D. M., Composto, R. J., & Hickok, N. J. (2013). Photo-activated porphyrin in combination with antibiotics: Therapies against *Staphylococci*. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 129, 27–35. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.09.006>.
- De Melo, W. C., Avci, P., de Oliveria, M. N., Gupta, A., Vecchio, D., Sadasivam, M., Hamblin, M. R., & Tegos, G. P. (2013). Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 11(7), 669–693. <http://doi.org/10.1038/nature13314>.
- Del Giacco, T., Latterini, L., & Elisei, F. (2003). Photophysical and photochemical properties of 1, 2, 4-trihydroxy-9, 10-antraquinone adsorbed on inorganic oxides. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2(6), 681-687.
- Delattin, N., Cammue, B. P. a, & Thevissen, K. (2014). Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. *Future Medicinal Chemistry*, 6(1), 77–90. <http://doi.org/10.4155/fmc.13.189>.
- Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. (2011). Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers in Surgery and Medicine*, 43(9), 927–934.
- Eisfeld, A., & Briggs, J. S. (2006). The J-and H-bands of organic dye aggregates. *Chemical Physics*, 324(2), 376-384.
- Falagas, M. E., Roussos, N., & Vardakas, K. Z. (2010). Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(11), e954-e966.

- Fanning, S., & Mitchell, A.P. (2012). Fungal Biofilms. *PLoS Pathog*, 8(4):e1002585. doi:10.1371/journal.ppat.1002585
- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. *Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18515-18517.
- Frohner, I. E., Bourgeois, C., Yatsyk, K., Majer, O., & Kuchler, K. (2009). *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Molecular microbiology*, 71(1), 240-252.
- Fujita, M., Ishida, A., Majima, T., & Takamuku, S. (1996). Lifetimes of radical anions of dicyanoanthracene, phenazine, and anthraquinone in the excited state from the selective electron-transfer quenching. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(13), 5382-5387.
- Gad, F., Zahra, T., Francis, K. P., Hasan, T., & Hamblin, M. R. (2004). Targeted photodynamic therapy of established soft-tissue infections in mice. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3(5), 451-458.
- Gambino, M., & Cappitelli, F. (2016) Mini-review: Biofilm responses to oxidative stress, *Biofouling*, 32(2), 167-178, DOI: 10.1080/08927014.2015.1134515.
- García-Vidal, C., & Carratalà, J. (2012). Patogenia de la infecció fúngica invasora. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(3), 151–158. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.011>.
- Gasparetto, A., Lapinski, T. F., Zamuner, S. R., Khouri, S., Alves, L. P., Munin, E., & Salvador, M. J. (2010). Extracts from *Alternanthera maritima* as natural photosensitizers in photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 99(1), 15-20.
- Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 501-517.
- Goldani, L. Z., & Mário, P. S. S. (2003). *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. *Journal of Infection*, 46(3), 155–160. <http://doi.org/10.1053/jinf.2002.1067>.
- Gonzales, F. P., & Maisch, T. (2012). Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. *Fungal biology*, 116(1), 1-10.
- Gouloumis, A., González-Rodríguez, D., Vázquez, P., Torres, T., Liu, S., Echegoyen, L., & Guldi, D. M. (2006). Control over charge separation in phthalocyanine-anthraquinone conjugates as a function of the aggregation status. *Journal of the American Chemical Society*, 128(39), 12674-12684.
- Graham, A. R. (1983). Fungal autofluorescence with ultraviolet illumination. *American journal of clinical pathology*, 79(2), 231-234.
- Hamblin, M. R. (2016). Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 33, 67–73. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2016.06.008>.
- Hansen EW, Martiarena CA. Contribución al estudio de la toxicidad de *Heterophyllaea pustulata* Hook “cegadera” en el ganado. Rev Inv Agropecuarias (INTA) 1967; serie 4: Patología Animal, 4, 81-113.
- He, D., Chen, B., Tian, Q., & Yao, S. (2009). Simultaneous determination of five anthraquinones in medicinal plants and pharmaceutical preparations by HPLC with fluorescence detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 49(4), 1123-1127.

- Horwitz, W. (1982). Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemistry*, 54(1), 67A-76A.
- Hughes, M. N. (2008). Chapter One-Chemistry of Nitric Oxide and Related Species. *Methods in enzymology*, 436, 3-19.
- Hurtado Bredda, F., Vaeza, N. N., & Amonini, H. R. (2005). Estrés oxidativo y nitrosativo en la sepsis. *Medicina intensiva*, 29(3), 159-165.
- International Conference on Harmonization (2005). ICH Q2A: Text on validation of analytical procedures. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073381.pdf>. Último acceso agosto 2015
- International Conference on Harmonization (2005). ICH Q2B: Validation of analytical procedures: methodology. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073384.pdf>. Último acceso agosto 2015.
- Jiménez-Banzo, A., Ragas, X., Kapusta, P., & Nonell, S. (2008). Time-resolved methods in biophysics. 7. Photon counting vs. analog time-resolved singlet oxygen phosphorescence detection. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 7(9), 1003-1010.
- Johnson, M. D., MacDougall, C., Ostrosky-Zeichner, L., Perfect, J. R., & Rex, J. H. (2004). Combination antifungal therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(3), 693-715. <http://doi.org/10.1128/AAC.48.3.693>.
- Jori, G., Fabris, C., Soncin, M., Ferro, S., Coppellotti, O., Dei, D., Fantetti, L., Chiti, G., & Roncucci, G. (2006). Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers in surgery and medicine*, 38(5), 468-481.
- Kasim, N. A., Whitehouse, M., Ramachandran, C., Bermejo, M., Lennernäs, H., Hussain, A. S., & Amidon, G. L. (2004). Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Molecular pharmaceutics*, 1(1), 85-96.
- Kojic, E. M., & Darouiche, R. O. (2004). *Candida* infections of medical devices. *Clinical microbiology reviews*, 17(2), 255-267.
- Konigheim, B. S., Beranek, M., Comini, L. R., Aguilar, J. J., Marioni, J., Cabrera, J. L., Contigiani, M.S. & Montoya, S. C. (2012a). In vitro antiviral activity of *Heterophyllaea pustulata* extracts. *Natural product communications*, 7(8), 1025-1028.
- Konigheim, B. S., Comini, L. R., Grasso, S., Aguilar, J. J., Marioni, J., Cabrera, J. L., Contigiani, M. S., & Núñez Montoya, S.C. (2012b). Determination of non-toxic and subtoxic concentration of potential antiviral natural anthraquinones. *Latin American Journal of Pharmacy*, 31(8), 51-56.
- Kothavade, R. J., Kura, M. M., Valand, A. G., & Panthaki, M. H. (2010). *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of Medical Microbiology*, 59(8), 873-880. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.013227-0>.
- Laustriat, G. (1986). Molecular mechanisms of photosensitization. *Biochimie*, 68, 771-778.
- Levine, I. N., 1996. Físicoquímica. 5ª edición. McGraw-Hill. Madrid, España

- Liu A-L, Shu S-H, Qin H-L, Lee SMY, Wang Y-T, Du G-H. (2009). In vitro anti-influenza viral activities of constituents from *Caesalpinia sappan*. *Planta Medica*, 75, 337–339.
- López-Chicón, P., Paz-Cristobal, M. P., Rezusta, A., Aspiroz, C., Royo-Cañas, M., Andres-Ciriano, E., Gilaberte, Y., Agut, M., & Nonell, S. (2012). On the mechanism of *Candida* spp. photoinactivation by hypericin. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11(6), 1099-1107.
- Luque, A. G., Biasoli, M. S., Tosello, M. E., Binolfi, A., Lupo, S., & Magaró, H. M. (2009). Oral yeast carriage in HIV-infected and non-infected populations in Rosario, Argentina. *Mycoses*, 52(1), 53-59.
- Mamone, L., Sáenz, D., Vallecorsa, P., Batlle, A., Casas, A., & Di Venosa, G. (2014). Photoprotective Effect of the Plant *Collaea argentina* against Adverse Effects Induced by Photodynamic Therapy. *International Journal of Photoenergy*, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/436463>.
- Marchesi, E., Rota, C., Fann, Y. C., Chignell, C. F., & Mason, R. P. (1999). Photoreduction of the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein: a spin trapping and direct electron spin resonance study with implications for oxidative stress measurements. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1), 148-161.
- Marioni, J., Arce, J. E., Cabrera, J. L., Paraje, M. G., & Núñez Montoya, S. C. (2016a). Reduction of *Candida tropicalis* biofilm by photoactivation of a *Heterophyllaea pustulata* extract. *Pharmaceutical biology*, 54(12):2791-2801.
- Marioni, J., da Silva, M. A., Cabrera, J. L., Montoya, S. C. N., & Paraje, M. G. (2016b). The anthraquinones rubiadin and its 1-methyl ether isolated from *Heterophyllaea pustulata* reduces *Candida tropicalis* biofilms formation. *Phytomedicine*, 23(12), 1321-1328.
- Martí, C., Jürgens, O., Cuenca, O., Casals, M., & Nonell, S. (1996). Aromatic ketones as standards for singlet molecular oxygen O₂ (1Δg) photosensitization. Time-resolved photoacoustic and near-IR emission studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 97(1), 11-18.
- Mattila, H., Khorobrykh, S., Havurinne, V., & Tyystjärvi, E. (2015). Reactive oxygen species: reactions and detection from photosynthetic tissues. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 152, 176–214. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.10.001>
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119-128.
- Meerovich, I., Muthukrishnan, N., Johnson, G. A., Erazo-Oliveras, A., & Pellois, J. P. (2014). Photodamage of lipid bilayers by irradiation of a fluorescently labeled cell-penetrating peptide. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(1), 507-515.
- Mishra, N., Prasad, T., Sharma, N., Payasi, A., Prasad, R., Gupta, D., & Singh, R. (2007). Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 54(3), 201-235.
- Missall, T. A., Lodge, J. K., & McEwen, J. E. (2004). Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryotic cell*, 3(4), 835-846.
- Morace, G., Perdoni, F., & Borghi, E. (2014). Antifungal drug resistance in *Candida* species. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2(4), 254-259.

- Mukherjee, P. K., Zhou, G., Munyon, R., & Ghannoum, M. A. (2005). *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. *Medical mycology*, 43(3), 191-208.
- Nagy, E.M., Via, L.D., Ronconi, L., Fregona, D. (2010). Recent advances in PUVA photochemotherapy and PDT for the treatment of cancer 1863–1876. *Current pharmaceutical design*, 16(16), 1863-1876.
- Nett, J. E., & Andes, D. (2015). Fungal Biofilms: In vivo models for discovery of anti-biofilm drugs. *Microbiology Spectrum*, 3(3), 1–25. <http://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0008-2014>.
- Nithyanand, P., Shafreen, R. M. B., Muthamil, S., & Pandian, S. K. (2015). Usnic acid, a lichen secondary metabolite inhibits Group A *Streptococcus* biofilms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(1), 263-272.
- Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Tobón, A. M., Restrepo, A., & Colombo, A. L. (2010). Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*, 51(5), 561–570. <http://doi.org/10.1086/655683>.
- Núñez Montoya, S. C., Agnese, A. M., & Cabrera, J. L. (2006). Anthraquinone Derivatives from *Heterophyllaea pustulata*. *Journal of natural products*, 69(5), 801-803.
- Núñez Montoya, S. C., Comini, L. R., Sarmiento, M., Becerra, C., Albesa, I., Argüello, G. A., Cabrera, J.L. (2005). Natural anthraquinones probed as Type I and Type II photosensitizers: singlet oxygen and superoxide anion production. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 78, 77–83. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2004.09.009>.
- Núñez Montoya, S.C. (2002). Metabolitos secundarios en *Heterophyllaea pustulata* Hook.f. (Rubiáceas). [Tesis Doctoral]. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Núñez Montoya, S.C., Agnese, A.M., Pérez, C., Tiraboschi, I.N., & Cabrera, J.L. (2003). Pharmacological and toxicological activity of *Heterophyllaea pustulata* anthraquinone extracts. *Phytomedicine*, 10, 569-574.
- Núñez Montoya, S.C., Comini, L.R., Rumie Vittar, B., Fernández, I.M., Rivarola, V.A., Cabrera, J.L. (2008). Phototoxic effects of *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). *Toxicon*, 51, 1409–1415.
- O’Riordan, K., Akilov, O. E., & Hasan, T. (2005). The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(4), 247-262.
- Ochsner, M. (1997). Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 39(1), 1-18.
- Ogilby, P. R., & Foote, C. S. (1982). Chemistry of singlet oxygen. 36. Singlet molecular oxygen ($^1\Delta_g$) luminescence in solution following pulsed laser excitation. Solvent deuterium isotope effects on the lifetime of singlet oxygen. *Journal of the American Chemical Society*, 104(7), 2069-2070.
- Ooi, L. S., Wang, H., Luk, C. W., & Ooi, V. E. (2004). Anticancer and antiviral activities of *Youngia japonica* (L.) DC (*Asteraceae*, *Compositae*). *Journal of ethnopharmacology*, 94(1), 117-122.
- O’Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular microbiology*, 28(3), 449-461.

- Palit, D. K., Pal, H., Mukherjee, T., & Mittal, J. P. (1990). Photodynamics of the S1 state of some hydroxy-and amino-substituted naphthoquinones and anthraquinones. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, *86*(23), 3861-3869.
- Panichayupakaranant, P., Sakunpak, A., & Sakunphueak, A. (2009). Quantitative HPLC determination and extraction of anthraquinones in *Senna alata* leaves. *Journal of chromatographic science*, *47*(3), 197-200.
- Paraje, M.G., Correa, Albesa, I., Sotomayor, C.E. (2009). Lipase of *Candida albicans* induces activation of NADPH oxidase and L-arginine pathways on resting and activated macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *390*(2), 263-268. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.09.104.
- Paraje, M.G., Correa, S.G., Theumer, M., Renna, M.S., Sotomayor, C.E. (2008). *Candida albicans* lipase: potential role in virulence and fungal pathogenesis. *Canadian Journal of Microbiology*, *54*(8), 647-659.
- Paz-Cristobal, M.P., Gilaberte, Y., Alejandre, C., Pardo, J., Revillo, M.J., Rezusta, A. (2014). In vitro fungicidal photodynamic effect of hypericin on *Trichophyton* spp. *Mycopathologia*, *178*(3-4), 221–225.
- Paz-Cristobal, M.P., Royo, D., Rezusta, A., Andres-Ciriano, E., Alejandre, M.C., Meis, J.F., Revillo, M.J., Aspiroz, C., Nonell S., Gilaberte Y. (2013). Photodynamic fungicidal efficacy of hypericin and dimethyl methylene blue against azole-resistant *Candida albicans* strains. *Mycoses*, *57*(1), 35-42. doi:10.1111/myc.12099.
- Peralta, M. A., da Silva, M. A., Ortega, M. G., Cabrera, J. L., & Paraje, M. G. (2016). Usnic Acid Activity on Oxidative and Nitrosative Stress of Azole-Resistant *Candida albicans* Biofilm. *Planta Medica*. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0042-116442>.
- Peralta, M.A., da Silva, M.A., Ortega, M.G., Cabrera, J.L., Paraje, M.G. (2015). Antifungal activity of a prenylated flavonoid from *Dalea elegans* against *Candida albicans* biofilms. *Phytomedicine*, *22* (11), 975-80.
- Permán, J., & Salavert, M. (2012). Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *30*(2), 90-98.
- Permana, D., Abas, F., Ahmad, R., & Takayama, H. (2003). Antioxidative Constituents of *Hedyotis diffusa* Willd. *Natural Product Sciences*, *9*(1), 7-9.
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, *20*(1), 133–163. <http://doi.org/10.1128/CMR.00029-06>.
- Pfaller, M. A., Castanheira, M., Messer, S. A., Moet, G. J., & Jones R. N. (2010). Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *68*(3): 278–283.
- Pianalto, K. M., & Alspaugh, J. A. (2016). New Horizons in antifungal therapy. *Journal of Fungi*, *2*(4), 26.
- Pierce, C. G., Uppuluri, P., Tristan, A. R., Wormley, F. L., Mowat, E., Ramage, G., & Lopez-Ribot, J. L. (2008). A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature protocols*, *3*(9), 1494-1500.
- Powers, S. K., Ji, L. L., Kavazis, A. N., & Jackson, M. J. (2011). Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Comprehensive Physiology*, *1*(2):941-69. doi: 10.1002/cphy.c100054.

- Quattrocchi, O.A., de Andrizzi, S.I.A., & Laba, R.F. (1992). Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro S.A., Buenos Aires, Argentina. pp 301-328.
- Ragàs, X., Agut, M., & Nonell, S. (2010). Singlet oxygen in *Escherichia coli*: new insights for antimicrobial photodynamic therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(5), 770-776.
- Rajendran, M. (2016). Quinones as photosensitizer for photodynamic therapy: ROS generation, mechanism and detection methods. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 13, 175-187.
- Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., & Williams, C. (2012). Fungal biofilm resistance. *International Journal of Microbiology*, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/528521>.
- Rezusta, A., Lopez-Chicon, P., Paz-Cristobal, M.P., Alemany-Ribes, M., Royo-Diez, D., Agut, M., Semino, C., Nonell, S., Revillo, M.J., Aspiroz, C., Gilaberte, Y. (2012). *In vitro* fungicidal photodynamic effect of hypericin on *Candida* species. *Photochemistry and Photobiology*. 88(3), 613–619.
- Ridnour, L.A. , Thomas, D.D. , Mancardi, D. , Espey, M.G. , Miranda, K.M. , Paolucci, N. , Feelisch, M. , Fukuto, J. , Wink, D.A.. (2004). The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biological Chemistry*, 385(1), 1–10.
- Román, E., Prieto, D., Martín, R., Correia, I., Mesa Arango, A. C., Alonso-Monge, R., Zaragoza, O., & Pla, J. (2016). Role of catalase overproduction in drug resistance and virulence in *Candida albicans*. *Future Microbiology*, 11(10), 1279-1297.
- Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Giannini, M. M. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of medical microbiology*, 62(1), 10-24. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>
- Schmidt, R., Tanielian, C., Dunsbach, R., & Wolff, C. (1994). Phenalenone, a universal reference compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen O₂ (1Δg) sensitization. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 79(1), 11-17.
- Scorzoni, L., Sangalli-Leite, F., de Lacorte Singulani, J., Costa-Orlandi, C. B., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2016). Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. *Journal of microbiological methods*, 123, 68-78. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.02.005>.
- Shida T., (1988). Electronic absorption spectra of radical ions. (Vol 34). Elsevier Science Ltd.
- Sifuentes-osornio, J., Corzo-león, D. E., & Ponce-de-león, L. A. (2012). Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. *Curr Fungal Infect Rep*, 6(1): 23–34. <http://doi.org/10.1007/s12281-011-0081-7>.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS microbiology reviews*, 36(2), 288-305.
- Silva, Z. S., Bussadori, S. K., Fernandes, K. P. S., Huang, Y. Y., & Hamblin, M. (2015). Animal models for photodynamic therapy (PDT). *Bioscience reports*, 35(6). pii: e00265. doi: 10.1042/BSR20150188.

- Skoog, D. A., Holler F. J., Nieman, T. A., 2008. Principios de análisis instrumental. 6^o edición. Cengage Learning Editores. D.F., México.
- Smulevich, G., Foggi, P., Feis, A., & Marzocchi, M. P. (1987). Fluorescence excitation and emission spectra of 1, 8-dihydroxyanthraquinone-d0 and-d2 in n-octane at 10 K. *The Journal of chemical physics*, 87(10), 5664-5669.
- Snyder, J. W., Skovsen, E., Lambert, J. D., Poulsen, L., & Ogilby, P. R. (2006). Optical detection of singlet oxygen from single cells. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8(37), 4280-4293.
- Spampinato, C., & Leonardi, D. (2013). *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed research international*, 2013. <http://doi.org/10.1155/2013/204237>.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I., et al. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), 891e899. http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.
- Tillmann, A., Gow, N. A., & Brown, A. J. (2011). Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in yeast. *Biochemical Society Transactions*, 39(1), 219-223.
- Tobudic, S., Kratzer, C., Lassnigg, A., & Presterl, E. (2012). Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses*, 55(3), 199-204.
- Tsikis, D. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*, 851(1), 51-70.
- Valentín, A., Cantón, E., Pemán, J., Fernandez-Rivero, M. E., Tormo-Mas, M. A., & Martínez, J. P. (2016). In vitro activity of anidulafungin in combination with amphotericin B or voriconazole against biofilms of five *Candida* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(12):3449-3452.
- Vandeputte, P., Ferrari, S., & Coste, A. T. (2012). Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International Journal of Microbiology*, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/713687>.
- Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, M. 1984, Plant Drug Analysis. 2^o edición Springer Verlag. Berlin, Alemania.
- Wainwright, M., Maisch, T., Nonell, S., Plaetzer, K., Almeida, A., Tegos, G. P., & Hamblin, M. R. (2017). Photoantimicrobials—are we afraid of the light?. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(2):e49-e55. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30268-7.
- Wei S-Y, Yao W-X, Ji W-Y, Wei J-Q, Peng S-Q. (2013). Qualitative and quantitative analysis of anthraquinones in rhubarbs by high performance liquid chromatography with diode array detector and mass spectrometry. *Food Chemistry*, 141, 1710–1715.
- Wei, G. X., Xu, X., & Wu, C. D. (2011). In vitro synergism between berberine and miconazole against planktonic and biofilm *Candida* cultures. *archives of oral biology*, 56(6), 565-572.
- Yoon, I., Li, J. Z., & Shim, Y. K. (2013). Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clinical endoscopy*. 46(1), 7-23.
- Zhang, Y., Zhu, Y., Chen, J., Wang, Y., Sherwood, M. E., Murray, C. K., Vrahas, M. S., Hooper, D. C., Hamblin, M. R. & Dai, T. (2016). Antimicrobial blue light inactivation of *Candida albicans*: in vitro and in vivo studies, *Virulence*, 3;7(5):536-45. DOI: 10.1080/21505594.2016.1155015

Bibliografía

Zhou, Y., Wang, G., Li, Y., Liu, Y., Song, Y., Zheng, W., Zhang, N., Hu, X., Yan, S. & Jia, J. (2012). *In vitro* interactions between aspirin and amphotericin B against planktonic cells and biofilm cells of *Candida albicans* and *C. parapsilosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(6), 3250-3260.

Los resultados presentados en esta tesis dieron lugar a los siguientes trabajos:

Artículos científicos publicados

- BS Konigheim, LR Comini, S Grasso, JJ Aguilar, J Marioni, MS Contigiani, SC Núñez Montoya. (2012). Determination of non-toxic and subtoxic concentrations of potential antiviral natural anthraquinones. *Latin American Journal of Pharmacy*, 31(1), 51-56.
- BS Konigheim, M Beranek, LR Comini, JJ Aguilar, J Marioni, MS Contigiani, SC Núñez Montoya, (2012). *In vitro* antiviral activity of *Heterophyllaea pustulata* extracts. *Natural Product Communications*, 7(8), 1025-1028.
- Juliana Marioni, Julio E. Arce, José L. Cabrera, María G. Paraje, Susana C. Núñez Montoya, (2016). Reduction of *Candida tropicalis* biofilm by photoactivation of a *Heterophyllaea pustulata* extract. *Pharmaceutical Biology*, 54(12), 2791-2801. <http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2016.1183683>.
- Juliana Marioni, María Angel da Silva, José L. Cabrera, Susana C. Núñez Montoya, María G. Paraje, (2016). The anthraquinones rubiadin and its 1-methyl ether isolated from *Heterophyllaea pustulata* reduce *Candida tropicalis* biofilms formation. *Phytomedicine*, 23(15), 1321-1328. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2016.07.008>.

Presentaciones a congresos

1 Nacionales

- * XII CONGRESO ARGENTINO DE MICOLOGÍA. Posadas, 15-17/06/2011. Misiones, Argentina.
 - 1) Actividad antifúngica "in vitro" de extractos de *Heterophyllaea pustulata* sobre biofilms de *Candida*. Marioni J, Arce Miranda JE, Botiglieri M, Núñez Montoya SC, Paraje MG.
- * IX CONGRESO DE MICROBIOLOGÍA GENERAL. SOCIEDAD ARGENTINA DE MICOLOGÍA, SAMIGE. UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO, UNR. Rosario, 05-07/08/2013. Rosario, Argentina.
 - 2) Mode of action of extracts from a phototoxic plant on fungal biofilms. Juliana, Marioni; Julio E. Arce Miranda, Laura R. Comini; José L. Cabrera; Susana C. Núñez Montoya; María G. Paraje.
- * II REUNIÓN DE FOTOBIOLOGOS MOLECULARES. GRUPO ARGENTINO DE FOTOBIOLOGÍA, GRAFOB. UNC. Córdoba, 25-28/10/2013. Córdoba, Argentina.
 - 3) *In vitro* antifungal activity of extracts from a phototoxic plant species on *Candida no albicans* biofilms. Juliana, Marioni; Julio E. Arce Miranda, Laura R. Comini; José L. Cabrera; María G. Paraje; Susana C. Núñez Montoya.

*XI CONGRESO DE MICROBIOLOGÍA GENERAL. SAMIGE. Córdoba, 05-07/08/2015. Argentina.

4) Photodynamic action of 1-methyl ether rubiadin, a natural anthraquinone over *Candida tropicalis* biofilms. Marioni J, Cabrera JL, Núñez Montoya SC, Paraje MG.

* III REUNIÓN DE FOTOBIOLOGOS MOLECULARES. GRUPO ARGENTINO DE FOTOBIOLOGÍA, GRAFOB. UNC. Córdoba, 28-31/08/2016. Córdoba, Argentina.

5) Efecto de la frecuencia de irradiación de antraquinonas en la fotoinactivación de *Candida tropicalis* biofilms. Juliana, Marioni; Laura R. Comini; José L. Cabrera; María G. Paraje; Susana C. Núñez Montoya.

6) Producción de oxígeno singlete de productos naturales bioactivos de *Heterophyllaea pustulata*. Juliana, Marioni; Leandro Mamone, Adriana Casas, Susana C. Núñez Montoya.

2 Internacionales

*X SIMPOSIO ARGENTINO Y XIII SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE FARMACOBOTANICA. Córdoba, 24-26/11/2010. Argentina.

1) Estudio químico comparativo de diferentes órganos de *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). Chemical study of different organs from *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). Marioni J, Fernández I, Rivarola V, Cabrera JL, Núñez Montoya SC.

* XXII SIMPOSIO DE PLANTAS MEDICINALES DE BRASIL. Bento Gonçalves (RS), 18-21/09/2012. Bento Gonçalves, Brasil.

2) Actividad antifúngica *in vitro* de una antraquinona natural sobre biofilms de *Candida tropicalis*. J. Marioni, J.E. Arce Miranda, L.R. Comini, J.L. Cabrera, M.G. Paraje, S. C. Núñez Montoya.

*XI ENCUENTRO LATINOAMERICANO DE FOTOQUÍMICA Y FOTOBIOLOGÍA, ELAFOT. Córdoba, 01-05/10/12. Córdoba, Argentina.

3) Singlet oxygen generation of a natural anthraquinone. Comini, Laura R.; Marioni, Juliana; Núñez Montoya, Susana C.; Fernández, Ivana; Rivarola, Viviana; Garagiola, Betania; Borsarelli Claudio D.; Cabrera José L.

* 16th INTERNATIONAL CONGRESS ON PHOTOBIOLOGY. Córdoba, 08-12/09/14. Córdoba, Argentina.

4) Rubiadin: A natural photosensitizing anthraquinone with antifungal activity in vitro. J. Marioni, J.E. Arce Miranda, M. L. Mugas, J.L. Cabrera, M.G. Paraje, S. C. Núñez Montoya

*XXII JORNADAS JÓVENES INVESTIGADORES. Asociación de Universidades del Grupo Montevideo, AUGM. Valparaíso, Chile. Septiembre 29, 30 y 1º de octubre de 2014.

5) "Actividad antifúngica de una antraquinona sobre biofilms de *Candida no albicans*". Cabrera José L; Marioni Juliana; Núñez Montoya Susana C; Paraje María G.

*XII ENCUENTRO LATINOAMERICANO DE FOTOQUÍMICA Y FOTOBIOLOGÍA, ELAFOT. Maresias, 26-30/04/15. Maresias, Brazil.

- 6) Reduction of *Candida tropicalis* biofilms by the photodynamic action of Rubiadin a natural anthraquinone. J. Marioni, L.R. Comini, J.L. Cabrera, M. G. Paraje, S.C. Núñez Montoya.

*25th INTER-AMERICAN PHOTOCHEMICAL SOCIETY MEETING, I-APS. Santiago de Chile, 24-27/05/16. Santiago de Chile, Chile.

- 7) Photo-inactivation mechanism over *Candida* biofilms by natural anthraquinones. Juliana Marioni, Bresolí- Obach Roger, Paraje María G, Nonell Santi, Susana C. Núñez Montoya.

*XXIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA y XIV CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGIA, ALAM-CAM 2016. IV CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA DE MEDICAMENTOS Y COSMETICOS- CLAMME. REUNION DE LA SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE TUBERCULOSIS Y OTRAS MICOBACTERIOSIS (SLAMTB). Rosario, 26-30/09/16. Santa Fe, Argentina.

- 8) Combinación de antifúngicos y terapia fotodinámica antimicrobiana sobre biofilms de *Candida tropicalis*. J Marioni, JL Cabrera, SC Núñez Montoya, MG Paraje.

3 Avances de presentaciones a Congresos (Proceedings)

1) Marioni J, Arce Miranda JE, Comini LR, Paraje MG, Núñez Montoya SC. Actividad *in vitro* de extractos de *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) sobre biofilms de *Candida no albicans*. Libro de Resúmenes – SAFE (2011), p. 49.

2) Marioni J, Arce Miranda JE, Comini LR, Núñez Montoya SC, Paraje MG. Actividad *in vitro* de extractos de *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) sobre biofilms de *Candida no albicans*. Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (2012), 69 (2), 169-170.

3) Marioni J, Mugas M., Comini L., Cabrera J., Núñez Montoya S., Paraje M. Rubiadin 1-methyl ether: A natural photosensitizing anthraquinone with antifungal activity *in vitro*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, IJPSR (2014).

4) Juliana Marioni, José L. Cabrera, Maria G. Paraje, Susana C. Núñez Montoya. Effect of irradiation frequency in photodynamic inactivation of *Candida tropicalis* biofilms by natural anthraquinones in combination with antifungals. *MEDICINA* (2016), 76(1), 279-280.

ANEXO I: Preparación de soluciones

Agar Sabouraud Glucosado (Britania)

Componentes:

Pluripeptona.....	10,0 g
Glucosa.....	40,0 g
Cloranfenicol.....	0,05 g
Agar.....	15,0 g
Agua destilada (H ₂ O-D).....	c.s.p 1000 mL
pH: 5,6 ± 0,2	

Preparación: Suspender 65 g del polvo formado por pluripeptona, glucosa y cloranfenicol en H₂O-D. Reposar 5 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 min para la disolución total. Completar con H₂O-D hasta volumen final de 1 L. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min. Mantener en lugar fresco (2- 8 °C).

Buffer Fosfato Salino (PBS)

Componentes:

NaCl	8,0 g
KCl.....	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
H ₂ O-deuterada	c.s.p 1000 mL
pH: 7,2 ± 0,2	

Preparación: Se pesan las sales y se solubilizan.

Caldo Sabouraud Glucosado (Britania)

Componentes:

Tripteína	5,0 g
Peptona de carne.....	5,0 g
Glucosa	20,00 g
H ₂ O-D. c.s.p.....	1000 mL

Preparación: Suspender 30 g del polvo en H₂O-D. Reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición para la disolución total. Completar con H₂O-D hasta volumen final de 1 L. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min. Mantener en lugar fresco (2- 8 °C).

CRISTAL VIOLETA

Solución A:

Cristal violeta.....	1 g.
Etanol (95%).....	20 mL.

Solución B:

Oxalato de amonio.....	0,8 g.
H ₂ O-D.....	80 mL.

Preparación: Mezclar cada uno de los solutos en su disolvente respectivo. Dejar la solución de oxalato de amonio en reposo durante una noche o calentar ligeramente hasta que se solubilice. Mezclar las dos soluciones y filtrar. Mantener a temperatura ambiente protegido de la luz.

Medio de Crecimiento

Componentes:

Medio Mínimo Esencial (MEM).....	9,6 g
L- glutamina.....	0,3 g
Bicarbonato sódico.....	2,2 g
SFB.....	10 %
Gentamicina.....	50 µg/mL
H ₂ O-D.....	c.s.p 1000 mL

Preparación: Disolver las cantidades indicadas en 900 mL de H₂O-D agitando hasta su completa disolución. Completar a volumen final de 1000 mL con H₂O-D. Ajustar el pH a 7,4 utilizando bicarbonato. Filtrar estérilmente. Mantener en lugar fresco (2- 8 °C).

Medio de Mantenimiento

Contiene los mismos nutrientes que el medio de crecimiento, pero lleva sólo 2% de SFB.

RPMI

Componentes:

RPMI 1640.....	10,40 g
Tampón MOPS.....	34,53 g
H ₂ O-D.....	1000 mL

Preparación: Disolver en 900 mL de H₂O-D las cantidades indicadas, agitando hasta su completa disolución. Ajustar el pH a 6,9- 7,1, utilizando NaOH 1N o 10N. Completar a volumen final de 1000 mL con H₂O-D. Filtrar estérilmente. Mantener refrigerado hasta su uso (4-8 °C, máximo 6 meses).

*A mis padres y hermano,
por su amor y apoyo incondicional*

Agradecimientos

Este trabajo de tesis doctoral, es un esfuerzo en el cual han contribuido distintas personas, directa e indirectamente, a lo largo de todos estos años. Por ello, me gustaría tener unas palabras de agradecimiento a las siguientes personas:

A mi directora de tesis, Dra. Susana Núñez Montoya, por su dedicación, por brindarme todo el tiempo necesario para discutir resultados y aclarar dudas, por su valiosa guía y paciencia. Su experiencia y educación han sido cualidades motivadoras todos estos años para mi formación académica y personal. Gracias de corazón.

A la Dra. Ma. Gabriela Paraje, por abrirme las puertas de su laboratorio, por transmitirme sus conocimientos y experiencias, por todas sus ideas, consejos y discusiones, por su dedicación a mejorar mi formación.

A los miembros de mi comisión de tesis: Dra. Andrea M. Smania y Dr. Juan E. Argüello, por sus aportes recibidos durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Cabrera, por su responsabilidad y sabiduría que también ayudaron a mi formación.

Al Dr. Santiago Nonell, por haberme permitido realizar una pasantía en su Laboratorio de Fotoquímica del Instituto Químico de Sarriá, poniendo a mi disponibilidad el equipamiento e infraestructura, y principalmente por haber hecho que mi estadía en Barcelona haya sido tan agradable..

A la Dra. Adriana Casas, por permitirme trabajar en su laboratorio perteneciente al Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP- CONICET), por estar dispuesta a enseñar y transmitir sus conocimientos.

A mis compañeras de Farmacognosia, por su predisposición y compañerismo que hacen tan ameno el día a día. Por aguantarme y escucharme estos años de alegría y de llanto. A las grandes amigas que encontré allí, Dani y Pame, gracias por los buenos momentos vividos,

por su apoyo y palabras de aliento que nunca faltan. Por estar siempre que las necesité.

Al grupo de microbiología, desde los que me ayudaron en mis comienzos hasta los que están actualmente, por el buen humor y alegría que transmiten, por estar siempre dispuestas a darme una mano. Por su contención y en especial, por brindarme su amistad.

A Brenda, gracias por su predisposición y por esa energía avasallante que contagia.

A mis amigas, las de toda la vida, las de la facu, las que aparecieron en el momento indicado, Carla, Vengi, Juli, Lau, Clari, Euge, Meli, Lali, se merecen muchas y buenas palabras por tanto compartido, lo cual no tiene precio. Gracias por estar pendientes de mis cosas. Por acompañarme en las buenas y en las malas, por que a pesar de las distancias su amistad es incondicional.

A Gastón, por escucharme y aconsejarme. Agradezco su compañía en los momentos más difíciles y en los de felicidad.

A toda mi familia, abuelos, tías, primos, por compartir y disfrutar cada uno de mis logros.

A mi hermano, por compartir la vida, por enseñarme tanto y estar siempre presente.

Todo esto no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mis padres, que me han dado todo y más. Me han inculcado valores, me han enseñado que todo se puede, con paciencia, perseverancia y respeto. Gracias por su amor. Gracias, gracias por tanto!

Resumen

En las últimas décadas, la incidencia de las infecciones fúngicas invasivas por patógenos oportunistas ha aumentado, asociada con altas tasas de morbi-mortalidad. *Candida tropicalis* se ha informado como uno de los patógenos más comúnmente aislado, presentando alta capacidad de formación de biofilms. Esta forma de crecimiento de las levaduras estaría involucrada en la generación de resistencia a la mayoría de todos los antifúngicos utilizados en la actualidad. En este contexto, la Terapia Fotodinámica antimicrobiana (TFDa) se presenta como una alternativa, ya que busca inactivar microorganismos mediante una foto-oxidación biológica mediada por especies reactivas de oxígeno (ERO).

El objetivo de esta tesis doctoral fue identificar compuestos naturales fotosensibilizadores, con efecto antifúngico sobre biofilms de *C. tropicalis*, aplicando protocolos de inactivación fotodinámica *in vitro*.

Se evaluó la fotoinactivación *in vitro* de biofilms de *C. tropicalis* por la acción de extractos y antraquinonas (AQs) aisladas de una planta fototóxica, *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae). Asimismo, se estudió si el efecto observado está relacionado con el estrés oxidativo y nitrosativo como consecuencia de los mecanismos fotosensibilizantes. Para ello, se evaluó la generación de ERO y especies reactivas del nitrógeno, así como las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas del sistema biológico estudiado.

Se demostró que el efecto antibiofilm de los extractos bajo la acción de la luz está relacionado con el alto contenido de AQs fotosensibilizadoras. A su vez, las principales AQs presentes en el extracto fotoactivo, rubiadina y 1-metil éter de rubiadina, exhibieron un significativo efecto antibiofilm sólo bajo irradiación, el cual fue dependiente de la cepa de *C. tropicalis* estudiada (cepa clínica CRF6 y cepa de referencia NCPF 3111). Estas AQs produjeron 63,5 y 47 % de reducción (%R), respectivamente, sobre el biofilm de la cepa de referencia, y ambas generaron un 82,1 - 81,8 %R sobre el biofilm de la cepa clínica. A su vez, se estableció que este efecto fue mediado por un marcado desbalance oxidativo y nitrosativo, siendo rubiadina más activa que su derivado metilado. Esto se observó tanto sobre la cepa de referencia como sobre la cepa clínica, ya que para alcanzar los porcentajes de reducción arriba mencionados, fueron necesarias menores concentraciones de rubiadina.

La evaluación de los mecanismos fotodinámicos Tipo I (producción de radical anión superóxido, $O_2^{\bullet-}$) y Tipo II (generación de oxígeno singlete, 1O_2) indicó que la

reducción del biofilm de *C. tropicalis* por ambas AQs bajo irradiación, está mediado principalmente por un significativo aumento en la producción de $O_2^{\bullet-}$ (Tipo I). Si bien se observó la producción de 1O_2 en biofilms, su participación en la fotoinactivación sería insignificante.

Asimismo, como consecuencia de la elevada generación de $O_2^{\bullet-}$ se detectó un incremento en los niveles de óxido nítrico. Probablemente como una respuesta a esta ERO, generando un estrés nitrosativo que también estaría involucrado en el efecto antibiofilm.

La activación de las defensas antioxidantes (enzimáticas y no enzimáticas) del biofilm estaría contrarrestando el estrés oxidativo y nitrosativo, produciendo una importante reducción en la biomasa, sin lograr la erradicación de los mismos.

Por otro lado, se pudo incrementar el efecto antibiofilm de 1-metil éter de rubiadina sobre la cepa de referencia (62,9 %R) con períodos consecutivos de irradiación (15 min de luz) durante la incubación (0, 3, 6, 24, 27 y 30 h), dado que alcanzó un mayor porcentaje de acumulación en el biofilm respecto a rubiadina a las 3 h de incubación (22,4 % vs 1,22 %).

A su vez, se demostró que cada AQ podría utilizarse combinada con Anfotericina B (AMB), ya que al ser irradiadas potenciaron la actividad de este antifúngico sobre biofilms de *C. tropicalis*. De esta forma, las AQs podrían usarse en concentraciones por debajo de la Concentración Inhibitoria Mínima fotoactiva, lo cual permitiría disminuir los efectos secundarios de AMB. Similar potenciación se observó cuando ambas AQs fueron combinadas entre sí y fotoestimuladas. Incluso se potenció aún más la actividad antibiofilm de las combinaciones cuando se aumentó la frecuencia de irradiación, específicamente para 1-metil éter de rubiadina se logró un 82 %R. Por lo tanto, el desbalance de los sistemas de defensa antioxidante junto con la TFDa, podría ser una nueva estrategia para mejorar la actividad de los agentes antifúngicos como AMB, convirtiéndose en una alternativa para el desarrollo de tratamientos antifúngicos más eficaces.

En conclusión, ambas AQs naturales, rubiadina y 1-metil éter de rubiadina, lograron fotoinactivar biofilms de *C. tropicalis*, ya sea solas o combinadas con AMB. Por lo tanto, poseen potencial aplicación en TFDa para el tratamiento de infecciones generadas por biofilms de *C. tropicalis*.

Abstract

In the last decades, the incidence of invasive fungal infections by opportunistic pathogens has increased, associated with high rates of morbidity and mortality. *Candida tropicalis* has been reported as one of the most commonly isolated pathogens, presenting high capacity for biofilm formation. This form of yeast growth would be involved in generating resistance to most of all antifungal currently agents used in therapy. In this context, antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) is presented as an alternative, since it can inactivate microorganisms by means a biological photo-oxidation mediated by reactive oxygen species (ROS).

The aim of this thesis was to identify natural photosensitizing compounds with antifungal effect against *C. tropicalis* biofilms, by applying *in vitro* protocols of photodynamic inactivation.

It was assessed the *in vitro* photoinactivation of *C. tropicalis* biofilms by the action of extracts and anthraquinones (AQs) isolated from a photo-toxic plant, *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (*Rubiaceae*). In addition, it was evaluated whether the observed effect was related to oxidative and nitrosative stress as a consequence of photosensitizing mechanisms. For this, the generation of reactive oxygen species and reactive nitrogen species, as well as the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses of the biological system were studied.

It was shown that the antibiofilm effect of extracts under light action is related to the high content of photosensitizing AQs. Moreover, the main AQs present in the photoactive extract, rubiadin and rubiadin 1-methyl ether, exhibited a significant antibiofilm effect under irradiation, which was dependent on *C. tropicalis* strain studied (a clinic strain CRF6 and a reference strain NCPF 3111). They produced a 63.5 and 47 percentage of reduction (%R), respectively on the reference strain biofilms (NCPF), and both AQs generated an 82.1 - 81.8 %R on the clinical strain biofilms. In addition, it was established that this effect was mediated by a marked oxidative and nitrosative imbalance, with rubiadin being more active than its methylated derivative. This was observed in the reference strain as well as in the clinical strain, since less concentrations of rubiadin were required to achieve the above mentioned reduction percentages.

The evaluation of the photodynamic mechanisms Type I (production of superoxide anion radical, $O_2^{\bullet-}$) and Type II (generation of singlet oxygen, 1O_2) indicated that the reduction of the *C. tropicalis* biofilms by both AQs under irradiation is mainly mediated by a significant increase in the production of $O_2^{\bullet-}$ (Type I). Although the 1O_2 production was observed in biofilms, its participation in photoinactivation would

seem to be insignificant.

In addition, as a consequence of the high $O_2^{\bullet-}$ generation, an increase in nitric oxide levels was detected. Probably as a response to this ERO, generating a nitrosative stress that would also be involved in the antibiofilm effect.

Activation of the antioxidant (enzymatic and non-enzymatic) defenses of the biofilm would be counteracting the oxidative and nitrosative stress, producing a significant reduction in the biomass, without achieving the eradication of the same ones.

On the other hand, it was possible to increase the antibiofilm effect of rubiadin 1-methyl ether against the reference strain (62.9 %R), by applying consecutive irradiation periods (15 min light) during incubation (0, 3, 6, 24, 27 and 30 h). This was possible because this AQ reaches a higher accumulation percentage in the biofilm compared to rubiadin at 3 h of incubation (22.4 % vs. 1.22 %).

Furthermore, each AQ could be used in combination with Amphotericin B (AMB), since when irradiated they potentiate the activity of this antifungal on *C. tropicalis* biofilms. Thus, they could be used in concentrations below the Minimum Inhibitory Photoactive Concentration, which would decrease the side effects of AMB. A similar potentiation was observed when both AQs were combined with each other and photo-stimulated. Even the antibiofilm activity of the combinations was further potentiated when the frequency of irradiation was increased, specifically for rubiadin 1-methyl ether that achieved 82 %R. Therefore, the imbalance of antioxidant defense systems together with aPDT could be a new strategy to improve the activity of antifungal agents like AMB, becoming an alternative for the development of more effective antifungal treatments.

In conclusion, two natural AQs, rubiadin and rubiadin 1-methyl ether, were able to photoinactivate biofilms of *C. tropicalis*, either alone or in combination with AMB. Therefore, they have potential application in aPDT for the treatment of infections generated by *C. tropicalis* biofilms.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	I
I- INTRODUCCIÓN.....	1
I.1- Infecciones fúngicas	3
I.2- Candidiasis	4
I.3- Biofilms como factor de resistencia	5
I.4- Nuevas terapias antimicrobianas	9
I.4.1- Combinación de antifúngicos	9
I.4.2- Terapia fotodinámica antimicrobiana	10
I.5- Fotosensibilizadores	12
I.5.1- Estados electrónicos y energéticos de un fotosensibilizador	13
I.5.2- Mecanismos fotosensibilizantes	15
A- Mecanismo fotosensibilizante o fotodinámico Tipo I	15
B- Mecanismo fotosensibilizante o fotodinámico Tipo II	16
I.6- Fotosensibilización y defensas antioxidantes	17
I.7- Agentes fotodinámicos usados en la práctica clínica	19
I.8- Productos naturales como fotosensibilizadores	22
I.9- Una planta fototóxica: <i>Heterophyllaea pustulata</i> Hook. f. (<i>Rubiaceae</i>)	22
I.9.1- Estudio fitoquímico.....	23
I.9.2- Caracterización fotofísica, fotoquímica y fotobiológica de antraquinonas	24
II- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	4
II.1- Hipótesis.....	29
II.2- Objetivos	29
II.2.1- Objetivo general	29
II.2.2- Objetivos específicos.....	29
III- MATERIALES Y MÉTODOS	30
III.1- METODOLOGÍAS USADAS EN EL ANÁLISIS FITOQUÍMICO.....	33
III.1.1- Recolección e identificación del material vegetal	33
III.1.2- Preparación del material vegetal	33
III.1.3- Obtención de extractos.....	33
III.1.4- Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en extractos: Cromatografía líquida de alta resolución	34

A- Ensayo analítico de HPLC-UV-Vis	34
B- Validación del método analítico de HPLC-UV-Vis	36
C- Ensayo analítico de HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF.....	37
III.1.5- Métodos de separación y purificación de antraquinonas.....	38
A- Cromatografía en columna.....	38
B- Cromatografía en capa fina preparativa	38
III.1.6- Métodos de identificación de antraquinonas.....	39
A- Cromatografía en capa fina analítica: Co-cromatografía.....	39
B- Espectrofotometría Ultravioleta-Visible	40
C- Espectrometría de Masa	40
D- Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	40
E- Espectroscopía Infrarroja	40
III.2- ENSAYO DE CITOTOXICIDAD	41
III.2.1- Efecto citopático	41
III.2.2- Viabilidad celular: Ensayo de captación de Rojo Neutro	41
III.3- METODOLOGÍAS USADAS EN EL ESTUDIO FOTOMICROBIOLÓGICO:	43
III.3.1- Identificación de cepas microbianas y condiciones de cultivo.....	43
III.3.2- Ensayo de formación de biofilms.....	43
III.3.3- Sistema de irradiación	44
III.3.4- Optimización de las condiciones de irradiación: tiempo y distancia de irradiación	45
III.3.5- Determinación de la concentración inhibitoria mínima fotoactiva en levaduras planctónicas.....	45
III.3.6- Determinación de la actividad antibiofilm: Fotoinactivación de biofilms fúngicos	47
A- Extractos de <i>H. pustulata</i>	48
B- Antraquinonas aisladas de <i>H. pustulata</i>	48
III.3.7- Estudio del estrés celular en la fotoinactivación de biofilms de <i>Candida</i> spp.....	48
A- Determinación de anión superóxido en biofilms: Ensayo de azul de nitro tetrazolium	49
B- Reacción de Griess: Determinación del radical óxido nítrico en biofilms	50
III.3.8- Estudio de la capacidad antioxidante del biofilm	51

A- Medición cuantitativa de la actividad de la enzima superóxido dismutasa.....	51
B- Determinación de la capacidad antioxidante total del sistema: FRAP...	52
III.3.9- Estudio de la estructura de biofilms: Microscopía Confocal de Exploración LÁSER	53
A- Observación y cuantificación de biofilms	53
B- Observación y cuantificación de especies reactivas del oxígeno intracelular.....	53
III.3.10- Efecto de secuestrantes/desactivantes de especies reactivas del oxígeno sobre la fotoinactivación de biofilms	55
III.3.11- Estudio de incorporación de antraquinonas en biofilms de <i>Candida</i> por HPLC-UV-Vis.....	55
III.3.12- Efecto de la variación en la frecuencia de irradiación sobre la actividad antibiofilm de antraquinonas: Tratamiento de irradiación.....	57
III.3.13- Ensayo de combinación con irradiación	57
III.4- METODOLOGÍAS USADAS EN EL ESTUDIO FOTOQUÍMICO Y FOTOFÍSICO....	59
III.4.1- Preparación de las muestras	59
III.4.2- Preparación de células planctónicas y biofilms de <i>Candida</i>	59
III.4.3- Espectros de absorción y de fluorescencia de las antraquinonas.....	60
III.4.4- Absorción de los estados transitorios de las antraquinonas	60
III.4.5- Determinación de oxígeno singlete	61
A- Medición con sonda fluorescente Singlet Oxygen Sensor Green	61
B- Cinética de fosforescencia de oxígeno singlete	62
III.5- METODO ESTADÍSTICO.....	64
IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	65
IV.1- SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES SOBRE BIOFILMS	67
IV.1.1- Clasificación de cepas de <i>Candida spp.</i> formadoras de biofilms.....	67
IV.1.2- Efecto de tiempo y distancia de irradiación sobre biofilms	68
IV.2- FOTOINACTIVACIÓN DE BIOFILMS DE <i>C. tropicalis</i> POR EXTRACTOS DE <i>H.</i> <i>pustulata</i> Y ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO	71
IV.2.1- Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de extractos de <i>H. pustulata</i> sobre biofilms de una cepa clínica de <i>C. tropicalis</i>	71
A- Cuantificación espectrofotométrica del biofilm con Cristal Violeta.....	71

B- Cuantificación del biofilms por Microscopia confocal de exploración LÁSER	73
IV.2.2- Producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno	75
A- Generación de radical anión superóxido	75
B- Producción de óxido nítrico	75
IV.2.3- Determinación de la activación de la enzima superóxido dismutasa y de la capacidad antioxidante total	77
A- Activación de la enzima superóxido dismutasa	77
B- Activación de la capacidad antioxidante total: Ensayo FRAP	78
IV.2.4- Generación de oxígeno singlete por los extractos de <i>H. pustulata</i>	80
IV.3- ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS EXTRACTOS DE <i>H. pustulata</i> ENSAYADOS SOBRE BIOFILMS.....	83
IV.3.1 – Análisis químico mediante HPLC-UV-Vis	83
A-Validación de la metodología de HPLC-UV-Vis.....	83
B- Análisis químico de los extractos de partes áreas de <i>H. pustulata</i> por HPLC-UV-Vis: Correlación entre su composición química y la actividad antibiofilm <i>in vitro</i>	88
IV.3.2 – Análisis químico mediante HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF.....	90
IV.4- SEPARACIÓN, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ANTRAQUINONAS	93
IV.4.1- Separación y purificación de rubiadina y 1-metil éter de rubiadina	94
IV.4.2- Identificación de rubiadina y 1-metil éter de rubiadina	95
IV.5- DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD DE LAS ANTRAQUINONAS.....	101
IV.6- ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA FOTOESTIMULADA DE ANTRAQUINONAS AISLADAS DE <i>H. pustulata</i> SOBRE BIOFILMS DE <i>C. tropicalis</i>	103
IV.6.1- Determinación de la CIM y CIM fotoactiva de las antraquinonas en levaduras planctónicas de <i>C. tropicalis</i>	103
IV.6.2- Actividad antibiofilm fotoestimulada de rubiadina y su derivado metilado	104
IV.6.3- Efecto de rubiadina sobre la generación de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno en el biofilm	107
IV.6.4- Efecto de rubiadina sobre mecanismos antioxidantes: activación de la enzima SOD y capacidad antioxidante total del biofilm	109
IV.6.5- Efecto de 1-metil éter de rubiadina sobre el estrés celular: Desbalance oxidativo y nitrosativo.....	110

IV.6.6- Cuantificación de la biomasa del biofilm y de la producción de especies reactivas del oxígeno intracelular por MCEL	114
IV.6.7- Generación de oxígeno singlete por antraquinonas en solución	116
IV.6.8- Incorporación de antraquinonas en biofilms de <i>Candida</i>	118
IV.7- ACCIÓN FOTOSENSIBILIZANTE <i>IN VITRO</i> DE ANTRAQUINONAS NATURALES SOBRE BIOFILM DE <i>C. tropicalis</i>	121
IV.7.1- Medidas espectroscópicas de antraquinonas.....	121
A- Espectros de absorción y fluorescencia	121
B- Absorción de estados transitorios	124
IV.7.2- Determinación de oxígeno singlete	128
IV.7.3- Efecto de secuestrantes/desactivantes de especies reactivas del oxígeno en la fotoinactivación de biofilms fúngicos.....	131
IV.8- OTRAS ESTRATEGIAS ANTIMICROBIANAS PARA OPTIMIZAR LA ACTIVIDAD ANTIBIOFILM DE ANTRAQUINONAS DE <i>H. pustulata</i>	139
IV.8.1- Aumento en la frecuencia de irradiación sobre la actividad antibiofilm de las AQs: Efecto sobre estrés oxidativo y nitrosativo del biofilm y respuesta de los mecanismos antioxidantes.....	139
IV.8.2- Ensayo de combinación con irradiación	144
A- Efecto antibiofilm de las combinaciones de antraquinonas entre sí y con AMB	144
B- Efecto de las combinaciones en el estrés oxidativo y nitrosativo del biofilm y respuesta de los mecanismos antioxidantes	149
C- Aumento en la tasa de irradiación sobre el efecto antibiofilm de las combinaciones de antraquinonas entre sí y con AMB	154
D- Efecto de las combinaciones con tratamiento de irradiación en el estrés oxidativo y nitrosativo del biofilm y respuesta de los mecanismos antioxidantes.....	156
V. CONCLUSIONES.....	161
VI. PROYECCIONES.....	165
VII. BIBLIOGRAFÍA	169
Artículos científicos publicados	183
ANEXO I: Preparación de soluciones	187

Abreviaturas

5-ALA	Ácido 5-aminolevulínico
9,10 DFA	9,10 difenil antraceno
ABC	Área bajo la curva
Acetona-d6	Acetona deuterada
AcOEt	Acetato de etilo
AMB	Anfotericina B
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
AQ/AQs	Antraquinona/s
AQ^{•-}	Radical anión de antraquinona
¹AQ*	Estado singlete excitado de antraquinona
³AQ*	Estado triplete excitado de antraquinona
AQ1	rubiadina
AQ2	1-metil éter de rubiadina
AQ3	soranjidiol
AQ4	1- metil éter de soranjidiol
AQ5	2-hidroxi-3-metil de antraquinona
AQ6	pustulina
ASG	Agar Sabouraud Glucosado
Ben	Benceno
CAT	catalasa
CC	Control Celular
CC₅₀	Concentración Citotóxica que reduce la viabilidad un 50 %
CIC	Contenido Intracelular
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CIMf	Concentración Inhibitoria Mínima fotoactiva
CIMS	Concentración Inhibitoria Mínima de células sésiles
CIMS-50	Concentración Inhibitoria Mínima que disminuye al 50 % las células sésiles
CIMS-80	Concentración Inhibitoria Mínima de células sésiles al 80 %
CLSI	“Clinical and Laboratory Standards Institute”
CSG	Caldo Sabouraud Glucosado
CSubT	Concentración Sub-Tóxica
CV	Cristal Violeta

δ	corrimiento químico
DAD	Detector de Arreglo de Diodos
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DCFH	2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DCFH-DA	2',7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMSO-d6	Dimetil sulfóxido deuterado
DO	Densidad Óptica
DOc	Densidad Óptica control
EC	Efecto Citopático
EM	Espectrometría de Masa
EPS	Exopolisacáridos
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
ERN	Especies Reactivas del Nitrógeno
ESI	"Electron Spray Ionization" (Ionización por electro spray)
EtOH	Etanol
FDA	"Food and Drug Administration" (Administración de drogas y alimentos)
FE	Fase Estacionaria
Fe⁺³-TPTZ	tripiridiltriazina férrica
Fe⁺²-TPTZ	tripiridiltriazina ferrosa
FICI	"Fractional Inhibitory Concentration Index" (Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional)
FM	Fase Móvil
FRAP	"Ferrous Reduction Antioxidant Potency"
FS	Fotosensibilizador
¹FS₀	Estado fundamental singlete del fotosensibilizador
¹FS*	Estado singlete excitado del fotosensibilizador
³FS*	Estado triplete excitado del fotosensibilizador
FS*	Radical del fotosensibilizador
FS⁻	Radical anión del fotosensibilizador
FS⁺	Radical catión del fotosensibilizador
GSH	Glutación peroxidasa
H	átomo de Hidrógeno
hν	Fotón de luz
Hex	hexano

H₂O-D	Agua destilada
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HpD	Derivados de hematoporfirina
HPLC-UV-Vis	“High Performance Liquid Chromatography” (Cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta-visible)
HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF	“HPLC with diode-array detector and Mass Spectrometry” (Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos y espectrometría de masa-masa)
IFI	Infección Fúngica Invasiva
IIH	Infección Intrahospitalaria
ISC	“Intersystem Crossing” (Cruce entre sistemas)
IR	Infrarrojo
J	constante de acoplamiento
λ	Longitud de onda
LOD	“Limit of Detection” (Límite de detección)
LOQ	“Limit of Quantitation” (Límite de cuantificación)
MC	Medio de crecimiento
MCEL	Microscopia Confocal de Exploración LÁSER
MCNC	Máxima Concentración No Citotóxica
MEM	Medio Esencial Mínimo
MeOH	Metanol
MeOH-HPLC	Metanol grado HPLC
MM	Medio de mantenimiento
MOPS	“3-(N-morpholino) propanesulfonic acid” (Buffer Morfolino Propano Sulfónico)
MS-MS	“In tandem Mass Spectrometry” (Espectrometría de masa en tándem)
MV	Material Vegetal
m/z	Relación masa carga
NBT	“Nitroblue Tetrazolium” (Azul de nitro tetrazolium)
NCPF	“National Collection of Pathogenic Fungi”
NO₂⁻	Ión nitrito
³O₂	Oxígeno molecular
¹O₂	Oxígeno singlete
O₂^{•-}	Radical anión superóxido
HO	Grupo hidroxilo

HO•	Radical hidroxilo
NO•	Radical óxido nítrico
ONOO•	Radical peroxinitrito
PBS	“Phosphate-Buffered saline” (Buffer Fosfato Salino)
PBS-d	Buffer Fosfato Salino deuterado
PN	Perinaftenona
Quer	Quercetina
QS	“Quorum Sensing”
R²	Coefficiente de correlación
R_f	Relación de frente
R o RH₂	Sustrato o solvente
RH-OO•	Radical peróxido de sustrato
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN-¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Protones
RMN-¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RN	Rojo Neutro
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute” (medio de cultivo)
RSD	“Relative Standard Deviation” (Desviación estándar relativa)
Sb	Desviación estándar de la intersección en y
SFB	Suero Fetal Bovino
SOD	Superóxido Dismutasa
SOSG	“Singlet Oxygen Sensor Green”
SubCIM/f	Sub Concentración Inhibitoria Mínima/ fotoactiva (CIM/2)
SupraCIM/f	Supra Concentración Inhibitoria Mínima/ fotoactiva (CIMx2)
TFD	Terapia Fotodinámica
TFDa	Terapia Fotodinámica antimicrobiana
Tiron	sal disódica del ácido 4,5-dihidroxi-1,3-benzenodisulfónico mono hidrato
TLC	“Thin Layer Chromatography” (Cromatografía en capa fina)
TLCp	Cromatografía en capa fina preparativa
TPTZ	Tripiridiltriazina
t_R	Tiempo de retención
UBB	Unidad de Biomasa de Biofilm
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visible

VC	Viabilidad Celular
Φ_{Δ}	Rendimiento cuántico de oxígeno singlete
Φ_f	Rendimiento cuántico de fluorescencia
%R	Porcentaje de reducción

I-INTRODUCCIÓN

I.1- Infecciones fúngicas

A partir de la década de los 80, se ha observado un incremento a nivel mundial en la incidencia y gravedad de las infecciones producidas por hongos. No sólo se han vuelto más frecuentes las micosis ocasionadas por especies patógenas primarias, sino también por oportunistas (Colombo *et al.*, 2011; Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012; Vandeputte *et al.*, 2012). Patógenos primarios como *Histoplasma capsulatum/duboisii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, entre otros, pueden establecer una infección naturalmente. Por el contrario, los patógenos oportunistas, pueden desarrollar infecciones cuando ocurren determinadas condiciones, tales como la inmunosupresión (Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012; Vandeputte *et al.*, 2012).

Antes, las micosis superficiales endémicas eran prevalentes, pero en los últimos años la frecuencia de las micosis sistémicas invasivas ha aumentado (Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012; Vandeputte *et al.*, 2012). En Latinoamérica, la incidencia de las infecciones fúngicas invasivas (IFI) ha incrementado, estimándose que es 3 a 15 veces mayor que la reportada en Europa y Norteamérica (Falagas *et al.*, 2010; Nucci *et al.*, 2010, Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012). Este tipo de infección es frecuente en pacientes inmunodeprimidos u hospitalizados (Permán & Salavert, 2012).

El incremento de las IFI ha sido reportado tanto a partir de hongos endémicos como oportunistas, acompañado con altas tasas de morbilidad y mortalidad (Nucci *et al.*, 2010, Permán & Salavert, 2012; Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012). Por un lado, el aumento de las IFI endémicas estaría probablemente relacionado con cambios en los hábitos de la población; como por ejemplo mayor número de migraciones, el turismo, y el crecimiento de la población, serían algunas de las condiciones que favorecerían a la diseminación de las especies fúngicas relacionadas con estas infecciones (Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012). En cambio, la mayor incidencia de las IFI oportunistas estaría asociada con un incremento de pacientes inmunocomprometidos, al uso de materiales biomédicos a largo plazo (catéteres, sondas), la intolerancia al fármaco antifúngico como consecuencia del tratamiento de la enfermedad subclínica subyacente (cáncer, diabetes), y el desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos debido al abuso de agentes antifúngicos y/o antibióticos de amplio espectro (Goldani & Mário, 2003; Nucci *et al.*, 2010; Permán & Salavert, 2012; Pfaller *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012).

Las IFI oportunistas incluyen candidiasis, criptococosis, trichosporonosis, aspergilosis y fusariosis, siendo las especies de *Candida* las levaduras con mayor frecuencia asociadas a infecciones intrahospitalarias (IIH) tanto superficiales como

sistémicas (Cornistein *et al.*, 2013, Nucci *et al.*, 2010; Perman & Salavert, 2012; Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012). Estas IFI prolongan la estancia hospitalaria del paciente, incrementando el consumo de recursos para su prevención, diagnóstico y tratamiento; por lo cual, generan un grave problema sanitario con un alto costo social y económico (Cornistein *et al.*, 2013, Pfaller & Diekema, 2007).

I.2- Candidiasis

La infección por *Candida* spp. implica una modificación en los mecanismos de defensa del hospedador y la transformación en el comportamiento del hongo comensal a patógeno oportunista. Esto involucra la adherencia de la levadura a la superficie, el cambio morfológico de levadura a hifa y posteriormente, la invasión de la mucosa que desencadena la respuesta inflamatoria de las células infectadas. El hospedador presenta así un papel fundamental en la protección frente a las micosis invasivas. La capacidad del hongo para producir infección dependerá en muchas ocasiones de la aptitud del hospedador para generar una respuesta inmunológica efectiva (Mayer *et al.*, 2013; Garcia-Vidal y Carratalà, 2012).

Candida albicans es el agente etiológico aislado con mayor frecuencia en las IIH invasivas, se observa un aumento de las especies de *Candida* no *albicans* (Goldani & Mário, 2003; Silva *et al.*, 2012). En Argentina, la incidencia de especies de *C.* no *albicans* fue mayor que la de *C. albicans* (54,52 vs 43,3 %), según un estudio retrospectivo durante el período 2006 a 2010 (Cornistein *et al.*, 2013). Dentro de estas especies se destacaron *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis* (Cornistein *et al.*, 2013; Falagas *et al.*, 2010; Nucci *et al.*, 2010, Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012). Las observaciones clínicas y experimentales sugieren que las tasas de morbilidad y mortalidad son más altas debido a las infecciones por *C. tropicalis* que a las infecciones por *C. albicans* (Kothavade *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012). En consecuencia, *C. tropicalis* se está convirtiendo en un patógeno emergente a nivel mundial.

Paralelamente al incremento de las Candidiasis invasivas, se han caracterizado varios mecanismos en las especies de *Candida* que les confieren resistencia a los fármacos antifúngicos (Morace *et al.*, 2014; Vandeputte *et al.*, 2012). Así, la resistencia a los fármacos sería uno de los factores relacionados a la generación de IFI. Se considera un fenómeno complejo, en donde los mecanismos desarrollados por las levaduras se basan principalmente en la reducción de la acumulación del fármaco dentro de la célula fúngica, la disminución de la afinidad del fármaco por su sitio de acción y las modificaciones del metabolismo para contrarrestar el efecto del fármaco.

Estos mecanismos pueden ocurrir a través de un incremento de las bombas de eflujo; alteración del sitio de acción, ya sea por mutación o desregulación de su expresión; modificación del metabolismo, como la alteración en la síntesis del ergosterol, entre otras (Vandeputte *et al.*, 2012; Spampinato & Leonardi, 2013).

Sin embargo, las infecciones crónicas se asocian con el desarrollo de biofilms, ya que este tipo de crecimiento exhibe una disminución en la susceptibilidad a los agentes antifúngicos. Por lo tanto, la formación de biofilms se considera un importante factor de virulencia (Ramage *et al.*, 2012; Sardi *et al.*, 2013, Vandeputte *et al.*, 2012). Éstos son comunidades microbianas adheridas irreversiblemente a una superficie, formadas por ambos morfotipos de células sésiles (levaduriforme e hifal) que crecen envueltas en una matriz extracelular rica en polisacáridos secretadas por ellas mismas (Ramage *et al.*, 2012; Sardi *et al.*, 2013; Vandeputte *et al.*, 2012). La mayoría de las levaduras formadoras de biofilms son las del género *Candida*. Otra levadura frecuentemente responsable de las infecciones por biofilms es *Cryptococcus neoformans*. También, los hongos filamentosos, y en particular los del género *Aspergillus*, pueden crecer como biofilms (Fanning & Mitchell, 2012, Vandeputte *et al.*, 2012).

Los biofilms se han informado como una de las causas importantes de infecciones nosocomiales, frecuentemente por el uso de dispositivos médicos al crecer adheridos a éstos (catéteres urinarios/vasculares, implantes, válvulas cardíacas, prótesis, entre otros) (Bizerra *et al.*, 2008; Kojic & Darouiche, 2004; Ramage *et al.*, 2012; Sardi *et al.*, 2013).

I.3- Biofilms como factor de resistencia

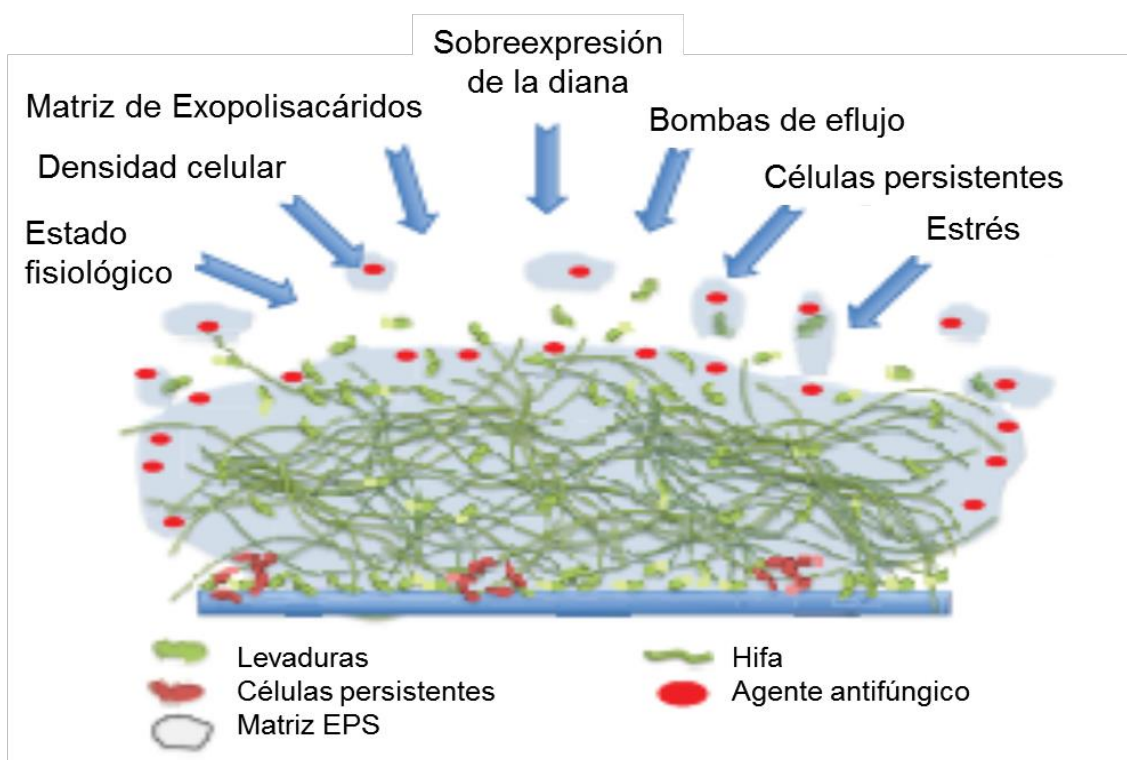
Los microorganismos en biofilms pueden ser hasta 1000 veces más resistentes que su contraparte planctónica, posiblemente debido a la naturaleza heterogénea del mismo (Delattin *et al.*, 2014; Ramage *et al.*, 2012, De Melo *et al.*, 2013). Se ha observado que los biofilms de levaduras son resistentes a casi todos los antifúngicos utilizados en la actualidad; por lo cual, además del tratamiento a menudo es necesario la extracción del dispositivo médico, siendo éste un procedimiento quirúrgico costoso y doloroso para los pacientes (Sardi *et al.*, 2013).

Es probable que la resistencia de los biofilms fúngicos a los agentes antimicrobianos sea el resultado de una combinación de múltiples y complejos factores, los cuales todavía permanecen poco claros (Ramage *et al.*, 2012, Silva *et al.*, 2012). Los mecanismos moleculares que podrían estar implicados en esta resistencia

son más complejos que en el crecimiento planctónico, y comprenden (Ramage *et al.*, 2012) (Fig. 1.1):

- a) El estado fisiológico y la velocidad de crecimiento de las células.
- b) La alta densidad celular dentro del biofilm.
- c) Los efectos de barrera de la matriz.
- d) La sobreexpresión de las moléculas dianas.
- e) La expresión de genes de resistencia, en particular las bombas de eflujo.
- f) La presencia de células persistentes.
- g) La respuesta modificada al estrés celular.

Figura 1.1 Esquema de mecanismos de resistencia de los biofilms fúngicos (Adaptada de Ramage *et al.*, 2012).



a) El estado fisiológico de las células sésiles se ha relacionado con diferentes respuestas de los biofilms a los antifúngicos. Se han estudiado varios factores como la respiración mitocondrial, la exposición a glucosa y hierro, cambios en el pH, temperatura, disponibilidad de oxígeno, entre otros, que alteran la arquitectura del biofilm y modifican la sensibilidad a los antifúngicos. En general, se ha establecido que estos factores generan gradientes de oxígeno y nutrientes, provocando una heterogeneidad fisiológica que condicionan la respuesta al tratamiento (Ramage *et al.*, 2012). Además, la velocidad de crecimiento

de las células en el biofilm afecta la actividad de los antifúngicos, ya que algunos fármacos logran la muerte del microorganismo en determinada fase de crecimiento del mismo (Tobudic *et al.*, 2012; De Melo *et al.*, 2013).

b) La densidad celular es un importante factor de resistencia dentro del biofilm de levaduras y hongos filamentosos, en particular para los azoles (Ramage *et al.*, 2012). En el interior del biofilm existe cooperación entre las células individuales a través de un proceso de comunicación conocido como quorum sensing (QS), que también permite coordinar su comportamiento (Mukherjee *et al.*, 2005; Ramage *et al.*, 2012). En los biofilms de *C. albicans*, una de las moléculas señalizadoras involucradas en el QS es el farnesol, que participa en el control de la morfología y crecimiento del biofilm. Esta regulación sucede como respuesta a la densidad celular, acumulándose el farnesol hasta una determinada concentración; cuando es lo suficientemente alta, puede inhibir la formación de la forma hifal, la capacidad de crecer como biofilms y la activación de genes involucrados en la resistencia a antifúngicos (Cao *et al.*, 2005; Ramage *et al.*, 2012). Además, una gran densidad celular implica mayores sitios blancos para la acción de antifúngicos.

c) La composición química de la matriz de exopolisacáridos (EPS) y su regulación pueden desempeñar un papel central en la resistencia. La composición de la misma en biofilms de *Candida* es compleja, contiene principalmente agua y carbohidratos derivados de glucosa y hexosamina. Además, posee proteínas, fósforo, ácido urónico, y ADN extracelular, cuyas proporciones varían según la especie de *Candida* (Al-Fattani & Douglas, 2006). Se ha demostrado también que algunos hidratos de carbono estarían involucrados en la resistencia del biofilm, secuestrando azoles, equinoncandinas y polienos (Al-Fattani & Douglas, 2006; Ramage *et al.*, 2012). Así, la matriz de EPS actuaría como una barrera para los fármacos.

d) La sobreexpresión de las moléculas dianas es otro mecanismo de resistencia de los hongos, como en el caso de los azoles, cuyo blanco de acción es la 14 α -demetilasa. Esta enzima, codificada por el gen ERG11, bloquea la biosíntesis de ergosterol que se traduce en una disminución de éste en las membranas, y en una acumulación de otros esteroides considerados tóxicos al inhibir el crecimiento del hongo. Sin

embargo, el gen ERG11 puede desarrollar mutaciones o estar sobreexpresado, afectando así la acción de los azoles, y también la de los polienos que tienen como blanco el ergosterol (Ramage *et al.*, 2012).

e) La resistencia del biofilm mediada por bombas de eflujo involucra a los transportadores dependientes de ATP y a los transportadores de la superfamilia de facilitadores mayores. Los primeros, utilizan varios sustratos, por lo que su sobreexpresión puede dar lugar a la resistencia cruzada de varias drogas; mientras que los segundos sólo confieren resistencia a los azoles (Mishra *et al.*, 2007; Ramage *et al.*, 2012). La codificación de los genes de las bombas está regulada durante las distintas etapas del desarrollo del biofilm y también luego de la exposición a los antifúngicos (Ramage *et al.*, 2012).

f) Las células persistentes también estarían involucradas en la resistencia, a pesar que sólo representan menos del 0,1 % de la población del biofilm (De Melo *et al.*, 2013). Estas células podrían adaptarse a un entorno adverso, a través de cambios en las etapas de crecimiento - latencia - proliferación para mantener la supervivencia (De Melo *et al.*, 2013). Así, son variantes fenotípicas altamente tolerantes a los antifúngicos (Tobudic *et al.*, 2012; De Melo *et al.*, 2013; Ramage *et al.*, 2012). La presencia de estas células ha sido descrita en biofilms de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* tratados con Anfotericina B (AMB) (Ramage *et al.*, 2012). Se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno (ERO) en altas concentraciones permiten el desarrollo de células persistentes, como ocurre con el miconazol (Delattin, *et al.*, 2014; Ramage *et al.*, 2012).

g) Es importante destacar que la respuesta al estrés también se ha propuesto como un mecanismo de resistencia en el biofilm (Arce Miranda *et al.*, 2011; Villegas *et al.*, 2013; Angel Villegas *et al.*, 2015; Peralta *et al.*, 2015). Los hongos patógenos están expuestos a una variedad de condiciones fisiológicas, incluyendo cambios de temperatura, estrés osmótico y estrés oxidativo, tales como los producidos en los fagosomas de neutrófilos. Los cambios producidos por estas condiciones generan diferentes respuestas que afectan el desarrollo del biofilm (Ramage *et al.*, 2012).

Además de la resistencia a los antifúngicos, el crecimiento de los biofilms ofrece una protección a la respuesta inmune del hospedador. Ésta respuesta es

menos efectiva sobre el biofilm de *Cándida* en comparación con las levaduras en estado planctónico. Las células mononucleares quedan atrapadas en los biofilms, y no se activarían de manera eficiente para fagocitar las células fúngicas que forman parte del biofilm (Nett & Andes, 2015).

Entre los antimicóticos usados actualmente, sólo hay unos pocos con limitada a buena eficacia contra biofilms fúngicos, tales como miconazol, equinocandinas y formulaciones lipídicas de AMB (Delattin *et al.*, 2014; Ramage *et al.*, 2012, Sardi *et al.*, 2013). En general, los tratamientos antibiofilms con estos fármacos antifúngicos, necesitan concentraciones que están fuera del rango terapéutico; y además, frecuentemente es necesario prolongar la duración del tratamiento en búsqueda de mejores resultados. Como consecuencia, se pueden generar graves efectos secundarios e interacciones con otros fármacos; y de este modo, además resultarían poco eficaces, pudiendo presentar baja seguridad en su uso.

Dado que la resistencia de los biofilms fúngicos estaría mediada por más de un mecanismo, se busca desarrollar nuevas estrategias para combatir a los agentes infecciosos. En los últimos años, se ha implementado la terapia antifúngica combinada, que implica el uso simultáneo de dos o más fármacos, la cual ha mostrado mejorar los resultados clínicos (Nett y Andes, 2015, Pianalto & Alspaugh, 2016; Scorzoni *et al.*, 2016).

Frente a la necesidad urgente de nuevos enfoques para tratar infecciones fúngicas asociadas a biofilms, la Terapia Fotodinámica antimicrobiana (TFDa) se presenta como una alternativa, ya que busca inactivar microorganismos mediante una foto-oxidación biológica mediada por ERO (Baltazar *et al.*, 2015; Hamblin, 2016; Wainwright *et al.*, 2017).

I.4- Nuevas terapias antimicrobianas

I.4.1- Combinación de antifúngicos

Las combinaciones de dos o más antifúngicos, y combinaciones de fármacos antifúngicos con productos naturales, se han evaluado como una alternativa a la monoterapia (Johnson *et al.*, 2004; Scorzoni *et al.*, 2016). En general, el objetivo principal es conseguir una interacción sinérgica entre los principios activos, en la cual el efecto biológico producido por los fármacos combinados es mayor que la suma del efecto de cada uno por separado a la misma dosis (Johnson *et al.*, 2004).

En este sentido, existen estudios en donde se han combinado dos agentes antifúngicos que se caracterizan por diferentes modos de acción (Johnson *et al.*, 2004). Tal es el caso de la combinación de AMB y anidulafungina que resultó en un efecto sinérgico sobre biofilms de *C. albicans* y *C. glabrata* (Valentín *et al.*, 2016)

Por otro lado, en biofilms de *C. albicans* y *C. parapsilosis* se han llevado a cabo combinaciones de un antimicótico (polieno o equinocandina) con otro fármaco, como un antiinflamatorio (diclofenac, aspirina), el cual actuaría como un potenciador (Bink *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012).

Diferentes informes describen una mejora sinérgica de la actividad de azoles y AMB combinados con compuestos que pueden aumentar las ERO, tal como paraquat y otros de origen natural como baicaleína, allicina, curcumina y berberina (Delattin *et al.*, 2014). En particular, la combinación de berberina con miconazol tuvo efectos sinérgicos en biofilms de *Candida* (Delattin *et al.*, 2014; Wei, *et al.* 2011).

Por lo tanto, la terapia combinada se centra en una mejora significativa de la eficacia de los compuestos en la combinación en comparación con la monoterapia. Esta alternativa terapéutica no sólo se ha desarrollado para tratar infecciones resistentes, o ampliar el espectro de acción de antifúngicos sobre una mayor variedad de hongos, sino que también busca reducir la concentración de aquellos que presentan efectos adversos con el fin de disminuir sus efectos tóxicos (Delattin, *et al.* 2014; Johnson *et al.*, 2004).

1.4.2- Terapia fotodinámica antimicrobiana

La TFDa implica la participación de tres factores indispensables: una sustancia química no tóxica, denominada fotosensibilizador (FS), la cual es activada por luz inocua a su longitud de onda (λ) de absorción, y en presencia de oxígeno produce un incremento en los niveles de ERO. Así, se busca inducir estrés oxidativo en los microorganismos patógenos. Las ERO así generadas, reaccionan con moléculas biológicas de su entorno directo (proteínas, lípidos, ADN), conduciendo eventualmente a la muerte de las células microbianas patógenas (Hamblin, 2016).

La TFDa, también conocida como inactivación fotodinámica o quimioterapia fotodinámica antimicrobiana, fue descubierta en el 1900 por Raab y Tappeiner, quienes hallaron que los protozoos *Paramecium* spp. morían luego de ser teñidos con naranja de acridina y expuestos a la luz brillante (Baltazar *et al.*, 2015; Hamblin, 2016). Su desarrollo se vio limitado por el auge de los antibióticos. Recién en la década de los 70, se comenzó a desarrollar el uso de sustancias fotosensibilizantes y luz como una terapia para tratar el cáncer. Esto sucedió como consecuencia del descubrimiento que

las porfirinas se localizaban selectivamente en los tumores y bajo irradiación generaban la regresión de los mismos (Baltazar *et al.*, 2015, Hamblin, 2016).

En los últimos años la TFDa ha resurgido, especialmente debido a la búsqueda de tratamientos alternativos para patógenos resistentes. Su principal ventaja sobre los tratamientos tradicionales radica en generar un desbalance oxidativo generalizado, desencadenando así un proceso que no diferencia entre microorganismos resistentes y no resistentes. Incluso esta foto-oxidación incluye la destrucción de factores de virulencia que en general, son moléculas orgánicas susceptibles de oxidación (Baltazar *et al.*, 2015; De Melo *et al.*, 2013; Gonzales & Maisch, 2012). Además, esta terapia presenta la posibilidad de realizar un control espacial estricto de la irradiación sobre la zona afectada, reuniendo sólo, de esa manera, los tres agentes responsables del efecto fotodinámico (FS, luz y oxígeno).

Otras ventajas que se pueden citar de esta terapia son (De Melo *et al.*, 2013; Hamblin, 2016; Jori *et al.*, 2006):

- Amplio espectro de acción, ya que al generar foto-oxidación de biomoléculas necesarias para la viabilidad celular, puede inactivar una gran variedad de microorganismos como bacterias, hongos, protozoos y virus.
- Eficacia sobre microorganismos resistentes, debido a que al producir un desbalance oxidativo afecta a muchas dianas al mismo tiempo.
- No genera resistencia, dado que los microorganismos no han mostrado activar mecanismos de resistencia, ya sea mediante un incremento en el metabolismo de detoxificación o en la exportación de fármacos.
- Efecto sobre patógenos organizados en biofilms, ya que ha demostrado capacidad de erradicar biofilms en algunos casos, al producir la ruptura de la matriz extracelular.
- El FS puede diseñarse para que se localice preferentemente en el microorganismo y no en el tejido o células del hospedador, confiriendo selectividad con el menor daño a los tejidos sanos.
- Si no fuera posible una acumulación preferencial, se podría lograr la muerte de los microorganismos mediante un control de la irradiación, ya que el efecto estaría limitado a la zona en donde se aplicó la luz.
- El daño sobre el tejido sano es mínimo porque las ERO generadas tienen vida media muy corta y por lo tanto, difunden en un radio de acción pequeño (5-20 nm).
- El efecto mutagénico o genotóxico sobre una célula eucariota es muy bajo porque, en general, los FS no se localizan en el núcleo.

- Estimula el sistema inmune frente al estrés oxidativo generado, ayudando al tratamiento.
- En la mayoría de los casos, los resultados son inmediatos.

A pesar de todas estas ventajas, esta terapia presenta las siguientes desventajas o limitaciones (Gad *et al.*, 2004):

- Su uso está limitado preferentemente a infecciones superficiales o localizadas, en donde la aplicación de la fuente de luz sea posible. Sin embargo, en las últimas décadas se han desarrollado dispositivos que permiten llegar con la irradiación a tumores internos.
- El tipo de luz a utilizar depende del FS, específicamente del rango del espectro en donde éste absorbe luz.
- Puede generar fototoxicidad en tejidos sanos y/o una reacción inflamatoria, lo cual depende directamente del FS usado, el tiempo entre su aplicación y el tratamiento con luz, y la parte del cuerpo tratada. Se prefieren FS que sean eliminados completamente.
- A veces es necesario repetir el tratamiento para lograr resultados satisfactorios.

I.5- Fotosensibilizadores

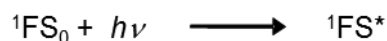
Hay ciertas características estructurales que los FS deben tener para que puedan ocurrir los procesos fotofísico-químicos. En particular, son moléculas orgánicas planas y rígidas con un alto grado de conjugación aromática (cromóforo), lo cual le confiere una gran deslocalización electrónica que le permite absorber luz (Baltazar *et al.*, 2015, Dai *et al.*, 2012; De Melo *et al.*, 2013; Hamblin, 2016). Por lo tanto, los FS generalmente son moléculas altamente coloreadas, ya que el cromóforo es el responsable de su capacidad para absorber luz (Baltazar *et al.*, 2015, Dai *et al.*, 2012; de Melo *et al.*, 2013; Hamblin, 2016). La presencia de grupos auxocromos (grupos funcionales o cadenas carbonadas) alteran su espectro de absorción y por lo tanto, de ellos depende en gran medida la longitud de onda de absorción del FS (Dai *et al.*, 2012).

La susceptibilidad de los microorganismos a la TFDa depende de las características fisicoquímicas del FS como polaridad, distribución de carga y solubilidad, entre las más estudiadas. En términos generales, para que el tratamiento fotodinámico sea efectivo, el FS idóneo debe reunir los siguientes requisitos (Hamblin, 2016):

- No debe ser tóxico en células de mamíferos bajo oscuridad. A su vez, se prefiere que su toxicidad sea baja luego de la irradiación. Esto incluye que no sea mutagénico, ni genotóxico, ni carcinogénico.
- Fotoestable, que no se degrade al ser irradiado, especialmente en subproductos tóxicos.
- Debe mostrar selectividad por los microorganismos y no por las células del hospedador.
- Alto poder de penetración en los tejidos, es decir, lipofilicidad para una buena difusión a través de las membranas biológicas.
- Capacidad para activarse a una longitud de onda inocua y de alta penetración.
- Distribución homogénea en el tejido a tratar.
- Alto rendimiento fotodinámico para una máxima producción de ERO.
- Vida media corta y rápida eliminación de los tejidos sanos.
- Escasos o nulos efectos adversos, incluyendo dolor durante o después del tratamiento.
- Versatilidad en la forma de administración (oral, tópica) y que permita ser administrado en forma ambulatoria para reducir costos.
- Combinable con otros tratamientos.

I.5.1- Estados electrónicos y energéticos de un fotosensibilizador

El FS en su estado fundamental singlete ($^1\text{FS}_0$, con todos sus electrones con espines apareados y en orbitales de baja energía), absorbe un fotón de luz ($h\nu$) cuando es irradiado a la λ de absorción, pasando a un estado singlete electrónicamente excitado ($^1\text{FS}^*$).

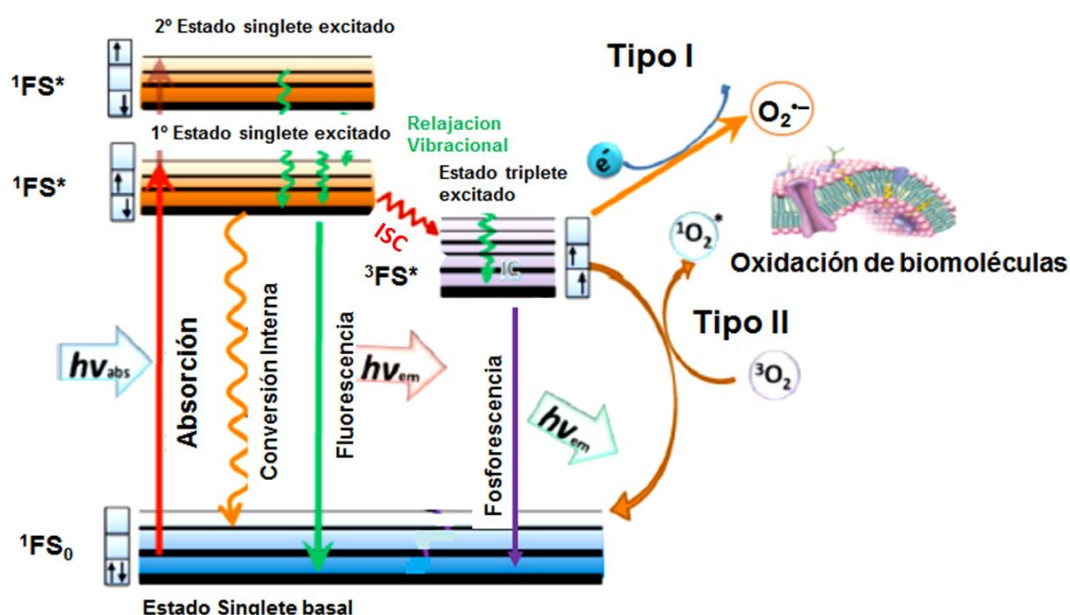


En este estado excitado, el $^1\text{FS}^*$ se puede desactivar a través de procesos fotoquímicos o fotofísicos (Levine, 1996; Skoog, Holler, y Nieman, 2001; Nagy *et al.*, 2010). En los primeros, se generan nuevas especies moleculares por distintas reacciones como disociación, isomerización, ionización, entre otras (Levine, 1996; Skoog, Holler, & Nieman, 2001). En los procesos fotofísicos, el $^1\text{FS}^*$ retorna su estado basal $^1\text{FS}_0$ (Fig. 1.2), permaneciendo la molécula químicamente inalterada. El $^1\text{FS}^*$ libera su energía por distintos mecanismos, ya sea en forma de calor o a través de

procesos **radiativos** y/o **no radiativos** (Baltazar *et al.*, 2015, Dai *et al.*, 2012; Hamblin, 2016).

Los procesos **radiativos** (flechas rectas en Fig. 1.2) implican la liberación de energía en forma de radiación electromagnética desde un estado excitado del FS, lo cual puede darse desde el $^1\text{FS}^*$ a través de la emisión de fluorescencia o a partir de un estado triplete excitado ($^3\text{FS}^*$) por fosforescencia (Fig. 1.2). La primera ocurre en forma espontánea entre dos estados electrónicos con la misma multiplicidad de espín, mientras que en la segunda los estados electrónicos tienen diferente multiplicidad de espín (Baltazar *et al.*, 2015, Dai *et al.*, 2012; Hamblin, 2016).

Figura 1.2 Diagrama de Jablonski (adaptado de Silva *et al.*, 2015).



Los procesos **no radiativos** (flechas onduladas en Fig. 1.2) abarcan la relajación vibracional, la conversión interna y el cruce entre sistemas (Intersystem Crossing, ISC) (Fig. 1.2). En el primer proceso, la energía del $^1\text{FS}^*$ disminuye dentro de un mismo estado electrónico. Esta relajación suele ocurrir con posterioridad a la conversión interna y al cruce entre sistemas; por lo cual, no logra por sí sola retornar al estado basal. En cambio, con la conversión interna se puede regresar al estado basal, ya que esta disminución de energía ocurre entre dos estados electrónicos con la misma multiplicidad de espín, y esto puede suceder en varias etapas. El proceso de cruce entre sistemas ocurre entre dos estados electrónicos con distinta multiplicidad de espín, generando un $^3\text{FS}^*$ de menor energía que el $^1\text{FS}^*$, pero con mayor tiempo de vida media y más reactivo (Baltazar *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2012; Hamblin, 2016). A

partir de este estado triplete excitado, el FS puede regresar al estado basal emitiendo fosforescencia o reaccionando con otras moléculas de su entorno (Baltazar *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2012). Esto último puede ocurrir al transferir su energía a otra molécula (proceso fotofísico) o por reacciones fotoquímicas, como transferencia de electrones, abstracción de átomos de hidrógeno (H) o formación de fotoproductos (Baltazar *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2012; De Melo *et al.*, 2013).

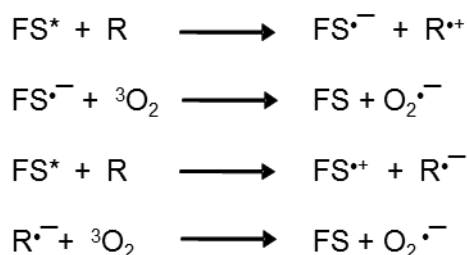
I.5.2- Mecanismos fotosensibilizantes

Los FS, en su estado excitado, producen alteraciones fotoquímicas o fotofísicas en el $^3\text{O}_2$, generando radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y otras ERO, a través de dos mecanismos (Baltazar *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2012; Hamblin, 2016).

A- Mecanismo fotosensibilizante o fotodinámico Tipo I

El FS en su estado excitado singlete o triplete reacciona con un sustrato o con el solvente en el cual está disuelto (R o RH_2) y se forman radicales libres por (i) transferencia electrónica o (ii) abstracción de H (reacciones fotoquímicas). Los radicales libres generados del FS reaccionarán con el $^3\text{O}_2$ para formar radicales peróxidos que formarán otras ERO, y ellas en definitiva, oxidarán las moléculas biológicas.

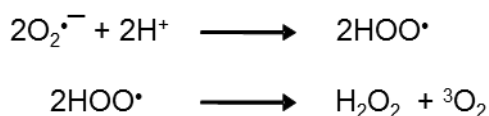
(i) Por transferencia de electrones a partir del estado singlete o triplete excitado del FS, se obtiene el radical catiónico ($\text{FS}^{\bullet+}$) y/o aniónico ($\text{FS}^{\bullet-}$) de éste a través de las siguientes reacciones. A su vez, los radicales generados al reaccionar con el $^3\text{O}_2$ producen $\text{O}_2^{\bullet-}$. (Baltazar *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2012; Hamblin, 2016):



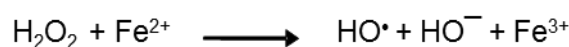
A pesar que el $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede reaccionar con algunas biomoléculas como leucoflavinas, tetrahidropterinas, catecolaminas y compuestos relacionados (Fridovich, 1997; Mattila *et al.*, 2015), no se lo considera una especie muy reactiva. No ataca en forma significativa al ADN ni a los lípidos poliinsaturados, con el consecuente daño en la membrana celular (Fridovich, 1997). Su potencialidad como agente oxidante radica

en su capacidad para generar especies oxidantes más potentes, como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (HO^\bullet); y esto lo puede hacer por varios mecanismos (Dai *et al.*, 2012).

El más simple de estos mecanismos es una dismutación rápida que genera $^3\text{O}_2$ y H_2O_2 (Dai *et al.*, 2012) por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Fig. 1.3, pág. 18). El H_2O_2 inicia principalmente peroxidación en la bicapa lipídica de las membranas plasmáticas (Mattila *et al.*; 2015; Ochsner, 1997).

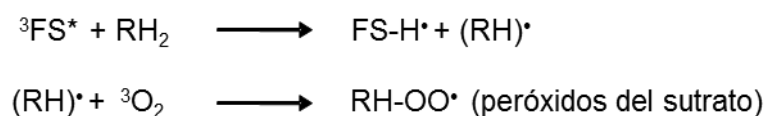


Otro mecanismo posible es el conocido como reacción *in vivo* de Haber-Weiss. Es un proceso en el cual el $\text{O}_2^{\bullet-}$ aumenta el hierro "libre", oxidando el centro [4Fe-4S] de enzimas dehidrasas (Mattila *et al.*, 2015, Ochsner, 1997). El hierro liberado se mantiene reducido (Fe^{+2}) por reductores celulares, y reacciona con H_2O_2 en la reacción de Fenton, para producir HO^\bullet en sistemas biológicos (Mattila *et al.*, 2015, Ochsner, 1997):



El HO^\bullet es una de las especies más reactivas del oxígeno, ocasionando daño significativo en el ADN, como también en proteínas y lípidos celulares. Por lo tanto, se considera una de las ERO más tóxica.

(ii) En la abstracción de hidrógeno se producen radicales peróxidos del sustrato (RH-OO^\bullet) que son los que reaccionan con las biomoléculas, de acuerdo a las siguientes reacciones (Baltazar *et al.*, 2015; Laustriat, 1986):



B- Mecanismo fotosensibilizante o fotodinámico Tipo II

En este mecanismo se produce una transferencia de energía triplete/triplete (proceso fotofísico). El FS en estado triplete excitado regresa a su estado fundamental al transferir su energía al $^3\text{O}_2$ que se transforma en $^1\text{O}_2$.



Esta ERO posee una extrema reactividad con todas las biomoléculas. Es un agente oxidante no selectivo que daña lípidos insaturados, colesterol, residuos de α -aminoácidos en proteínas (cisteína, histidina, metionina, tirosina y triptófano), bases púricas con el consecuente daño en ADN y ARN (Gambino & Capitelli, 2016; Mattila *et al.*, 2015).

Si bien el $^1\text{O}_2$ es muy tóxico para la célula, su efecto está restringido porque su radio de acción (5-20 nm) es limitado debido a que posee un tiempo de vida muy corto (3,1 μs en agua); incluso en las células fúngicas puede recorrer distancias pequeñas (Lopez Chicón *et al.*, 2012; Mattila *et al.*, 2015).

Estos dos mecanismos fotosensibilizantes pueden ocurrir simultáneamente; y la proporción en la cual estos dos procesos ocurren depende de la naturaleza del FS, del sustrato y de la concentración de $^3\text{O}_2$ (Dai *et al.*, 2012).

A su vez se ha descrito que algunos FS, en su estado excitado, pueden unirse al ADN a través de un proceso de fotoadición, formando fotoaductos covalentes que impiden la replicación y transcripción del ADN u originar un fotoproducto que rompe las membranas celulares (Laustriat, 1986). Sin embargo, no se descarta que ocurran procesos oxidativos simultáneamente, como en el caso de los psoralenos (Nagy *et al.*, 2010).

I.6- Fotosensibilización y defensas antioxidantes

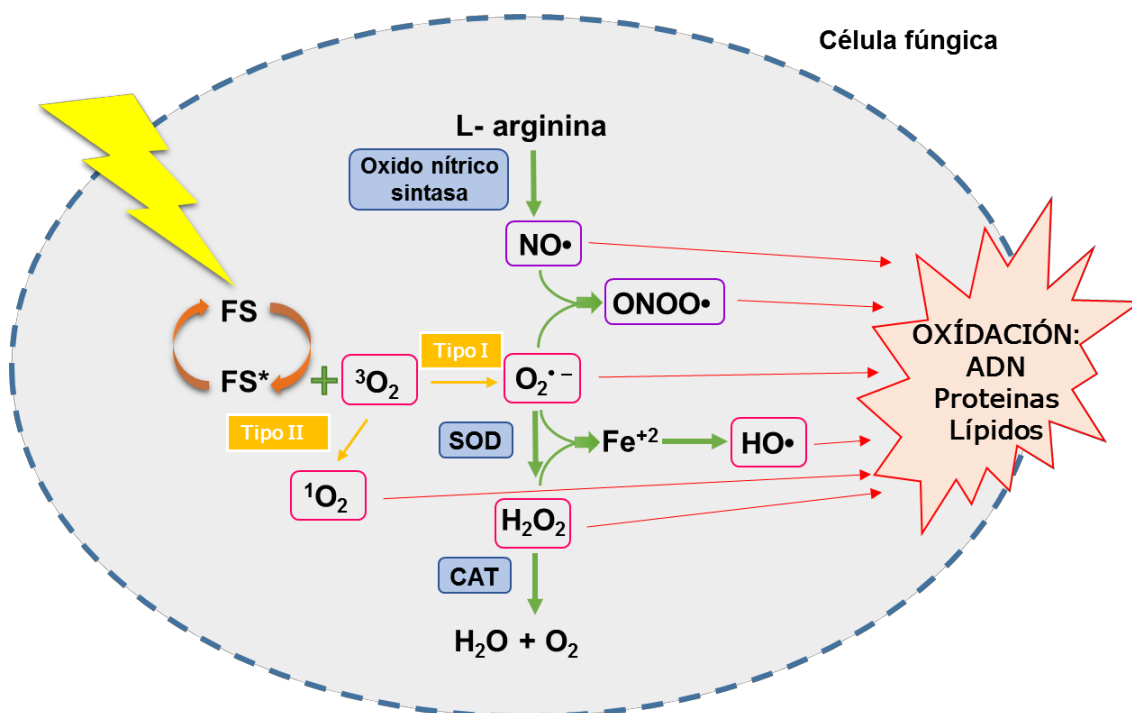
La alteración fotoquímica o fotofísica de una entidad molecular, como resultado de una absorción inicial de radiación por otra entidad molecular, en este caso el FS, se conoce como proceso de **fotosensibilización**.

En terapia fotodinámica (TFD), la entidad que sufre la alteración fotoquímica o fotofísica es el $^3\text{O}_2$, a través de cualquiera de los mecanismos ya explicados: Tipo I (producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$) o Tipo II (generación de $^1\text{O}_2$) (Baltazar *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2012; Hamblin, 2016).

Un mecanismo a tener en cuenta cuando existe sobreproducción de $\text{O}_2^{\bullet-}$, es la generación del radical óxido nítrico (NO^{\bullet}) por activación de la enzima óxido nítrico sintasa (Fig. 1.3). El NO^{\bullet} reacciona con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ para formar peroxinitrito (ONOO^{\bullet}), actuando como secuestrante de esta ERO en una reacción que podría considerarse como un mecanismo de defensa que es dependiente de la concentración de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y que se genera frente a un exceso de la misma (Hurtado Bredda *et al.*, 2005). Sin embargo, se forma una especie reactiva del nitrógeno (ERN) de gran toxicidad, ya que

el ONOO• es un agente fuertemente oxidante y nitrante a nivel de proteínas y lípidos de membrana e intracelulares (Hurtado Bredda *et al.*, 2005).

Figura 1.3 Esquema de fotosensibilización y defensas antioxidantes (adaptada de Baltazar *et al.*, 2015)



La reactividad de las ERO ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $HO\bullet$ y 1O_2) generadas en la fotosensibilización dinámica, incluso de las ERN y de los radicales peróxidos de sustratos ($RH-OO\bullet$), se reduce debido a la presencia en las células de sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Las principales enzimas involucradas en el sistema antioxidante son la SOD que produce la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 ; la catalasa (CAT) que desactiva el H_2O_2 , generando agua y oxígeno molecular; y algunas peroxidasas, como la glutatión peroxidasa (GSH), que en presencia de un compuesto donador de electrones, catalizan la conversión de H_2O_2 en agua (Dai *et al.*, 2012; Mattila *et al.*, 2015; Ochsner, 1997). En *C. albicans* se han descrito 6 genes que codifican para SOD; y estas enzimas se pueden encontrar en citoplasma, en la superficie celular y en mitocondrias (Frohner *et al.*, 2009; Missall *et al.*, 2004). Mientras que para CAT se ha descrito un gen y esta enzima se localiza en el citoplasma (Roman *et al.*, 2016).

Entre los compuestos no enzimáticos, se pueden citar los péptidos antioxidantes como el glutatión, que actúa como secuestrantes de $HO\bullet$ y 1O_2 (Hurtado Bredda *et al.*, 2005; Missall *et al.*, 2004), azúcares antioxidantes como el ácido

ascórbico, vitaminas como el α -tocoferol, y carotenos que desactivan tanto ERO como otros radicales orgánicos formados (Hurtado Bredda *et al.*, 2005; Missall *et al.*, 2004).

Cuando se altera el equilibrio entre las ERO, las ERN y los sistemas de defensa, la acumulación de estas especies en las células conduce a una condición conocida como estrés oxidativo y nitrosativo, respectivamente (Hurtado Bredda *et al.*, 2005; Baltazar *et al.*, 2015). En esta condición, la concentración de ERO y ERN es tan alta que puede dar lugar al daño de moléculas biológicas, y la consecuente muerte celular necesaria para lograr la regresión de las infecciones (incluso un tumor en TFD) (Baltazar *et al.*, 2015; Missall *et al.*, 2004).

Simultáneamente a esta defensa antioxidante que actúa directamente sobre las especies reactivas, se activa otro sistema enzimático que repara el daño producido por estas ERO sobre moléculas biológicas. Como ejemplo se pueden citar la sulfóxido metionina reductasa que repara los residuos de metionina en proteínas dañadas; las endonucleasas, exonucleasas y ADN-polimerasas que reparan el ADN dañado por estrés oxidativo (Missall *et al.*, 2004).

I.7- Agentes fotodinámicos usados en la práctica clínica

En la práctica clínica, los fármacos fotosensibilizantes se desarrollaron en función de su aplicación en la TFD oncogénica. En particular, los FS dinámicos se dividen en primera, segunda y tercera generación, según su desarrollo y evolución.

Los FS de primera generación son los derivados de hematoporfirina (HpD), que constituyen la base de los medicamentos comercialmente conocidos como Photofrin® (EEUU), Photosan (Alemania) y sus análogos en otros países (Bonnettt, 2000; Yoon *et al.*, 2013).

A pesar que la actividad clínica de los HpD ha sido ampliamente demostrada, e incluso se cuenta con una extensa experiencia clínica en la bibliografía, estos FS de primera generación muestran una serie de desventajas (Yoon *et al.*, 2013; Bonnettt, 2000). Se pueden destacar que su respuesta clínica es imposible relacionarla a una estructura molecular definida, ya que se trata de una mezcla compleja de HpD. Además, el efecto anticancerígeno es moderado; no son suficientemente selectivos; poseen una banda de absorción débil alrededor de 630 nm, que requiere mayor dosis de FS o mayor dosis de luz o una combinación de ambos para generar un nivel adecuado de FS excitado.

Debido a estas desventajas, se desarrolló una segunda generación de FS. Se trata de moléculas definidas, obtenidas por síntesis simple y con alto rendimiento, con mejor actividad y selectividad, que no necesariamente estaban relacionadas a la

porfirinas (Yoon *et al.*, 2013; Bonnett, 2000). Entre ellos se incluyen protoporfirinas, ácido sulfónico de tetraporfirinas, tetrahidroxifenilporfirinas, meso-alquilporfirinas, clorinas, bacterioclorinas, purpurinas, benzoporfirinas, ftalocianinas, naftolocianinas, ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), entre otros (Yoon *et al.*, 2013).

La estrategia de asociar los FS de segunda generación con transportadores específicos para aumentar la afinidad por el tejido tumoral, dio lugar a los FS de tercera generación. Esto se logra por ejemplo a través de la conjugación del FS con anticuerpos monoclonales (dirigido contra los antígenos tumorales); o unión del FS a lipoproteínas de baja densidad o moléculas de folato, ya que los receptores de estos compuestos están sobre-expresados en la superficie de las células tumorales. También se están usando sistemas nano-estructurados de liberación de FS (Yoon *et al.*, 2013). Estas estrategias se encuentran en continuo desarrollo en la actualidad.

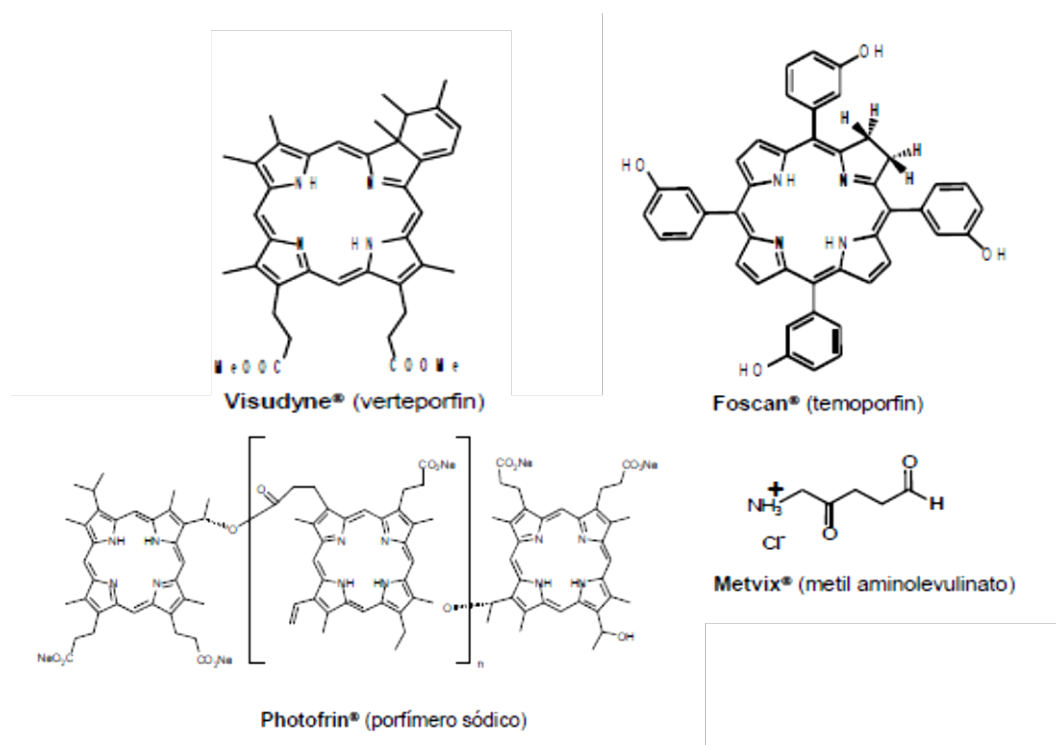
Por otro lado, se han probado otros FS químicamente no relacionados a las porfirinas. Estos incluyen una gran variedad de colorantes orgánicos, algunos de ellos de origen natural. Entre ellos, podemos nombrar:

- a) Colorantes derivados de acridina (acriflavina, naranja de acridina).
- b) Fenotiacinas, las más usadas son el azul de metileno y el azul de toluidina.
- c) Colorantes del tipo xantenos, entre los que se destacan fluoresceína, derivados halogenados de fluoresceína como eosina y rosa de bengala.
- d) Colorantes de cianina que se desarrollaron como sensibilizadores fotográficos, como Merocianina 540 e Indocianina verde.
- e) Quinonas como Hipericina

En nuestro país, actualmente, sólo hay cuatro FS autorizados por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) para su uso clínico en TFD oncológica (Fig. 1.4). Tres de ellos son derivados de la porfirina: Visudyne, Foscan y Photofrin (Disposición autorizante ANMAT 3064/00, 7641/07 y 7094/07, respectivamente). El cuarto (Metvix) es un derivado del ácido amino levulínico, el clorhidrato de metil-aminolevulinato (Disposición autorizante ANMAT 7392/12).

Por otro lado, en TFDa se han probado los mismos FS que se desarrollaron para la TFD en cáncer. Entre ellos podemos citar: porfirinas, clorinas, ftalocianinas, 5-ALA y fenotiazinas, especialmente los colorantes azul de metileno y azul de toluidina (O’Riordan *et al.*, 2005; Calzavara-Pinton *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2012; De Melo *et al.*, 2013).

Figura 1.4 Fármacos aprobados por ANMAT para su uso en TFD y su nombre comercial.



Aunque se han estudiado una gran variedad de FS como potenciales antimicrobianos, es importante destacar que las estructuras óptimas para la inactivación de las células bacterianas y fúngicas pueden ser sutilmente diferentes de los FS utilizados para el cáncer. En general, las estructuras más lipófilas, con una menor cantidad de cargas catiónicas, parecen ser mejores para la inactivación células fúngicas (Dai *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que los biofilms de *C. albicans* son sensibles a la TFDa mediada por Photofrin®. También *C. albicans* y *C. dubliniensis* fueron susceptibles a la TFDa con eritrosina, pero los biofilms de ambas especies de *Candida* fueron más resistentes que sus homólogos en estado planctónico. La combinación de eritrosina y rosa de bengala en TFDa tiene algún efecto en los biofilms, siendo también eficaz en la reducción y destrucción de blastoconidios e hifas de *C. albicans*. Además, la TFDa utilizando azul de metileno y láser (660 nm) mostró una leve reducción en biofilms de *C. albicans* (Dai *et al.*, 2012).

Por todo lo expuesto, la TFDa emerge como un nuevo enfoque para tratar infecciones. En este marco la búsqueda de nuevas sustancias fotosensibilizadoras es un área de investigación con actual y amplio desarrollo en las últimas décadas. Considerando los satisfactorios resultados obtenidos al utilizar esta terapia (Baltazar *et*

al., 2015; Hamblin, 2016), la significancia de encontrar nuevos FS, sobre todo de origen natural, es relevante.

I.8- Productos naturales como fotosensibilizadores

El estudio de las plantas como una alternativa a otras formas de descubrimiento de fármacos, ha atraído una gran atención. Según la Organización Mundial de la Salud, las especies vegetales serían las mejores fuentes para la obtención de una amplia variedad de fármacos; las cuales además, podrían beneficiar a una extensa población, ya que se trata de un recurso renovable fácilmente accesible (Sardi *et al.*, 2013; Scorzoni *et al.*, 2016).

Como antecedente, podemos citar a la especie *Althernanthera marítima*, una planta herbácea comúnmente distribuida en las playas de la costa brasileña. Los extractos de hexano y etanol obtenidos de partes aéreas, han mostrado efecto fotosensibilizador, ya que produjeron un efecto antifúngico frente a *C. dubliniensis* cuando fueron irradiados con un láser a 685 nm (Gasparetto *et al.*, 2010).

Algunos compuestos naturales han sido bien establecidos como FS, entre ellos, se destaca la hipericina. Este pigmento natural obtenido de las plantas de *Hypericum*, ha sido ampliamente estudiado como FS. El efecto fotodinámico de este pigmento natural se ha ensayado frente a varias especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*) (Rezusta *et al.*, 2012) y también contra dermatofitos (*Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*) (Paz-Cristobal *et al.*, 2014). La TFDa con hipericina ha demostrado ser eficaz solamente sobre *C. albicans* sin daño a las células normales de la piel (Paz-Cristobal *et al.*, 2013). En tanto que sobre dermatofitos, este pigmento ha resultado fungicida *in vitro* (Paz-Cristobal *et al.*, 2013).

Otro FS de origen natural es la curcumina, la cual se ha utilizado en TFDa con buena eficacia sobre levaduras en estado planctónico y sobre biofilms de algunas especies de *Candida*, tales como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. dubliniensis* (Andrade *et al.*, 2013; Dovigo *et al.*, 2011).

I.9- Una planta fototóxica: *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. (Rubiaceae)

En la búsqueda de compuestos fotosensibilizadores con potencial actividad antimicrobiana, el grupo de Farmacognosia ha estudiado ampliamente una planta fototóxica: *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) (Núñez Montoya, 2002). Es un arbusto de 2 a 3 m de altura que crece en la región Andina de Argentina y Bolivia, entre los 2500-3000 metros sobre el nivel del mar (Fig. 1.5) (Bacigalupo, 1993).

Figura 1.5 *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) (A) arbusto, (B) partes aéreas.



En Argentina, su hábitat está circunscripto a las provincias de Jujuy, Salta y Tucumán. Popularmente esta especie es conocida como “cegadera”, “ciegadera” o “saruera” debido a los efectos tóxicos que produce en el ganado con predominio de pelaje blanco (ovino, bovino, mular y equino), específicamente ceguera (queratoconjuntivitis) y lesiones dérmicas (dermatitis) (Hansen y Martiarena, 1967).

I.9.1- Estudio fitoquímico

A partir de las hojas y tallos de esta planta, se aislaron antraquinonas (AQs), flavonoides y un iridoide conocido como asperulósido (Fig. 1.6). Se estableció que los metabolitos secundarios predominantes son derivados antraquinónicos del tipo aglicones (Núñez Montoya, 2002; Núñez Montoya *et al.*, 2003; 2006).

Este estudio fitoquímico permitió estimar que las AQs serían los compuestos responsables del efecto fototóxico de la planta, ya que otras estructuras antraquinónicas habían sido asociadas a procesos de fotosensibilización (Hipericina) (Rajendran, 2016). Con el propósito de corroborar este supuesto, se realizó un ensayo *in vivo* en donde se demostró que soranjidiol y rubiadina, principales componentes de esta planta, llegan a piel y generan síntomas de fotosensibilización (fotofobia, inflamación, eritema, prurito y petequias) en ratones Balb-C expuestos a la luz solar. También se demostró que estos síntomas se revierten si los animales dejan de ser expuestos a la luz solar (Núñez Montoya *et al.*, 2008)

I.9.2- Caracterización fotofísica, fotoquímica y fotobiológica de antraquinonas

La caracterización fotofísica y fotoquímica de las AQs aisladas de esta especie vegetal implicó la cuantificación de la producción de $O_2^{\bullet-}$ (Mecanismo fotosensibilizante Tipo I) y 1O_2 (Mecanismo fotosensibilizante Tipo II).

Mediante la caracterización fotobiológica, se pudo demostrar que las AQs en estudio son capaces de foto-estimular el metabolismo oxidativo de monocitos y neutrofilos, incrementando la formación de $O_2^{\bullet-}$ bajo irradiación (Núñez Montoya *et al.*, 2005). El único compuesto que no incrementó la producción de esta ERO fue 5,5'-bisoranjidiol. Por lo tanto, estos derivados antraquinónicos se estarían comportando como agentes fotosensibilizadores Tipo I, siendo damnacantal el que se destaca por ser el mejor productor de esta ERO a la menor concentración probada (Núñez Montoya *et al.*, 2005).

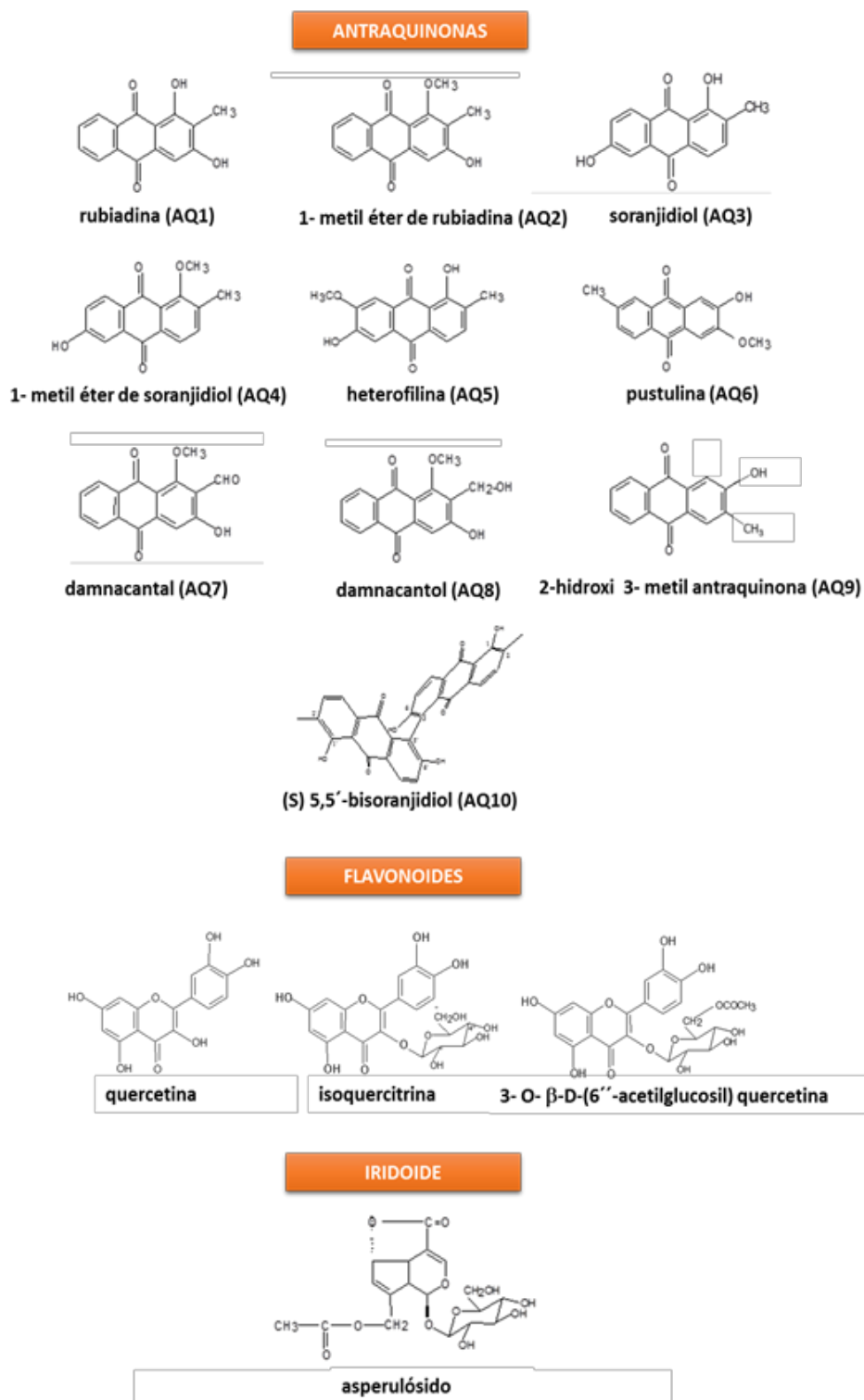
En cuanto a la generación de 1O_2 , se llevaron a cabo estudios fotofísicos y fotoquímicos de este grupo de AQs. El número de moléculas de 1O_2 producidas por cada fotón absorbido por un FS, se denomina rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete (ϕ_Δ). Esta producción de 1O_2 se determinó a través de una técnica en tiempo resuelto que mide la luminiscencia infrarroja cuando se desactivan las moléculas de 1O_2 producidas (Núñez Montoya *et al.*, 2005).

Se demostró que las AQs aisladas de *H. pustulata*, con excepción de 1-metil éter de rubiadina, son capaces de generar 1O_2 en $CHCl_3$. Se destaca damnacantal como el mejor productor de esta ERO bajo estas condiciones (Núñez Montoya *et al.*, 2005). En consecuencia, esta propiedad las postularía como FS Tipo II.

A su vez, se pudo estimar que el camino predominante de relajación de estos derivados sería a través de un ISC desde el primer singlete excitado ($^1AQ^*$) al triplete ($^3AQ^*$), y que la mayoría de estos compuestos poseen bajos valores de fluorescencia (10^{-2} - 10^{-4}). El rendimiento cuántico relativo de fluorescencia (ϕ_f) de cada AQ se estimó en comparación con 9,10 difenil antraceno (9,10 DFA) y naftaleno.

Al mismo tiempo se pudo determinar que estos compuestos son pobres o moderados desactivantes del 1O_2 (estudio fotoquímico), lo cual los definió como mejores FS Tipo II, ya que no desactivan de manera relevante al 1O_2 generado por ellos mismos (Núñez Montoya *et al.*, 2005). Mediante estudios de fotólisis, se pudo establecer que las AQs como tal son las que generaron 1O_2 mediante un proceso de fotosensibilización y no algún fotoproducto, ya que fueron estables bajo condiciones de irradiación.

Figura 1.6 Estructura química de los metabolitos secundarios aisladas de hojas y tallos de *H. pustulata*.



En vista de todos estos avances realizados sobre el estudio de la planta fototóxica *H. pustulata*, en esta tesis doctoral se pretende investigar el uso potencial de las principales AQs fotosensibilizantes en TFDa.

II- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1- Hipótesis

Se plantea como hipótesis de este trabajo de tesis doctoral que las AQs aisladas de *Heterophyllaea pustulata*, con acción fotosensibilizadora, podrían tener actividad antifúngica sobre hongos en biofilms. Así, el efecto antifúngico podría ser foto-estimulado y por lo tanto, relacionado con el estrés oxidativo celular.

II.2- Objetivos

II.2.1- Objetivo general

El objetivo general del presente proyecto fue aislar y purificar principios fotosensibilizadores biológicamente activos, presentes en plantas autóctonas de nuestro país, evaluando su capacidad antifúngica sobre biofilms del género *Candida* y su relación con la generación de metabolitos reactivos del oxígeno.

II.2.2- Objetivos específicos

1) Evaluar la actividad de los extractos y de las AQs mayoritarias aisladas de *H. pustulata* sobre *Candida no albicans* formadora de biofilms, estudiando la citotoxicidad de los principios que resulten activos sobre células eucariotas.

2) Establecer si el efecto antifúngico producido por las AQs sobre biofilms podría ser incrementados por acción de la luz.

3) Evaluar si el posible mecanismo de acción de estos metabolitos fotosensibilizadores está relacionado con la generación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.

4) Determinar posibles efectos sinérgicos entre estas AQs con agentes antifúngicos usados actualmente en la terapéutica.

III- MATERIALES Y MÉTODOS

III.1- METODOLOGÍAS USADAS EN EL ANÁLISIS FITOQUÍMICO

III.1.1- Recolección e identificación del material vegetal

La planta entera, en estado de fructificación, se recogió en El Alisal (Departamento de Rosario de Lerma, Salta, Argentina) en febrero de 2013. Fue identificada por la Dra. Gloria Barboza (Museo Botánico de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, IMBIV-CONICET) como *Heterophyllaea pustulata* Hook. F (Rubiaceae). Una muestra de herbario se depositó en el Museo Botánico de Córdoba como J. Micheloud s/n, CORD 19759 (Marioni *et al.*, 2016a).

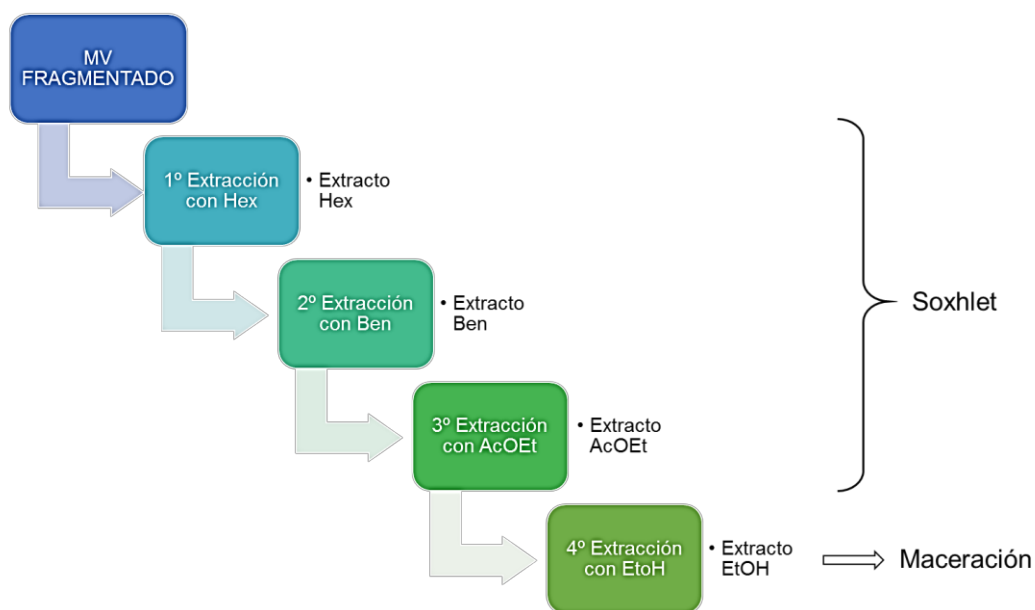
III.1.2- Preparación del material vegetal

El material vegetal (MV) se secó a la sombra y a temperatura ambiente, con rotación esporádica a fin de permitir un desecado homogéneo. Posteriormente, se realizó una inspección visual de todo el MV, durante la cual se descartó la materia extraña: vegetal (partes de la planta deterioradas u otras especies vegetales), inorgánica y animal. Posteriormente, el MV se separó en tres grupos: raíces, tallos - hojas (que se llamó partes aéreas) y frutos. Las partes aéreas y las raíces, en forma separada, se fragmentaron en una primera instancia a mano. Seguidamente, se molieron en un molino a cuchillas (Retsch KG tipo SK1, N° 13176, Alemania) a través de un tamiz N° 6.

III.1.3- Obtención de extractos

Las partes aéreas (270 ± 1 g) y las raíces (90 ± 1 g) por separado, se extrajeron sucesivamente con solventes de polaridad creciente en un aparato Soxhlet: hexano (Hex), benceno (Ben) y acetato de etilo (AcOEt). Finalmente, cada grupo de MV se sometió a una maceración con etanol (EtOH) (Fig. 3.1). De esta forma, se obtuvieron cuatro extractos para cada grupo (Hex, Ben, AcOEt y EtOH), los cuales se concentraron a presión reducida hasta sequedad en un evaporador rotatorio (Büchi, R110, Brasil) (Núñez Montoya, 2002; Núñez Montoya *et al.*, 2003).

Figura 3.1 Esquema de obtención de extractos con solventes de polaridad creciente.



MV: Material vegetal, Hex: hexano, Ben: benceno; AcOEt: acetato de etilo, EtOH: etanol.

III.1.4- Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en extractos: Cromatografía líquida de alta resolución

Teniendo en cuenta los antecedentes químicos de *H. pustulata* (Núñez Montoya, 2002; Núñez Montoya *et al.*, 2003), se desarrolló una metodología que utiliza cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta-visibe (HPLC-UV-Vis: High Performance Liquid Chromatography) para realizar la identificación y cuantificación de los principales compuestos químicos presentes en los extractos obtenidos, específicamente AQs y flavonoides. A su vez, la identidad de estos metabolitos se corroboró por HPLC con detector de arreglo de diodos (DAD) y acoplada a espectrómetro de masa-masa (HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF: High Performance Liquid Chromatography/Diode-array detector/Mass Spectrometry).

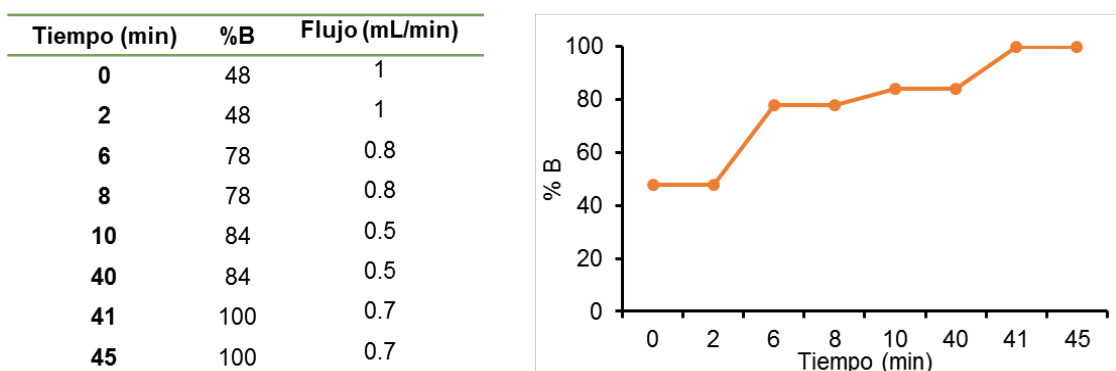
A- Ensayo analítico de HPLC-UV-Vis

Se utilizó un cromatógrafo Varian Pro Star (modelo 210, 04171 serie, EEUU), equipado con un detector ultravioleta-visible (UV-Vis) y una columna C-18 Microsorb MV-100-5 (250 x 4,6 mm de diámetro interno, Agilent, Holanda). La fase móvil (FM) estuvo compuesta por dos soluciones: ácido fórmico 0,16 M (A) y metanol (MeOH)-ácido fórmico 0,16 M (B). El gradiente de elución con flujo variable se muestra en la Fig. 3.2. El detector UV-Vis se utilizó a 269 nm. El volumen de inyección manual fue de

20 μ L. El análisis de los datos se realizó mediante el software Star Chromatography Workstation 6.41 (Varian, EEUU).

Como testigos de AQs y flavonoides se utilizaron los compuestos previamente purificados por el grupo de Farmacognosia, los cuales se identificaron por medio de sus datos espectrales: espectrofotometría UV-Vis, infrarrojo (IR), espectrometría de masa (EM), y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en una y dos dimensiones (Núñez Montoya, 2002; Núñez Montoya *et al.* 2003, 2006).

Figura 3.2 Gradiente de elución utilizado en el ensayo analítico HPLC-UV-Vis



Cada extracto desecado y cada compuesto de referencia se pesaron y a continuación, se disolvieron en el volumen necesario de MeOH grado HPLC (MeOH-HPLC, Sintorgan) para obtener soluciones de 1 mg/mL. Finalmente, cada solución se filtró a través de papel Whatman N° 1 (sistema de micro-filtración).

La identificación se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención (t_R) con los obtenidos para cada compuesto de referencia y realizando co-cromatografía, mediante el agregado del estándar a la solución de extracto. Los valores de t_R de cada metabolito identificado se expresaron como la media \pm desviación estándar de tres inyecciones para cada muestra.

La cuantificación se realizó por el método de calibración externa. La concentración de cada AQ identificada se expresó como rubiadina (**AQ1**) y la de cada flavonoide como quercetina (**Quer**). Para cada uno de estos estándares se confeccionó una curva de calibración (**AQ1** y **Quer**, 94-96 % pureza según HPLC), graficando el área bajo la curva de cada pico (ABC) en función de la concentración de cada analito. A partir de una solución madre de cada analito (1 mg/mL) en MeOH-HPLC se prepararon cinco diluciones consecutivas (1:2), en el intervalo de 0,10 a $6,25 \times 10^{-3}$ mg/mL para **AQ1**, y 0,20 - $1,25 \times 10^{-2}$ mg/mL para **Quer**. Las soluciones madre se prepararon por triplicado, y a partir de ellas se realizaron tres curvas de calibración en dos días consecutivos (dos curvas el primer día, y la tercera al día

siguiente). Todas las soluciones se conservaron a -20 °C durante la realización de estas curvas. A partir del análisis de regresión lineal, el valor mínimo aceptable para el coeficiente de correlación (R^2) de la curva fue $\geq 0,99$. A partir de la curva de calibración de **AQ1**, se determinó la concentración de cada AQ en los extractos por extrapolación del ABC de cada compuesto. De la misma manera, se determinó la cantidad de flavonoides, pero utilizando la curva de calibración de **Quer**. Por último, la concentración de cada compuesto se expresó como porcentaje peso en peso (% p/p) en el extracto desecado.

Este método analítico de HPLC también se usó para establecer el grado de pureza de las Aqs. En este caso, se informó el porcentaje del compuesto purificado en la muestra inyectada, el cual fue calculado por el software Star Chromatography Workstation 6.41, según el método de normalización de aéreas.

B- Validación del método analítico de HPLC-UV-Vis

Se realizó una serie de ensayos para garantizar que el método de validación cumpliera con las directrices de la "Food and Drug Administration" (FDA), establecidas en la Conferencia Internacional de Armonización (International Conference on Harmonization, 2005a, b). Estas directrices incluyen la determinación de los siguientes parámetros del método analítico: selectividad, linealidad y rango lineal, límites de detección (LOD: Limit of detection) y cuantificación (LOQ: Limit of quantitation), precisión y exactitud intra e inter-día.

La selectividad estuvo dada por la λ elegida, que permitió detectar los compuestos de interés sin interferencias. La linealidad de la curva de trabajo se comprobó mediante la verificación del cumplimiento de la Ley de Lambert-Beer en el rango de concentraciones ensayadas para cada uno de los compuestos de referencia (**AQ1** y **Quer**), y se expresó como $R^2 \geq 0,99$.

Los valores de LOD y LOQ de cada uno de los compuestos de referencia (**AQ1** y **Quer**) se determinaron a partir de la desviación estándar de la intersección en y - (S_b) y la pendiente "a" de la curva de calibrado, obtenida por dilución de las soluciones patrón de forma secuencial de cada uno de los compuestos correspondientes (Quattrocchi *et al.*, 1992).

La precisión y la exactitud intra- e inter-día del sistema cromatográfico se evaluó mediante el uso de dos concentraciones de cada analito (**AQ1** y **Quer**), ambas seleccionadas de las respectivas curvas de calibrado (dentro del rango de linealidad). Cada concentración se preparó por triplicado, mediante la dilución de las respectivas soluciones madre que se prepararon como se describió anteriormente (Punto II-1.4-A).

Las dos soluciones de concentración conocida de cada estándar de referencia, cada una por triplicado, se analizaron en el mismo día (repetitividad) y en 3 días consecutivos (reproducibilidad). El criterio de aceptabilidad para la precisión intra- e inter-día fue la desviación estándar relativa (RSD: relative standard deviation) para cada concentración ensayada, la cual no debe superar el valor máximo de RSD calculado por la ecuación de Horwitz (Ecuación 1), donde C es el LOD de cada analito expresado en logaritmo de base 10 (Horwitz, 1982).

$$RSD_{\max} = 2^{(1-0,5\log C)}$$

Ecuación 1

Las precisiones intra e inter-día del procedimiento analítico, junto con la exactitud (recuperación de los analitos) se evaluaron por el agregado del estándar **AQ1** (45 mg/mL) al extracto Ben y del estándar **Quer** (30 mg/mL) al extracto de AcOEt. Los extractos enriquecidos con los respectivos estándares se inyectaron en el cromatógrafo por tres días consecutivos, siguiendo el método aplicado para el análisis de las muestras. Las variaciones se establecieron utilizando la RSD de las inyecciones por triplicado. La exactitud del método se evaluó mediante el análisis del porcentaje de recuperación del compuesto **AQ1** en el extracto Ben y del compuesto **Quer** en el extracto de AcOEt. Este porcentaje de recuperación se calculó utilizando la relación entre el contenido detectado (real) respecto al contenido agregado (teórico).

C- Ensayo analítico de HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF

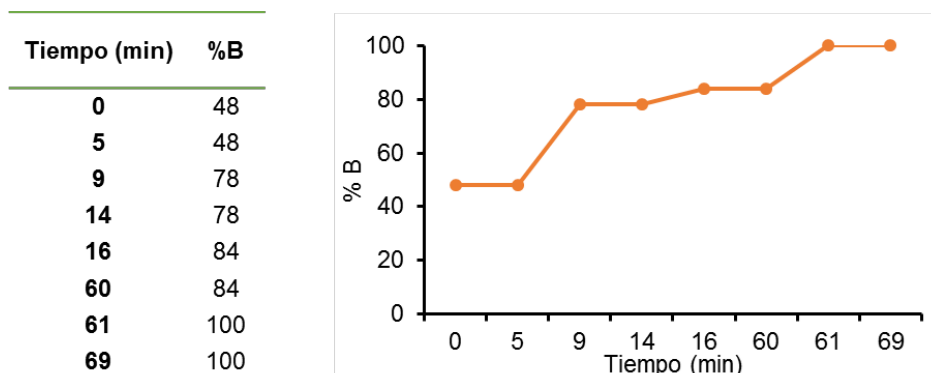
Se utilizó un cromatógrafo Agilent Technologies (1200 series, EEUU), equipado con una bomba de gradiente (Agilent G1312B SL Binary), un desgasificador de solventes (Agilent G1379 B) y un inyector automático (Agilent G1367 D SL + WP). El sistema de HPLC está conectado a un detector DAD (Agilent G1315 C Satarlight), el cual está acoplado a un espectrómetro de masa-masa (MS-MS, serie micrOTOF-Q11, Bruker), equipado con una interfaz de ionización por electro spray (ESI). Se utilizó la misma columna que en Punto III-1.4-A.

La FM estuvo compuesta por las dos soluciones anteriormente utilizadas. El gradiente de elución a un flujo constante de 0,4 mL/min se muestra en la Fig. 3.3.

El volumen de inyección fue de 40 μ L. El detector DAD se utilizó a 269, 362 y 410 nm. Los espectros UV-Vis se registraron de 200 a 600 nm. La medición de la masa se registró en el modo de iones negativos entre relación masa/carga (m/z) 50 y 1000. Las condiciones de trabajo para la fuente de ionización fueron las siguientes: voltaje capilar 4500 V; nebulizador de presión de gas 4,0 bares; flujo de gas de secado 8,0 L/min y temperatura del gas de secado 180 °C. Se utilizaron nitrógeno y argón

como nebulizador y gases de colisión, respectivamente. El detector de MS fue programado para realizar una exploración MS-MS de los tres iones más abundantes, usando energía de colisión de 15,0 eV. La adquisición y el procesamiento de datos se realizaron utilizando el software Compass Versión 3.1 y el software Data Analysis Version 4.0 (Bruker Daltonics GmbH, EEUU), respectivamente.

Figura 3.3 Gradiente de elución utilizado en el ensayo analítico HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF



Se utilizaron las mismas soluciones de testigos y extractos que se prepararon para HPLC-UV-Vis (II-1.4-A) (Núñez Montoya, 2002; Núñez Montoya *et al.* 2003, 2006).

La identificación se llevó a cabo por comparación de los t_R , espectros UV y rompimientos del ión $[M-1]$ con los obtenidos para cada compuesto de referencia.

III.1.5- Métodos de separación y purificación de antraquinonas

A- Cromatografía en columna

Se utilizó cromatografía de adsorción que usa como fase estacionaria (FE) sílica gel 60 (Merck, Alemania), de 70 – 230 mesh ASTM. La FM consistió en un gradiente de elución de dos o más solventes, los cuales variaron según la naturaleza físico-química de los compuestos a separar. Todas las columnas fueron seguidas analíticamente por cromatografía en capa fina (TLC: Thin Layer Chromatography).

B- Cromatografía en capa fina preparativa

La TLC como técnica preparativa (TLCp) permite la separación y purificación de los componentes de una mezcla.

En este caso, se emplearon dos tipos de placas. Unas elaboradas manualmente con sílica gel 60 G (Merck, Alemania) y agua destilada en una proporción 1:1,5 sobre un vidrio de 20 x 20 cm, para mezclas o fracciones con muchos componentes; y cromatofolios de sílica gel 60 sin indicador de fluorescencia (Merck, Alemania, 20 x 20 cm) para mezclas o fracciones con menor cantidad de componentes. El tamaño de ambas placas permitió sembrar entre 5 y 10 mg de la mezcla a separar, en forma de banda. Las placas se desarrollaron en la FM que presentó mejor resolución, según la TLC analítica previamente realizada. Las manchas de AQs se revelaron con luz UV y vapores de NH₃ con luz UV. Todos los compuestos purificados por TLCp fueron extraídos de la sílica gel con AcOEt o acetona.

III.1.6- Métodos de identificación de antraquinonas

A- Cromatografía en capa fina analítica: Co-cromatografía

La TLC como técnica analítica permite la identificación de compuestos, comparando la Relación de frente (R_f) de la sustancia problema con un compuesto testigo. Además, se utilizó esta técnica para analizar las fracciones obtenidas de las cromatografías en columna.

Se utilizaron cromatofolios de sílica gel 60 sin indicador de fluorescencia (Merck, Alemania) como FE. Como FM se emplearon distintas mezclas de solventes, de acuerdo a las propiedades físico-químicas de los compuestos a analizar y con el fin de conseguir la mejor separación. Entre ellas se pueden citar las siguientes fases móviles:

- CHCl₃
- CHCl₃-AcOEt (9:1)
- Ben-AcOEt (80:20)
- Ben-MeOH (95:5)

Las manchas de AQs se revelaron con luz UV, vapores de NH₃ con luz UV y con vapores de NH₃ bajo luz visible (Wagner *et al.*, 1984).

La co-cromatografía es una variante de la cromatografía analítica. En el caso de la TLC, el compuesto desconocido se siembra conjuntamente con el compuesto testigo y a su vez, en forma separada en la misma placa cromatográfica, la cual se desarrolla en la FM que presentó mejor resolución. Permite identificar un compuesto desconocido contra testigo, ya que si son el mismo compuesto, en la siembra conjunta no se separan, presentando la misma R_f .

B- Espectrofotometría Ultravioleta-Visible

Todas las AQs que se obtuvieron en estado puro, se caracterizaron mediante sus espectros UV-Vis en CHCl_3 y EtOH, desde 220 a 800 nm. Para ello se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Cary Win (Santa Clara, EEUU) y celdas de cuarzo. Todos los solventes usados fueron grado espectroscópico.

La identidad de las AQs puras se determinó por comparación de los datos obtenidos en espectrofotometría UV-Vis con los espectros de las AQs testigos.

C- Espectrometría de Masa

Los espectros de masa de ionización electrónica se obtuvieron en un espectrometro de masa Variant Mat CH-7A a 70 eV.

D- Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de RMN se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Advance II 400 (Rheinstetten, Alemania). Los espectros de RMN de protones (RMN- H^1) se realizaron a una frecuencia de 400 MHz y los de carbono 13 (RMN- C^{13}) a 100 MHz de frecuencia. Los compuestos a analizar se disolvieron en solventes deuterados de grado espectroscópico, específicamente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) o acetona deuterada (acetona- d_6). Los corrimientos químicos (δ) se informaron en ppm en relación a tetra metil silano como estándar interno, y los valores de las constantes de acoplamiento (J) se expresaron en Hz. Todos los espectros se procesaron con el software Bruker 1D WIN-NMR versión 6.0 (Bruker, Alemania). Los datos espectrales obtenidos de los compuestos a identificar se compararon con los de los compuestos testigos.

E- Espectroscopía Infrarroja

Los espectros de IR se obtuvieron en un espectrofotometro de infrarrojo Nicolet 5-sxc-FTIR (Madison, WI, USA).

III.2- ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Estos ensayos se realizaron como un trabajo en colaboración con la Dra. Brenda Konigheim del Instituto de Virología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba (UNC).

Los ensayos de citotoxicidad implican evaluar la toxicidad *in vitro* de un compuesto sobre líneas celulares, mediante la evaluación del efecto citopático (EC) y la viabilidad celular (VC).

Para este ensayo, se eligieron las células Vero, las cuales son células de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*, Vero 76 ATCC CRL-587). Las células se cultivaron en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ a 37 °C. Se utilizó Medio Esencial Mínimo (MEM, Gibco), suplementado con diferentes porcentajes de suero fetal bovino (SFB, Natocor) como medio de crecimiento (MC) o medio de mantenimiento (MM), según lo descrito en el Anexo I (Konigheim *et al.*, 2012b).

Los compuestos a ensayar (AQs) fueron disueltos en buffer fosfato salino (PBS: phosphahte-buffered saline) con 1 % de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) como co-solvente para obtener una solución madre de 1 mg/mL. Luego, se realizaron diluciones seriadas 1:2, abarcando un rango de 30 a 50 µg/mL según la solubilidad de cada compuesto.

III.2.1- Efecto citopático

Para evaluar el EC se observaron las alteraciones morfológicas producidas en las células Vero por acción de cada compuesto, mediante microscopía óptica de fase invertida (microscopio Diavert Leitz, de 4x a 100x). Cada dilución se añadió por duplicado a una monocapa de células confluentes ($2,0 \pm 0,6 \times 10^5$ células/mL, incubadas 48 h para alcanzar al menos un 95 % de confluencia). Como control celular (CC) se utilizaron células incubadas solamente con MM. Las placas de cultivo se incubaron a 37 °C en 5 % de CO₂ durante 72 h. La morfología de las células se observó diariamente al microscopio, detectando alteraciones como: modificación del contorno celular (redondeo), retracción de la membrana, desprendimiento de células con la consecuente pérdida de la monocapa, aparición de gránulos y vacuolas en el citoplasma (Ooi *et al.*, 2004).

III.2.2- Viabilidad celular: Ensayo de captación de Rojo Neutro

La VC se midió por el ensayo de captación de rojo neutro (RN), siguiendo el procedimiento descrito por Borenfreund y Puerner (1985) y modificado por Konigheim

et al., 2012. Las mismas diluciones utilizadas en el prueba de EC se añadieron a una similar monocapa confluyente de células, por triplicado y usando CC (n = 3). Después de 48 h de incubación a 37 °C en 5 % de CO₂, se agregó RN incubando 3 h adicionales. La densidad óptica (DO) del RN extraído, se midió a 540 nm utilizando un lector de microplacas (BioTek ELx800, EEUU). La disminución en la VC se calculó como un porcentaje respecto de la DO del CC (100 % de viabilidad). La concentración del compuesto que redujo las células viables al 50 % se definió como concentración citotóxica (CC₅₀). La máxima concentración no citotóxica (MCNC) se definió como la concentración más alta de compuesto que mostró más del 90 % de células viables y sin ejercer ningún EC (Liu *et al.*, 2009). La concentración Sub-tóxica (CSubT) se definió como la concentración que causó el 10-20 % de la muerte celular (Cholewa *et al.*, 1994) y produjo ligeros cambios morfológicos observado por microscopía (menos del 20 % de células hinchadas y redondeadas, con inclusiones citoplasmáticas, ligera vacuolización, y sin daño aparente de la membrana celular) (Konigheim *et al.*, 2012a; 2012b). Todas estas concentraciones se estimaron a partir de las curvas dosis-respuesta (% VC vs. concentración de AQ) con el programa GraFit 7.0 (Inglaterra).

III.3- METODOLOGÍAS USADAS EN EL ESTUDIO FOTOMICROBIOLÓGICO:

Estos ensayos se realizaron en el laboratorio de la Prof. Dra. María G. Paraje, IMBIV-CONICET, Cátedra de microbiología, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales (FCEyN), Universidad Nacional de Córdoba.

III.3.1- Identificación de cepas microbianas y condiciones de cultivo

Con el propósito de obtener biofilms fúngicos, se evaluó la capacidad de formación de éstos por parte de 8 cepas clínicas y 2 cepas de referencia de *Candida* spp. Las cepas clínicas fueron identificadas y provistas por el Servicio de Bacteriología de la Clínica Universitaria Privada Reina Fabiola (Universidad Católica de Córdoba). Las cepas clínicas comprendían: 2 cepas de *C. glabrata*, 3 de *C. tropicalis*, 2 de *C. albicans* y 1 cepa de *C. parapsilosis*. Las cepas de referencia pertenecen al National Collection of Pathogenic Fungi (NCPF): una de *C. tropicalis* (NCPF 3111) y una de *C. albicans* (NCPF 3153).

Las soluciones stock de estas cepas se conservaron a -80 °C, suspendidas en Caldo Sabouraud Glucosado (CSG, Britania) con 10 % (v/v) de glicerol como crioprotector. A fin de garantizar la pureza y viabilidad de las levaduras, se realizó un repique de la solución stock en Agar Sabouraud Glucosado (ASG, Britania), el cual se mantuvo por 3 meses mediante repiques cada 15 días. A partir de éstos se realizaron cultivos “overnight” a 37 °C con el mismo medio cultivo para realizar los ensayos, siguiendo las normas del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002).

III.3.2- Ensayo de formación de biofilms

La capacidad de las cepas fúngicas para formar biofilms se evaluó por medio de una microtécnica adaptada en el laboratorio de microbiología (Cátedra de microbiología, FCEyN), a partir del método descrito por O'Toole y Kolter (O'Toole y Kolter, 1998). Los cambios consistieron en la utilización de una microplaca de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania), que se pre-trató con SFB al 50 % (v/v) en CSG de pH 6 durante 30 min a 37 °C (Arce Miranda *et al.*, 2011; Pierce *et al.*, 2008; Peralta *et al.*, 2015; Marioni *et al.*, 2016a). Posteriormente, la placa se lavó dos veces con PBS estéril 10 mM (pH = 7,2). Cada cepa se agregó por triplicado, utilizando 200 µL por pocillo de la suspensión de levaduras en CSG (pH 6,5 ajustado con NaOH 0,1 M), la cual contenía 1×10^7 unidades formadoras de colonia en 1 mL (UFC/mL). Los pocillos controles (n = 3), pre-tratados de igual manera, sólo contuvieron CSG estéril (pH 6,5). La microplaca se incubó durante 90 min a 37 °C para permitir la adherencia de las

células a la superficie. Después de esta primera incubación, se realizó un lavado con PBS para remover las levaduras no adheridas. Luego del agregado de medio fresco (CSG), se continuó la incubación sin agitación a la misma temperatura hasta completar 48 h, obteniéndose un biofilm maduro. Posteriormente, el sobrenadante se descartó y la microplaca se secó a temperatura ambiente durante 24 h. El biofilm se tiñó con una solución de Cristal Violeta 1 % (p/v) (CV) por 3 min. El biofilm adherido se lavó con PBS para remover el colorante; y finalmente, el CV se extrajo con una solución de EtOH/acetona (70:30, Porta/Merck), usando 200 μ L por pocillo. La DO se midió a 595 nm en un lector de microplacas (Tecan Sunrise Model, TECAN, Australia).

Para cada cepa se obtuvo la DO promedio ($n = 3$) que fue comparada con la del control (DO_c). Las cepas se clasificaron según su capacidad para formar biofilms siguiendo los criterios de la Tabla 3.1 (Stepanovic *et al.*, 2007; Arce Miranda *et al.*, 2011; Peralta *et al.*, 2015):

Tabla 3.1: Criterios de clasificación de las cepas formadores de biofilms.

$DO \leq DO_c$	no productora de biofilms
$DO_c < DO \leq (2 \times DO_c)$	leve productora de biofilms
$(2 \times DO_c) < DO \leq (4 \times DO_c)$	moderado productora de biofilms
$(4 \times DO_c) < DO$	fuerte productora de biofilms

La cantidad de biofilms formado se expresó en Unidad de Biomasa de Biofilms (UBB), definida arbitrariamente como 0,1 DO₅₉₅ igual a 1 UBB. (Arce Miranda *et al.*, 2011).

III.3.3- Sistema de irradiación

Como sistema de irradiación se utilizó una lámpara actínica usualmente usada para el tratamiento de la hiperbilirrubinemia humana (www.philips.com/phototherapy). Se trata de una lámpara Phillips TL 20W/52 con un máximo de emisión a 420 nm (380 – 480nm, 0,65 mW/cm²). Esta lámpara se ubicó por encima de las muestras dentro de una caja negra (Comini *et al.*, 2011).

III.3.4- Optimización de las condiciones de irradiación: tiempo y distancia de irradiación

Este estudio se realizó con el fin de establecer el tiempo y la distancia de irradiación que no producen alteraciones en el biofilm. A su vez, se evaluó la utilización de DMSO como co-solvente. Para ello, se ensayó el caldo de cultivo (CSG) con y sin agregado de DMSO al 1 %, sobre el biofilm maduro.

A dos microplacas con biofilm maduro, se les agregó CSG fresco con y sin DMSO 1 % por triplicado. Luego, se irradiaron con el sistema previamente descrito (punto II-3.3), ubicando la lámpara a diferentes distancias para cada placa: 20 y 40 cm, durante diferentes períodos de tiempo: 5, 10, 15 y 20 min. Una tercera microplaca se mantuvo en oscuridad como control de irradiación. Posteriormente, las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h y se cuantificó la formación de biofilm con CV como se describió en el punto II-3.2.

III.3.5- Determinación de la concentración inhibitoria mínima fotoactiva en levaduras planctónicas

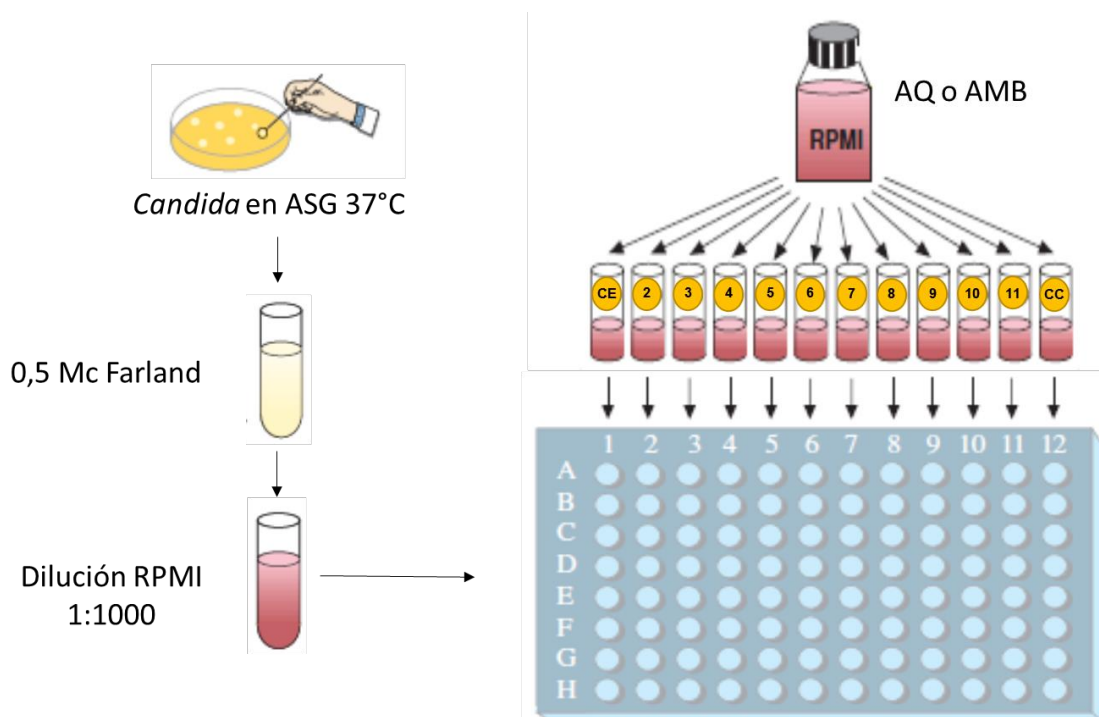
El parámetro inicial para evaluar la susceptibilidad de un microorganismo a un potencial fármaco es la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM). Para levaduras en estado planctónico, la CIM se definió según las normas establecidas por el CLSI en el documento M27-A3 (CLSI, 2008). Para los antifúngicos fungistáticos, la CIM se define como la concentración más baja de fármaco que produce una inhibición ≥ 50 % en el crecimiento de las levaduras, mientras que para los antifúngicos fungicidas la CIM es la menor concentración de antifúngico que inhibe el 100 % del crecimiento (CLSI, 2008).

En este ensayo se determinó la sensibilidad de *C. tropicalis* a rubiadina (**AQ1**) y 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) (Fig. 1.6), utilizando una cepa clínica y otra cepa de referencia (NCPF 3111). Para ello, se aplicó el método descrito por el CLSI (2008) modificando el experimento con el agregado de luz. En esta situación experimental, una microplaca se irradió durante 15 min antes de su incubación; mientras que otra microplaca se mantuvo simultáneamente en oscuridad. De esta manera, se determinó la CIM (en oscuridad) y la CIM fotoactiva (CIMf).

El medio utilizado en el ensayo fue "Roswell Park Memorial Institute 1640" (RPMI) con glutamina y sin bicarbonato de sodio (Sigma, EEUU), tamponado con ácido morfolino propano sulfónico 0,164 M (MOPS, Sigma), con 0,2 % de glucosa y ajustando el pH a 7 (con NaOH 1 N).

El inóculo se preparó tomando de 4 a 5 colonias de un cultivo de 24 h de crecimiento en una placa con ASG (Fig. 3.4), y se suspendieron en un tubo con solución de NaCl al 0,85 %. Se agitó y se ajustó la DO a 0,5 de la escala de Mc Farland con un espectrofotómetro a 530 nm (Modelo Tecan Sunrise, TECAN, AUS). Este valor equivale a $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ UFC/mL. Seguidamente, se realizó una dilución 1:1000 con RPMI, y se agregó (100 μ L x pocillo) en las columnas 2 a 11 de la microplaca de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania) (Fig. 3.4). La concentración final de las levaduras en cada pocillo fue de $0,5 \times 10^3 - 2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Como control de esterilidad se agregó RPMI en la primera columna de la microplaca, y como control positivo se agregó el inóculo de la cepa de *C. tropicalis* ensayada en la columna 12.

Figura 3.4 Esquema del método de microdilución para determinar la CIM en *C. tropicalis*



Cada AQ se disolvió en DMSO y luego se diluyó con RPMI, de manera que la concentración final de DMSO no superó el 1 %. A partir de esta solución madre (1 mg/mL) se prepararon diluciones en el rango de concentraciones de 0,24 a 500 μ g/mL para ambas AQs, siguiendo el método de las diluciones dobles seriadas aditivas. Cada dilución se agregó a la placa de 96 pocillos por columnas (100 μ l x pocillo) de la 2 a la 11 por duplicado (Fig. 3.4) (CLSI, 2008).

Como control antifúngico se utilizó AMB. Se determinó su CIM y CIMf, siguiendo el procedimiento descrito en un rango de concentraciones de 0,03 a

16 µg/mL. Las diluciones se prepararon con la misma metodología usada para las AQs (CLSI, 2008).

Una vez finalizada la incubación (48 h a 37 °C) de las microplacas (oscuridad e irradiación), se realizó la lectura espectrofotométrica de las DO de todos los pocillos a 490 o 530 nm en el mismo lector de microplacas usado anteriormente. A partir de las DO se determinó cuáles eran las concentraciones que producían el 100 % de inhibición respecto al control de crecimiento.

III.3.6- Determinación de la actividad antibiofilm: Fotoinactivación de biofilms fúngicos

La actividad antibiofilm *in vitro* de extractos y AQs obtenidos de *H. pustulata* se evaluó sobre biofilms maduros (48 h incubación), formados como se describió anteriormente (punto II-3.2), y usando específicamente las cepas clasificadas como fuerte productoras de biofilms (O'Toole & Kolter, 1998; Arce Miranda *et al.*, 2011; Peralta *et al.*, 2015; Marioni *et al.*, 2016a, Marioni *et al.*, 2016b).

El ensayo consistió en lavar el biofilm maduro con PBS estéril e inmediatamente se agregan las concentraciones de la muestra (extracto o AQ) por triplicado (200 µl por pocillo). Como control de esterilidad se utilizó CSG (pH 6,5) y como control negativo se utilizó CSG con DMSO 1% (pH 6,5), ambos se ensayaron por triplicado. AMB se utilizó como control positivo bajo las mismas condiciones (n = 3). El estudio se realizó simultáneamente en dos microplacas, una se sometió a condiciones de irradiación durante 15 minutos, y la otra se mantuvo en oscuridad durante el mismo tiempo, luego de agregar las muestras a analizar. Se usó el sistema de irradiación descrito anteriormente (punto II-3.3), ubicándose la lámpara a 20 cm por encima de las muestras. Seguidamente, ambas placas se incubaron durante 48 h a 37 °C. Al finalizar la incubación, se separó el sobrenadante para medir la producción de ERO y ERN, y estudiar la activación de las defensas antioxidantes.

Después de retirar el sobrenadante, se cuantificó la formación de biofilms con CV como se explicó en el punto II-3.2, y se expresó en UBB (0,1 DO_{595nm} = 1 UBB) (Arce Miranda *et al.*, 2011).

Por otra parte, se determinó el porcentaje de reducción del biofilm, usando la siguiente fórmula (Nithyanand *et al.*, 2015):

$$\% R = \frac{DO_{595nm} \text{ Biofilm no tratado} - DO_{595nm} \text{ Muestra} \times 100}{DO_{595nm} \text{ Biofilm no tratado}}$$

A partir de este ensayo se obtuvo la concentración mínima de antimicrobiano que disminuyó el 50 ó 80 % del biofilm, denominada Concentración Inhibitoria Mínima Sésil (CIMS-50 y CIMS-80, respectivamente) (Pierce *et al.*, 2008).

A- Extractos de *H. pustulata*

Para evaluar los extractos de *H. pustulata*, se preparó una solución madre de cada extracto en CSG (1 % DMSO, pH 6,5), y a partir de éstas se realizaron tres diluciones a ensayar de cada extracto: 0,2; 0,1 y 0,05 mg/mL. AMB se usó a la concentración CIM determinada en el punto III-3.5.

B- Antraquinonas aisladas de *H. pustulata*

Según las CIMf determinadas para **AQ1** y **AQ2** sobre la cepa clínica y la cepa de referencia de *C. tropicalis*, se prepararon diluciones de las mismas en CSG (1 % DMSO, pH 6,5), para obtener tres concentraciones finales a ensayar: 0,5 x CIMf (Sub-CIMf), 1 x CIMf y 2 x CIMf (Supra-CIMf). Para AMB se procedió de la misma forma a partir de su CIM. La pureza de las AQs se estableció por HPLC, según la metodología descrita en el punto III-1.4-A.

Además, se realizó un estudio de correlación entre las UBB y las UFC/mL (Arce Miranda *et al.*, 2011; Marioni *et al.*, 2016b). Después del tratamiento antifúngico, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 µL de PBS estéril a cada pocillo y se sometió a ultrasonido (40 kHz, 60 s) con el fin de suspender las células del biofilm. Esta suspensión se diluyó 1000 veces con PBS estéril, y una alícuota (100 µL) se extendió uniformemente en una placa con ASG mediante espátula de Drigalsky estéril. A continuación, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se realizó el recuento de las colonias y se graficó las UFC/mL vs. las UBB obtenidas por CV. La correlación se verificó por una relación lineal con $R^2 > 0,99$.

III.3.7- Estudio del estrés celular en la fotoinactivación de biofilms de *Candida* spp.

El estrés oxidativo se evaluó por el ensayo de azul de nitro tetrazolium (NBT: Nitroblue Tetrazolium) que mide la producción de $O_2^{\bullet-}$, una de las principales ERO ya que a partir de ella se generan otras como H_2O_2 y HO^{\bullet} (Mattila *et al.*, 2015; Paraje *et al.*, 2008).

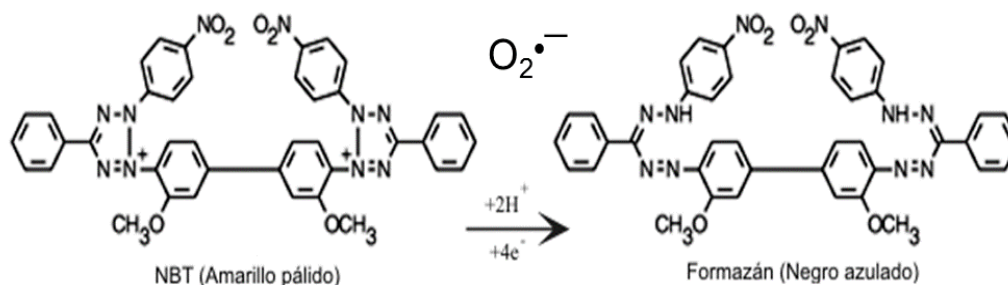
Para evaluar el estrés nitrosativo se utilizó la reacción de Griess, ya que mide una de las ERN estable, el ión nitrito (NO_2^-) (Arce Miranda *et al.*, 2011; Paraje *et al.*, 2009; Tsikas, 2007).

Ambos tipos de estrés celular se estudiaron en las dos condiciones experimentales de irradiación y oscuridad, a fin de poder realizar la comparación correspondiente, usando el sistema ya descrito (punto III-3.3) e irradiando durante 15 min a 20 cm (Marioni *et al.*, 2016a; Marioni *et al.*, 2016b).

A- Determinación de anión superóxido en biofilms: Ensayo de azul de nitro tetrazolium

Mediante un ensayo biológico indirecto que utiliza NBT, se evaluó la generación de $\text{O}_2^{\bullet-}$. En esta técnica, el NBT se reduce a un precipitado insoluble, el azul de diformazán (Fig. 3.5) por la acción oxidante de esta ERO. Así, la formación de azul de diformazán es directamente proporcional al $\text{O}_2^{\bullet-}$ generado y se cuantificó espectrofotométricamente a 540 nm (Arce Miranda *et al.*, 2011; Baronetti *et al.*, 2013; Paraje *et al.*, 2008; Konigheim *et al.*, 2012b, Marioni *et al.*, 2016a; Marioni *et al.*, 2016b).

Figura 3.5 Reacción de reducción de NBT.



Una alícuota (100 μL) del sobrenadante proveniente de cada pocillo del ensayo de actividad antibiofilm, se traspasó a otra microplaca y se incubó con 100 μL de NBT (1 mg/mL) a 37 °C durante 30 min. La reacción se detuvo agregando 20 μL de HCl 0,1 N. La DO de cada pocillo se midió usando el mismo lector de microplaca.

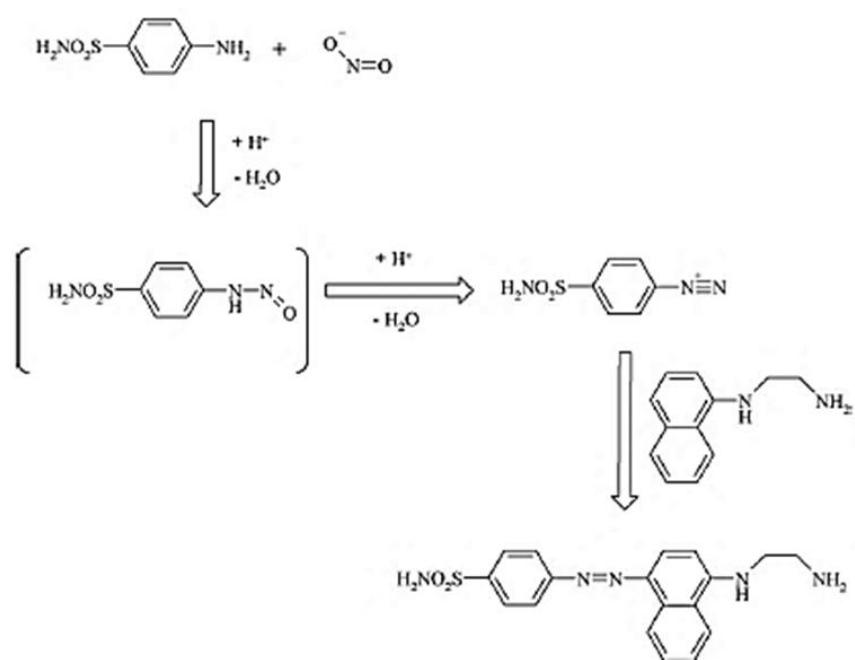
Los resultados se expresaron como $\text{DO}_{540\text{nm}}/\text{UBB}$ ($\text{O}_2^{\bullet-}/\text{UBB}$) con el fin de correlacionar la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ con la formación de biofilms para cada condición ensayada (Arce Miranda *et al.*, 2011; Peralta *et al.*, 2015).

B- Reacción de Griess: Determinación del radical óxido nítrico en biofilms

La producción de NO• se determinó midiendo la acumulación de sus productos de degradación estables, específicamente NO₂⁻, mediante un ensayo en microplaca usando el reactivo de Griess y una curva de calibración de NaNO₂ como estándar (Arce Miranda *et al.*, 2011; Peralta *et al.*, 2015; Paraje *et al.*, 2009; Baronetti *et al.*, 2011).

En condiciones ácidas el NO₂⁻ reacciona con los grupos aminos de la sulfanilamida para formar el catión diazonio, el cual se acopla a la N-(1-naftil) etilendiamina formándose el correspondiente azo compuesto que se mide espectrofotométricamente a 540 nm (Fig. 3.6). Por lo tanto, en esta reacción, la producción del compuesto azo es proporcional a los NO₂⁻ formados (Tsikas, 2007).

Figura 3.6 Reacción de Griess (extraída de Tsikas, 2007).



El reactivo Griess se preparó mezclando sulfanilamida (1,5 % en HCl) con un volumen igual de diclorhidrato de N-(1-Naftil) etilendiamina (0,13 % en H₂O) (Tsikas, 2007).

El sobrenadante (100 μL) de cultivo se mezcló con 200 μL de reactivo Griess en otra microplaca que se mantuvo a 25 °C y oscuridad durante 15 min. Al cabo de ese tiempo se midió la DO a 540 nm en el lector de microplacas mencionado anteriormente. La concentración de NO₂⁻ se determinó por extrapolación de la absorbancia obtenida para cada pocillo en un curva de calibrado de NaNO₂ (DO vs.

concentración de NO_2^-). Los resultados se expresaron como la relación entre la concentración de nitritos (μM) producida por 1 UBB, siendo la unidad usada intermediarios reactivos del nitrógeno por UBB (ERN/UBB) (Arce Miranda *et al.*, 2011; Paraje *et al.*, 2008; Peralta *et al.*, 2015, Marioni *et al.*, 2016a, Marioni *et al.*, 2016b).

La curva de calibrado se realizó a partir de una solución madre de NaNO_2 (500 μM en agua destilada), utilizándose 12 diluciones seriadas 1:2 por duplicado (0,24 a 500 μM), las cuales fueron tratadas con el reactivo de Griess. Se graficó la DO del compuesto azo formado en función de la concentración de NO_2^- . La curva de calibración se considera válida en el rango de concentraciones cuando se obtiene una ecuación de la recta con $R^2 \geq 0,99$.

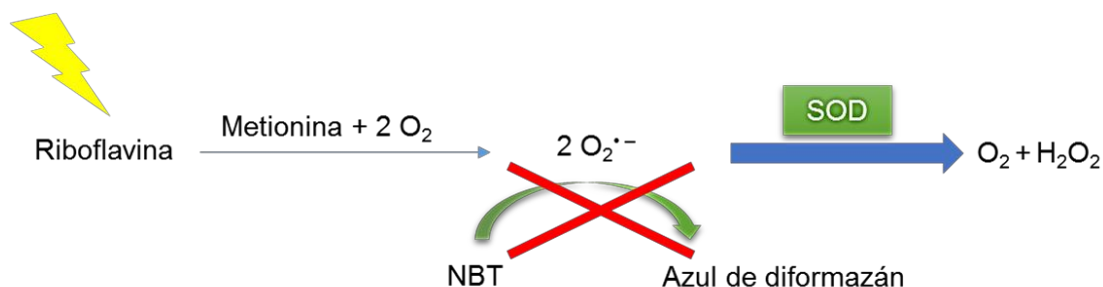
III.3.8- Estudio de la capacidad antioxidante del biofilm

El estudio de la capacidad de defensa antioxidante, se evaluó en irradiación y oscuridad. Para ello, se determinó la activación de la SOD, una de las principales enzimas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo; y la capacidad antioxidante total del biofilm mediante la técnica “Ferrous Reduction Antioxidant Potency” (FRAP).

A- Medición cuantitativa de la actividad de la enzima superóxido dismutasa

Se evaluó la capacidad de la enzima SOD para inhibir la reducción de NBT por acción del $\text{O}_2^{\cdot-}$ generado a través de la fotoexcitación de riboflavina en presencia de oxígeno y metionina como donador de electrones (Fig. 3.7). Se midió la DO del azul de diformazán a 595 nm (Beauchamp & Fridovich, 1971).

Figura 3.7 Reacción para evaluar la actividad de la enzima SOD.



A una alícuota del sobrenadante (50 μL) de cultivo se le adicionaron 30 μL de metionina (Sigma) 47,7 mM, 10 μL de NBT 0,825 mM, 30 μL de EDTA (Cicarelli, Argentina) 0,367 μM y 30 μL de riboflavina (Sigma) 7,33 μM , todos disueltos en PBS.

Luego, la microplaca se expuso bajo una lámpara fluorescente (20 W) durante 90 min para iniciar la fotoactivación de la riboflavina y así desencadenar la reacción. La lectura de la DO se realizó a 595 nm en el lector de microplacas. Los resultados se expresaron como el porcentaje de activación SOD respecto al control (100 %) en relación a las UBB (% activación SOD/UBB) (Arce Miranda *et al.*, 2011; Angel Villegas *et al.*, 2015; Peralta *et al.*, 2015, Marioni *et al.*, 2016a, Marioni *et al.*, 2016b).

B- Determinación de la capacidad antioxidante total del sistema:

FRAP

La capacidad antioxidante total del biofilms, incluido los factores enzimáticos y no enzimáticos, se evaluó por la técnica FRAP. Esta técnica mide el poder reductor del sistema biológico, ya que se basa en la reducción en medio ácido de un complejo de tripiridiltriazina férrica (Fe^{+3} -TPTZ) a la forma ferrosa (Fe^{+2} -TPTZ) por acción de todos los compuestos reductores presentes en el medio.

Debido al intenso color azul de la forma reducida (Fe^{+2} -TPTZ), esta reacción se puede monitorear por espectrofotometría a 593 nm. La producción de la forma ferrosa (aumento de la DO) está directamente relacionado al poder reductor combinado o total de los antioxidantes donantes de electrones presentes en la mezcla de reacción (Benzie & Strain, 1996; Baronetti *et al.*, 2011; Angel Villegas *et al.*, 2013)

A una alícuota (10 μL) del sobrenadante de cultivo se le agregaron 300 μL de la siguiente mezcla (10:1:1): (a) buffer acetato 300 mM de pH 3,6, (b) 2, 4, 6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM en HCl 40 mM y (c) solución de cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 20 mM. La DO se midió a 595 nm en el lector de microplacas después de 4 min de incubación a 37 °C. Los valores de FRAP se calcularon usando una curva de trabajo de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Los resultados se expresaron como una relación entre la concentración de Fe^{+2} generada por las UBB (FRAP/UBB) (Baronetti *et al.*, 2011; Angel Villegas *et al.*, 2013; Marioni *et al.*, 2016a, Marioni *et al.*, 2016b).

A partir de una solución madre de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (750 μM en H_2O) se realizó una curva de calibrado. Se prepararon 7 diluciones seriadas 1:2 por duplicado, las cuales fueron tratadas con la mezcla mencionada. Se graficó la DO del Fe^{+2} -TPTZ formado en función de la concentración de Fe^{+2} (Benzie & Strain, 1996). Se utilizaron curvas de calibrado cuya ecuación de la recta se correspondiera a un $R^2 \geq 0,99$.

III.3.9- Estudio de la estructura de biofilms: Microscopía Confocal de Exploración LÁSER

Los biofilms de *C. tropicalis* tratados con las concentraciones más activas de extractos o AQs se observaron por Microscopía Confocal de Exploración LÁSER (MCEL), con el fin de estudiar su estructura tridimensional.

A- Observación y cuantificación de biofilms

El biofilm se formó sobre discos de vidrio (12 mm de diámetro), ubicados en los pocillos de microplacas de 24 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania) y siguiendo el procedimiento ya descrito (punto III-3.2). Luego de la formación y del tratamiento antifúngico (con y sin fotoactivación) según el punto II-3.6, se descartaron los sobrenadantes y los discos se lavaron con PBS estéril (no autofluorescente). Posteriormente, el biofilm se tiñó con 30 μ L de Calcofluor-White (0,05 % v/v, Sigma-Aldrich, EEUU) durante 1 min a 25 °C. Este colorante fluorescente que se une a carbohidratos (celulosa y quitina), tiñendo la pared celular fúngica de azul cuando es excitado a 355 nm (Peralta *et al.*, 2015). Después de la tinción, los discos se removieron de los pocillos, se secaron a 25 °C y en oscuridad durante 15 min. Finalmente, se montaron en forma invertida sobre un portaobjeto con el agregado de aceite de inmersión para su observación.

Se utilizó un equipo Fluoview FV1000 Espectral Olympus CSLM (Olympus Latin America, EEUU), equipado con objetivo de inmersión UPlanSApo 100x/1.40 oil UIS2 Olympus para visualizar la estructura tridimensional del biofilm (Arce Miranda *et al.*, 2011; Marioni *et al.*, 2016a, Marioni *et al.*, 2016b). El estudio se llevó a cabo adquiriendo secciones ópticas a intervalos de 0,5 μ m en el espesor del biofilm, utilizando objetivos de inmersión de 6x y observando, al menos, 20 campos representativos por muestra.

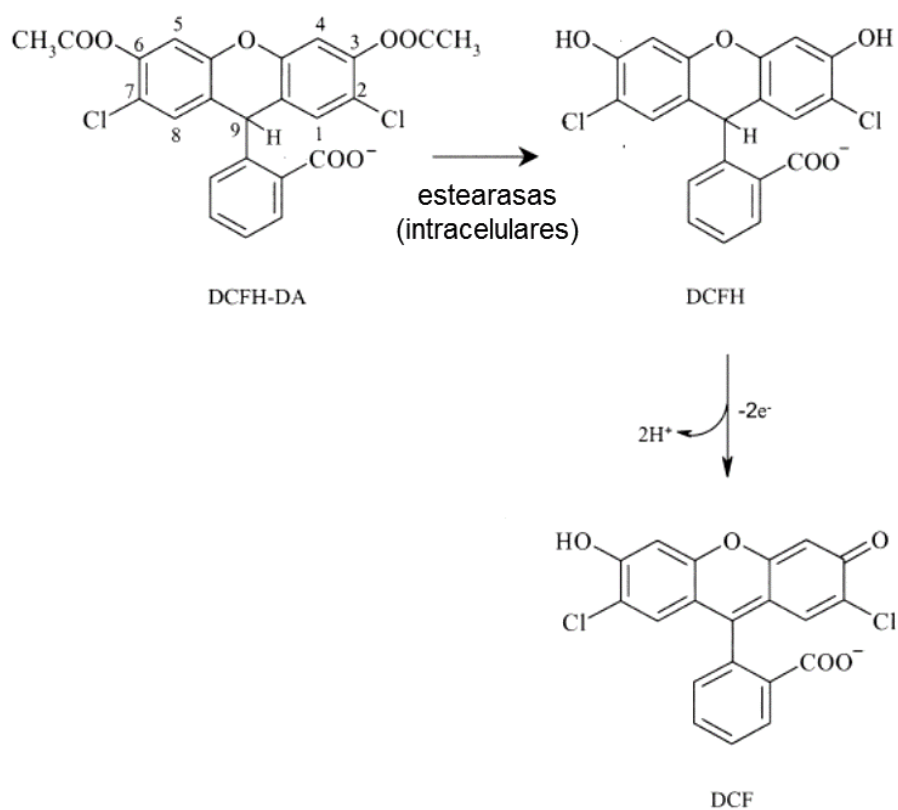
La cuantificación del grosor del biofilm, en las distintas condiciones experimentales, se realizó evaluando el eje XY (vista superior) y XZ (vista del perfil) con el software NIH-ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004) y COMSTAT (Technical University of Denmark, Kongens Lyngby, Dinamarca).

B- Observación y cuantificación de especies reactivas del oxígeno intracelular

Para determinar la generación de ERO intracelular, se utilizó una sonda del compuesto 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA, Molecular Probes, Inc., EEUU). El DCFH-DA es un compuesto no polar, no autofluorescente y capaz de

difundir a través de membranas. Una vez que ha ingresado a las células es hidrolizado por esterasas intracelulares a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH), un derivado polar incapaz de atravesar membranas celulares. DCFH rápidamente es oxidado por las ERO a un producto fluorescente: 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que se visualiza de color verde cuando se excita a 488 nm (Fig. 3.8) (Mattila *et al.*, 2015; Marioni *et al.*, 2016b; Peralta *et al.*, 2016).

Figura 3.8 Reacción de la sonda DCFH-DA (adaptada de Marchesi *et al.*, 1999).



Después de la tinción con Calcofluor-White, los discos se lavaron con PBS y se incubaron con 50 μ L de DCFH-DA 10 μ M, durante 15 min en oscuridad y a 25 $^{\circ}$ C. Luego, se procedió como ya se explicó, los discos se secaron y montaron en portaobjetos para su visualización. Se utilizó el mismo equipo descrito en el punto anterior realizando las mismas secciones ópticas que fueron visualizadas con el mismo aumento.

En el análisis cuantitativo, las intensidades relativas de fluorescencia de Calcofluor-White y DCF obtenidas por medio de NIH-ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004) permitieron determinar los niveles de ERO intracelulares en cada condición.

III.3.10- Efecto de secuestrantes/desactivantes de especies reactivas del oxígeno sobre la fotoinactivación de biofilms

Se estudió como secuestrantes/desactivantes (quenchers) de diferentes ERO pueden influir en la formación de biofilms de *C. tropicalis* cuando éstos fueron tratados con cada AQ bajo irradiación; esto a su vez, se comparó con la condición en oscuridad. Específicamente se evaluaron dos situaciones, en presencia de: **1)** sal disódica del ácido 4,5-dihidroxi-1,3-benzenodisulfónico mono hidrato (Tiron, Sigma) que es un secuestrante de $O_2^{\bullet-}$ (ERO generada por el mecanismo fotosensibilizante Tipo I); y **2)** azida sódica (NaN_3 , Sigma) que es un desactivante de 1O_2 ERO generada por el mecanismo fotosensibilizante Tipo II).

Las soluciones de secuestrante y desactivante se prepararon en agua destilada estéril y luego, se agregaron al medio de cultivo (CSG), de tal forma que la concentración final de los mismos fue 500 mM. Con esta concentración, se aseguró que estuvieran en exceso para así poder desactivar todo el $O_2^{\bullet-}$ y 1O_2 generado por las AQs (Paz-Cristóbal *et al.*, 2013; López- Chicón *et al.*, 2012).

A partir de biofilms maduros de *C. tropicalis* (48 h incubación), se retiraron los sobrenadantes de cultivo y cada pocillo se lavó 2 veces con 200 μ L de PBS estéril (pH = 7,2). Se agregó medio fresco que contenía las concentraciones correspondientes de secuestrante/quencher. Inmediatamente después, se adicionaron las concentraciones de cada AQ por triplicado. El ensayo se realizó en oscuridad e irradiación simultáneamente, exponiendo una de las microplacas al sistema de irradiación anteriormente mencionado durante 15 min. Una vez finalizada las 48 h de incubación a 37 °C, se cuantificó la formación de biofilms con CV. Antes de esta tinción, los sobrenadantes se utilizaron para analizar el desbalance redox; en especial producción de ERO y activación de SOD (puntos III-3.7-A y III-3.8-A, respectivamente).

III.3.11- Estudio de incorporación de antraquinonas en biofilms de *Candida* por HPLC-UV-Vis

La incorporación de AQs se estudió sobre un biofilm maduro de *C. tropicalis* NCPF 3111, formado en microplacas de 24 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania) como se describió previamente (punto III-3.2). Cada AQ se ensayó a una concentración en exceso para que el proceso de incorporación a la biomasa del biofilm no estuviera limitado por la falta de compuesto en el medio; y su vez, garantizar que la cantidad de cada AQ incorporada al biofilm pudiera ser detectada por el método de HPLC. **AQ1** se testeó a 10 μ g/mL (0,039 mM) y **AQ2** a 30 μ g/mL (0,112 mM). El

biofilm se expuso a estas concentraciones de AQ durante distintos tiempos de incubación: 0 - 0,5 - 1 - 3 y 6 h, cada tiempo por duplicado y a una temperatura de 37 °C. Controles de cada tiempo de incubación (biofilm no tratado, conteniendo sólo CSD con < 1 % DMSO) se procesaron por duplicado bajo las mismas condiciones experimentales.

Al finalizar cada tiempo de incubación, se descartó el sobrenadante de cultivo de cada pocillo (tratados y controles), y se agregó 0,5 mL de H₂O destilada (H₂O-D). Para desprender las células del biofilm, la placa se sometió a ultrasonido durante 1 min a 40 KHz, tres veces en intervalos de 1 min (Ultrasonic Cleaner, Testlab, Argentina). Luego de un “escrapeo”, la suspensión celular de cada pocillo se recogió por separado. Este procedimiento se repitió tres veces, y las alícuotas se juntaron para extraer el contenido intracelular (CIC) de AQ. La suspensión celular se centrifugó a 5000 rpm durante 25 min (Centrífuga EPF-12R, Presvac, Argentina). Cada pellet así obtenido se suspendió en CHCl₃ (1 mL), y se expuso alternadamente a frío y calor, utilizando aire líquido y un baño a 70 °C (Baño termostatzado MassonD, Vicking, Argentina). Se centrifugó nuevamente y el sobrenadante generado en este procedimiento se separó como CIC. Este proceso se repitió 3 veces con igual volumen de CHCl₃ para desestructurar la bicapa fosfolipídica de la membrana celular de las levaduras, y extraer la AQ del biofilm (disuelta en el CHCl₃). Por lo tanto, el pellet se descartó y los sobrenadantes de estas tres repeticiones se juntaron como CIC. Posteriormente las muestras de CIC se concentraron a sequedad en el evaporador rotatorio previamente usado. Finalmente, se retomaron con 1 mL de MeOH-HPLC para su posterior análisis (Comini *et al.*, 2011). Una vez finalizado el escrapeo, la microplaca se tiñó con CV para verificar que todo el biofilm se removió.

Para el análisis de la muestra por HPLC, se utilizó la metodología previamente descrita en el punto II-1.4.-a para la identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en extractos. Brevemente, la identificación de las AQs de cada fracción intracelular se hizo por comparación con los t_R de las AQs estándar. La cuantificación se realizó por el método de calibración externa (Núñez Montoya *et al.*, 2008). La concentración de cada AQ en la fracción intracelular se determinó usando la curva de calibración de cada AQ, construidas con 5 concentraciones diferentes: en el rango de 25 - 390 µM para **AQ1**, y 4,1 - 3731 µM para **AQ2**. Las ecuaciones de las curvas de calibración fueron $y = 59334 x + 71$ para **AQ1** y para **AQ2** $y = 42706 x + 92,79$, donde “y” es el área debajo de la curva y “x” la concentración en µM (n = 3, R² > 0,99).

III.3.12- Efecto de la variación en la frecuencia de irradiación sobre la actividad antibiofilm de antraquinonas: Tratamiento de irradiación

A partir del estudio de incorporación de AQs en biofilms de *Candida* por HPLC, se determinaron los tiempos de incubación en donde se logra la máxima acumulación de **AQ1** y **AQ2** en el biofilm. Este parámetro permitió plantear una nueva estrategia con el fin de mejorar el proceso de fotoinactivación del biofilm, la cual consistió en incrementar la frecuencia de irradiación del biofilm tratado con las AQs.

Para ello, se procedió de la misma forma que en el ensayo de determinación de la actividad antibiofilm *in vitro* de AQs (ver punto III-3.6-B), donde se utilizaron tres concentraciones: Sub-CIMf, CIMf y Supra-CIMf de cada AQ. AMB se usó como control positivo y los respectivos controles negativos fueron los mismos a los previamente usados (punto II-3.6).

Este ensayo se realizó en dos microplacas en simultáneo, una placa no se expuso a la luz y otra se irradió a diferentes períodos de incubación. Específicamente, se irradió durante 15 min inmediatamente después del agregado de las muestras ($t = 0$ h), y posteriormente a las 3, 6, 24, 27 y 30 h de este agregado, manteniendo el intervalo de irradiación. Entre cada período de irradiación las placas se incubaron en estufa a 37 °C, completando las 48 h de incubación. Luego, los sobrenadantes de ambas microplacas (irradiadas y en oscuridad) se separaron para los ensayos de estrés celular (punto III-3.7) y el estudio de la capacidad antioxidante del biofilm (punto III-3.8). Las microplacas se dejaron secar para determinar las UBB (ensayo puntos III-3.2 y III-3.6-B).

III.3.13- Ensayo de combinación con irradiación

Se testearon las combinaciones AQ-AMB y **AQ1-AQ2** mediante curvas de muerte. Para ello, se utilizaron las concentraciones previamente testeadas: Sub-CIMf, CIMf y Supra-CIMf. AMB fue añadida en una placa de 96 pocillos por columnas, mientras que las AQs fueron agregadas por filas sobre biofilms de 48 h de incubación (Dastgheyb *et al.*, 2013).

Las combinaciones también se desarrollaron simultáneamente en condiciones de oscuridad e irradiación durante 15 min con el sistema descrito anteriormente. A su vez, la irradiación se realizó de dos formas diferentes:

- a) irradiando sólo a $t = 0$ h (después del agregado de las combinaciones), seguido por una incubación de 48 h.

b) irradiando a distintos tiempos de incubación, $t = 0, 3, 6, 24, 27$ y 30 h, hasta completar las 48 h de incubación; lo cual implicó un incremento en la frecuencia de irradiación

Luego de la incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, los sobrenadantes se separaron para determinar los metabolitos del estrés y la activación del sistema antioxidante, siguiendo las técnicas descriptas previamente (punto III-3.7 y III-3.8, respectivamente). El efecto de las combinaciones se cuantificó mediante la tinción con CV, que se expresó como UBB (punto III-3.2 y III-3.6-b).

Los resultados se graficaron como curvas de dosis- respuesta (UBB en función de la concentración). Los resultados obtenidos en este ensayo se utilizaron para estimar el Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (FICI), el cual se define con la siguiente fórmula:

$$\text{FICI} = \frac{\text{CIMS-50 (AB)}}{\text{CIMS-50 (A)}} + \frac{\text{CIMS-50 (AB)}}{\text{CIMS-50 (B)}}$$

La CIMS-50 (AB) corresponde a la concentración de **AQ1** o **AQ2** combinada con AMB que redujo un 50% la formación del biofilms. La CIMS-50 (A) representa la concentración de **AQ1** o **AQ2** solo y la CIMS-50 (B) es la concentración de AMB, las cuales redujeron al 50% el biofilm. De acuerdo al valor de FICI obtenido, se puede interpretar de la siguiente manera (Tabla 3.2) (Dastgheyb *et al.*, 2013):

Tabla 3.2 Interpretación de valores de FICI

FICI	INTERACCIÓN
≤ 0.5	Sinergismo
$> 0,5$ a < 1	Sinergismo parcial
1	Adición
> 1 a < 4	Indiferencia
≥ 4	Antagonismo

III.4- METODOLOGÍAS USADAS EN EL ESTUDIO FOTOQUÍMICO Y FOTOFÍSICO

Estos ensayos se realizaron en el laboratorio del Prof. Dr. Santiago Nonell Marrugat, Instituto de Química Sarriá de la Universidad Ramon Llull, Barcelona, España.

III.4.1- Preparación de las muestras

Ambas AQs se utilizaron a la misma concentración (56 μ M), disueltas en distintos medios según el experimento a realizar. Se usaron los siguientes disolventes CHCl_3 , PBS, PBS deuterado (PBS-d) y CSG.

Para cada AQ se preparó una solución madre (1 mg/mL) en el solvente a utilizar. Y a partir de ésta, se realizaron las diluciones necesarias para obtener la concentración final (56 μ M). Cuando el disolvente fue PBS, PBS-d o CSG, en la solución madre se usó DMSO como co-solvente sin superar el 1 % (pH 6,5). Todas las soluciones se prepararon y manipularon bajo condiciones de oscuridad, siendo almacenadas a 4 °C.

La pureza de las AQs se determinó por HPLC, según la metodología descrita en los puntos III-1.4.

III.4.2- Preparación de células planctónicas y biofilms de *Candida*

Para realizar las mediciones espectroscópicas de las AQs en células planctónicas de *Candida*, se utilizaron suspensiones obtenidas del cultivo “overnight” de *C. tropicalis* NCPF 3111. Las levaduras se cultivaron a 37 °C en CSG hasta una DO de 0,6 (~10⁶ UFC/mL). Se retiró el medio de cultivo y las levaduras se lavaron con PBS estéril (pH = 7,4) tres veces, realizando centrifugado a 1398 g durante 5 min entre cada lavado. Seguidamente, las levaduras se suspendieron en PBS llevando a una DO de 0,3 (~10³ UFC/mL) (López Chicón *et al.*, 2012). A partir de la solución madre de cada AQ en PBS, se tomó una alícuota que se agregó a las suspensiones de células planctónicas para obtener la concentración final (56 μ M). Inmediatamente se trasvasó a la cuba de cuarzo (Hellmut, Alemania) antes de las mediciones espectroscópicas.

Para las mediciones sobre biofilms, los mismos se formaron siguiendo la metodología descrita en el punto III-3.9-A **observación y cuantificación de biofilms por MCEL**, modificando el soporte del biofilm, que en este caso fue un cuadrado de plástico (1 x 1 cm). Una vez obtenidos los biofilms maduros de la cepa de

C. tropicalis NCPF 3111 ($47,9 \pm 2,6$ UBB), el sobrenadante se descartó, los biofilms se lavaron con PBS y se agregó la solución de cada AQ en PBS. Después de 15 min, cada soporte se introdujo verticalmente dentro de la cubeta espectroscópica a 45° en con respecto a los haces de luz de excitación, y la cubeta se llenó cuidadosamente con el sobrenadante correspondiente. Las medidas se realizaron inmediatamente.

Para realizar las mediciones en PBS-d, los biofilms maduros se lavaron con PBS-d 2 veces (2 mL). Luego, se incubaron con un tercer volumen durante 2 h, antes de agregar las AQs (en PBS-d). Luego de 15 min, el soporte se colocó dentro de la cubeta con el sobrenadante para realizar la medición. Se realizaron controles conteniendo células sésiles de *C. tropicalis* NCPF 3111 en PBS-d.

En todos los casos, las mediadas espectroscópicas se llevaron a cabo sin agitación para prevenir la ruptura mecánica de los biofilms.

III.4.3- Espectros de absorción y de fluorescencia de las antraquinonas

Los espectros de absorción del estado fundamental de cada AQs en CHCl_3 , PBS y en presencia de células planctónicas y sésiles de *Candida* (disueltas en PBS), se registraron entre 300 a 800 nm, mediante un espectrofotómetro Varian Cary 6000i (Varian Inc., Palo Alto, CA).

Los espectros de emisión de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro Spex Fluoromax 4 (Horiba Jobin-Yvon, EEUU). Los decaimientos de fluorescencia en tiempo resuelto se midieron con un sistema de conteo de fotones únicos correlacionado con el tiempo (Fluotime 200, PicoQuant GmbH, Alemania), equipado con un fotomultiplicador sensible al rojo. La fluorescencia se obtuvo excitando las AQs a 375 nm en soluciones de CHCl_3 y PBS por medio de un láser de diodo pulsado, trabajando a una tasa de repetición de 10 MHz y observando la emisión a 420 nm (manteniendo la frecuencia de conteo por debajo del 1 %). Los decaimientos de fluorescencia se analizaron utilizando el software PicoQuant FluoFit 4.5 (PicoQuant, Alemania) (Jimenez-Banzo *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta la fluorescencia que presenta *Candida* spp. por sí misma (Graham, 1983), este parámetro no se midió para las AQs en presencia de células planctónicas y sésiles de *C. tropicalis*.

III.4.4- Absorción de los estados transitorios de las antraquinonas

El estudio de la absorción de las especies transitorias de las AQs: el estado triplete excitado ($^3\text{AQ}^*$) y el radical anión ($\text{AQ}^{\bullet-}$), se realizó en CHCl_3 , PBS y sobre levaduras planctónicas y biofilms de *C. tropicalis*, con un equipo de flash fotólisis

provisto de un láser de nanosegundos descrito en Schmidt *et al.*, 1994 y Martí *et al.*, 1996. La λ de excitación de las AQs fue 355 nm y la absorción de los transitorios se midió a las longitudes de onda apropiadas para detectar el $^3\text{AQ}^*$ (675 nm) y el $\text{AQ}^{\bullet-}$ (550 nm) de ambas AQs (Shida, 1988). Las soluciones de AQs en CHCl_3 y PBS se analizaron en un medio saturado con aire y con argón, ya que cuando el oxígeno se encuentra en el sistema las señales de los intermediarios desaparecen por completo porque son desactivados al reaccionar con el $^3\text{O}_2$. Para ello, las soluciones de AQs (en CHCl_3 o PBS) se desgasificaron mediante una corriente de argón, e inmediatamente se midieron para detectar los transitorios de las AQs (López Chicón *et al.*, 2012).

III.4.5- Determinación de oxígeno singlete

A- Medición con sonda fluorescente Singlet Oxygen Sensor Green

La instrucción sobre el uso de esta sonda se realizó en el laboratorio de la Prof. Dra. Adriana Casas, Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias, CONICET, Hospital Clínicas José de San Martín perteneciente a la Universidad de Buenos Aires.

Para determinar la generación de $^1\text{O}_2$ por los extractos obtenidos de partes aéreas de *H. pustulata* y de las AQs aisladas del extracto bioactivo, se utilizó la concentración que resultó más activa en el biofilm de *C. tropicalis*. Para ellos, se realizó una dilución en PBS a partir de una solución madre de cada uno de los extractos y AQs (1 mg/mL) en PBS con DMSO al 1 % como co-solvente. La sonda fluorescente Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) se preparó a una concentración de 0,5 mM en PBS, resguardándola de la luz.

Esta sonda reacciona en presencia de $^1\text{O}_2$ formando un producto fluorescente, el cual puede ser detectado a 525 nm (Mattila *et al.*, 2015). La fluorescencia se determinó utilizando un fluorómetro Perkin Elmer LS55 (Perkin, España).

El ensayo se realizó en dos placas de 24 pocillos en simultáneo, una con irradiación y otra en oscuridad. Cada extracto (500 μL) se añadió por duplicado e inmediatamente, se agregó 50 μL de la solución de SOSG (Mamone *et al.*, 2014). Para las AQs se utilizó 2 mL de la solución a testear por triplicado con el mismo volumen de sonda (50 μL).

Una de las placas se irradió durante 15 min, utilizando el sistema de irradiación descrito previamente (punto II-3.3), y ubicado 20 cm por arriba de las muestras. Los valores de fluorescencia se cuantificaron a λ_{em} 525 nm en una cuba de 500 μL . Además, se realizaron controles de SOSG en ausencia de extracto/AQ, de PBS y muestra sin sonda bajo irradiación y en oscuridad, cada uno por duplicado. Como

control positivo se utilizó una solución de perinaftenona (PN) 0,5 mM en PBS (1 % DMSO).

B- Cinética de fosforescencia de oxígeno singlete

La luminiscencia en el IR cercano del $^1\text{O}_2$ resuelta en el tiempo, se puede monitorizar mediante su fosforescencia a 1275 nm (López-Chicón *et al.*, 2012; Ragàs *et al.*, 2010). De esta manera, el $^1\text{O}_2$ formado por las AQs en presencia de biofilms de *C. tropicalis* puede ser detectado.

La fosforescencia de $^1\text{O}_2$ fue detectada mediante un sistema customizado, el Fluotime 200 (PicoQuant GmbH, Berlin, Alemania). Para la excitación de la muestra se utilizó un láser pulsado Nd: Yag de bombardeo de diodos (FTSS355-Q, Crystal Laser, Alemania), trabajando con una tasa de repeticiones de 10 kHz y a 355 nm (6 mW, 0.6 μJ por pulso). Se colocó un filtro de corte de 1064 nm y un filtro Schott KG5 (Edmund Optics, Reino Unido) en el puerto de salida del láser para eliminar cualquier componente residual de su emisión fundamental en la región del IR cercano. La luminiscencia emitida por la muestra se filtró mediante un espejo frío (IVC Melles Griot, EEUU) y un filtro de interferencia a 1273 ± 86 nm (Interferenzop-tik Elektronik GmbH, Alemania), y se focalizó en un tubo fotomultiplicador sensible al IR cercano (H9170-45, Hamamatsu Fotónica, Japón). El conteo de fotones se realizó con un multicanal NanoHarp Escalador 250 (PicoQuant, Alemania). Las señales de emisión resueltas en el tiempo fueron analizadas usando el programa de análisis de datos FluoFit 4.5 con la finalidad de extraer los valores de vida media de las especies. Los rendimientos cuánticos de producción de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ) se determinaron por comparación de las intensidades de las señales con un compuesto de referencia. Se utilizó perinaftenona la cual tiene $\Phi_\Delta = 0,95-1$ (Jimenez -Banzo *et al.*, 2008). Sólo en medios biológicos (en presencia de células planctónicas y sésiles), los Φ_Δ fueron aparentes.

La generación de $^1\text{O}_2$ de biofilms tratados con cada AQ (56 μM), se determinó agregando 2 mL de la solución de cada AQ (preparada como se indicó en el punto II-4.1) sobre un biofilm de *C. tropicalis* NCPF 3111, formado según lo indicado en el punto II-3.9-a. Luego, se irradió la muestra con un láser pulsado a 355 nm y se recogió la señal emitida de luminiscencia a 1275 nm, correspondiente al $^1\text{O}_2$.

Para asignar esta señal de forma inequívoca al $^1\text{O}_2$, se midió la fosforescencia de esta ERO en dos situaciones diferentes: (a) A una longitud de onda donde se conoce que el $^1\text{O}_2$ no emite fosforescencia, esto es a 1325 nm, (b) Sobre biofilms en PBS-d, ya que la vida media del $^1\text{O}_2$ aumenta en agua deuterada. En este caso, se

agregó la AQ en PBS-d y se midió la señal de $^1\text{O}_2$ a tiempo 0 h. (Orgilby & Foote, 1982).

III.5- METODO ESTADÍSTICO

Los ensayos se realizaron por triplicado y en tres ensayos independientes. Los resultados se expresaron como los promedios con sus desviaciones estándar. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo obtenido por la prueba de t - Student- Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en función de los objetivos específicos propuestos, incluyendo la discusión de los mismos.

En una primera instancia se establecieron las condiciones experimentales necesarias para dar respuesta a estos objetivos.

IV.1- SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES SOBRE BIOFILMS

IV.1.1- Clasificación de cepas de *Candida spp.* formadoras de biofilms

En la Tabla 4.1 se muestra la capacidad de formar biofilm de cepas de diferente origen de *Candida spp.* en CSG a pH 6,5, siguiendo la metodología detallada en la sección **III-3.2 Formación de biofilms** (Materiales y métodos). En base a estudios microbiológicos, se considera que una cepa es capaz de formar biofilm cuando su DO es mayor a la DO de los pocillos control (DOc) (Stepanovic *et al.*, 2007). En función del valor de DO obtenido, las cepas fueron clasificadas según la Tabla 4.1 de Materiales y métodos.

Tabla 4.1 Formación de biofilms de cepas de diferente origen de *Candida spp.*

Origen	Cepa	DO _{595nm}	Formación de biofilm
Clínico	<i>C. albicans</i> CRF1	0,7 ± 0,1	Fuerte
	<i>C. albicans</i> CRF2	0,110 ± 0,002	No productora
	<i>C. glabrata</i> CRF3	0,11 ± 0,01	No productora
	<i>C. glabrata</i> CRF4	0,21 ± 0,01	Leve
	<i>C. parapsilosis</i> CRF5	0,9 ± 0,2	Fuerte
	<i>C. tropicalis</i> CRF6	3,500 ± 0,001	Fuerte
	<i>C. tropicalis</i> CRF7	0,158 ± 0,001	Leve
	<i>C. tropicalis</i> CRF8	0,66 ± 0,05	Fuerte
Referencia	<i>C. albicans</i> NCPF 3153	1,40 ± 0,02	Fuerte
	<i>C. tropicalis</i> NCPF 3111	3,4 ± 0,1	Fuerte
	Control	0,16 ± 0,03	

Seis cepas de *Candida* resultaron fuertemente formadoras de biofilms: *C. albicans* CRF1, *C. parapsilosis* CRF5, *C. tropicalis* CRF6 y CRF8,

C. albicans NCPF 3153 y *C. tropicalis* NCPF 3111 independientemente de su origen (clínico o de referencia). Teniendo en cuenta que esta clasificación se basa en un intervalo de valores de DO respecto al control ($DO > 4 \times DO_c$), se observan diferencias en cuanto a la DO entre las mismas cepas clasificadas como “fuertes productoras”. *C. tropicalis* CRF6 se destacó, ya que presenta aproximadamente 22 veces más DO que el control.

En función de estos resultados, se seleccionaron dos cepas de *C. tropicalis* de distinto origen: una clínica (CRF6) y otra de referencia (NCPF 3111) para llevar a cabo el estudio de actividad antibiofilm. Esta especie de *C. no albicans* presenta particular interés de estudio dada su creciente importancia clínica en los últimos años como uno de los principales patógeno oportunista causante de IFI (Nucci *et al.*, 2010; Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012). En Argentina, se ha detectado un aumento en la incidencia de esta *C. no albicans* como responsable de IIH (Cornistein *et al.*, 2013; Falagas *et al.*, 2010; Luque *et al.*, 2009).

IV.1.2- Efecto de tiempo y distancia de irradiación sobre biofilms

Para estudiar la inactivación del biofilms de *C. tropicalis* por acción de la luz, fue necesario evaluar algunas variables que pueden afectar el crecimiento del biofilm durante la irradiación, tales como distancia de la lámpara a las muestras (20 y 40 cm) y tiempo de exposición (5, 10, 15 y 20 min). Además, se evaluó el efecto de DMSO al 1 % en CSG sobre biofilm, con el objetivo de determinar si podría ser utilizado como co-solvente de las muestras a analizar.

Cuando la lámpara se ubicó a 20 cm por encima de la microplaca (Fig. 4.1 A), se observó que a los diferentes tiempos de exposición a la irradiación, excepto para 20 min, la biomasa del biofilm fue constante (aproximadamente 20 UBB) y similar al biofilm control (sin irradiación, $t = 0$, $p > 0,05$). Mientras que ubicada a 40 cm (Fig. 4.1 B), la biomasa del biofilm no fue constante. Es probable que esta variación esté relacionada a algún factor experimental que no fue controlado; por lo cual para no incurrir nuevamente en este error se decidió trabajar a 20 cm.

Además, se observó que el DMSO a la concentración ensayada no tuvo efecto sobre el biofilm ($p > 0,05$).

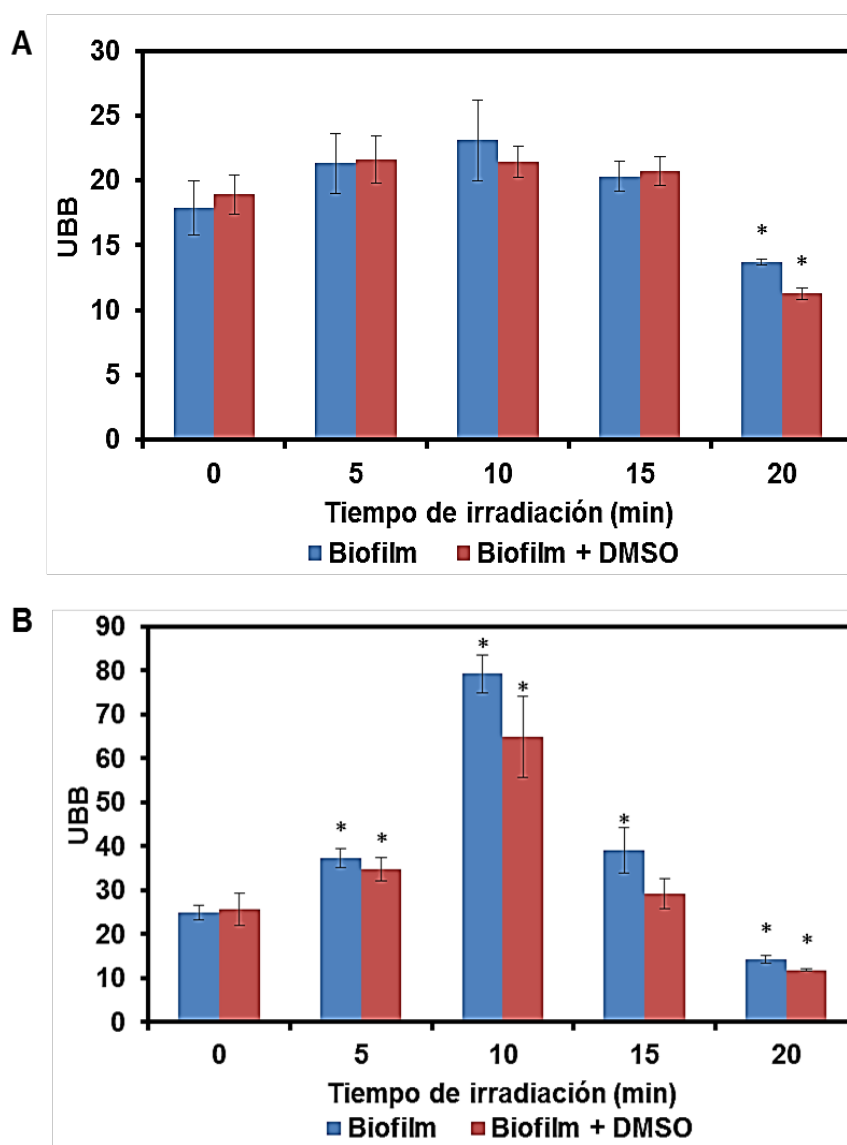
Si bien se ha demostrado que la luz azul (410 nm) es capaz de inactivar células plantónicas de *C. albicans*. (Zhang *et al.*, 2016), la Fig. 4.1 muestra que la biomasa del biofilm expuesta a la luz y sin FS no fue diferente del biofilm que no fue expuesto a la luz y se mantiene constante hasta los 15 min cuando la lámpara se ubicó a 20 cm por encima de la microplaca.

Resultados y Discusión

Un requisito fundamental en TFDa es que la fuente de luz debe dispensar la energía necesaria en el menor tiempo posible manteniendo la selectividad por el FS, dada por su espectro de absorción, y generando un daño nulo o mínimo en el tejido sano.

Por lo tanto, estas fueron las condiciones óptimas de irradiación que no afectan el crecimiento del biofilm: una lámpara actínica, habitualmente utilizada en terapéutica para tratar la hiperbilirrubinemia, con una potencia de $0,6 \text{ J/cm}^2$, ubicada a 20 cm por encima de la microplaca y con un período de irradiación de 15 min como máximo.

Figura 4.1 Efecto de la irradiación con lámpara actínica ubicada a 20 cm (A) y 40 cm (B) por encima de la microplaca con biofilms maduros de *Candida* durante diferentes períodos de tiempo.



* $p < 0,05$ cuando se comparó cada tiempo de irradiación respecto a oscuridad (0 min).

IV.2- FOTOINACTIVACIÓN DE BIOFILMS DE *C. tropicalis* POR EXTRACTOS DE *H. pustulata* Y ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO

Se ensayaron los extractos obtenidos a partir de partes aéreas de *H. pustulata* con los siguientes rendimientos en estado desecado: Hex $1,2976 \pm 0,0002$ g, Ben $0,7907 \pm 0,0002$ g, AcOEt $1,0051 \pm 0,0002$ g y EtOH, $8,0638 \pm 0,0002$ g. Como el propósito fue identificar el extracto con mayor fotoactividad se evaluó el efecto sobre una sola cepa, eligiéndose la cepa clínica clasificada como fuerte productora de biofilm (*C. tropicalis* CRF6). Posteriormente en función de la composición química de los extractos determinada por HPLC, se propuso aislar y purificar los metabolitos secundarios predominantes para su posterior evaluación como fotosensibilizadores con efecto antibiofilm *in vitro*.

Asimismo, se evaluó el estrés oxidativo y nitrosativo que se podría generar cuando el biofilm es tratado con estos extractos, como consecuencia de un desbalance entre las ERO y ERN producidas, la activación de la enzima SOD y la capacidad antioxidante total del biofilm (enzimático y no enzimático).

IV.2.1- Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *H. pustulata* sobre biofilms de una cepa clínica de *C. tropicalis*

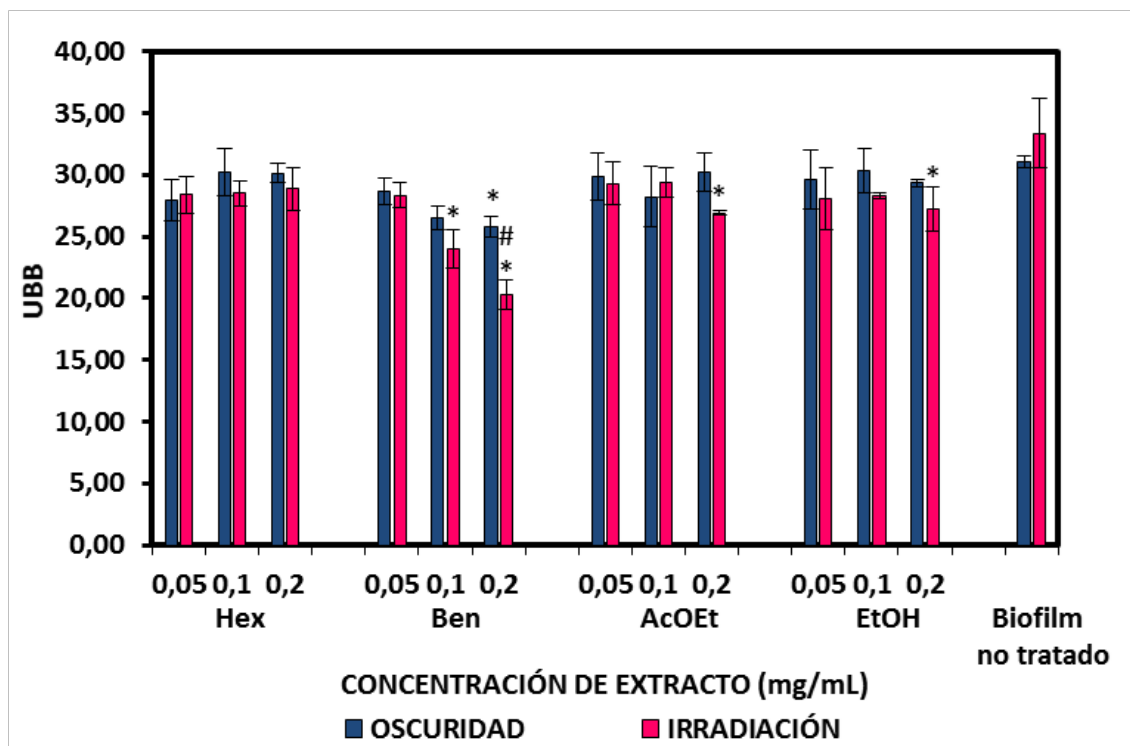
La actividad antibiofilm *in vitro* de los extractos fue evaluada mediante dos técnicas. Una técnica espectrofotométrica que utiliza CV como marcador de la reducción de la biomasa del biofilm y la técnica de MCEL que permite estudiar la estructura tridimensional del biofilm.

A- Cuantificación espectrofotométrica del biofilm con Cristal Violeta

El extracto Ben fue el único bioactivo bajo las dos condiciones experimentales (oscuridad e irradiación), exhibiendo un mayor efecto reductor sobre el crecimiento del biofilm bajo la acción de la luz (Fig. 4.2).

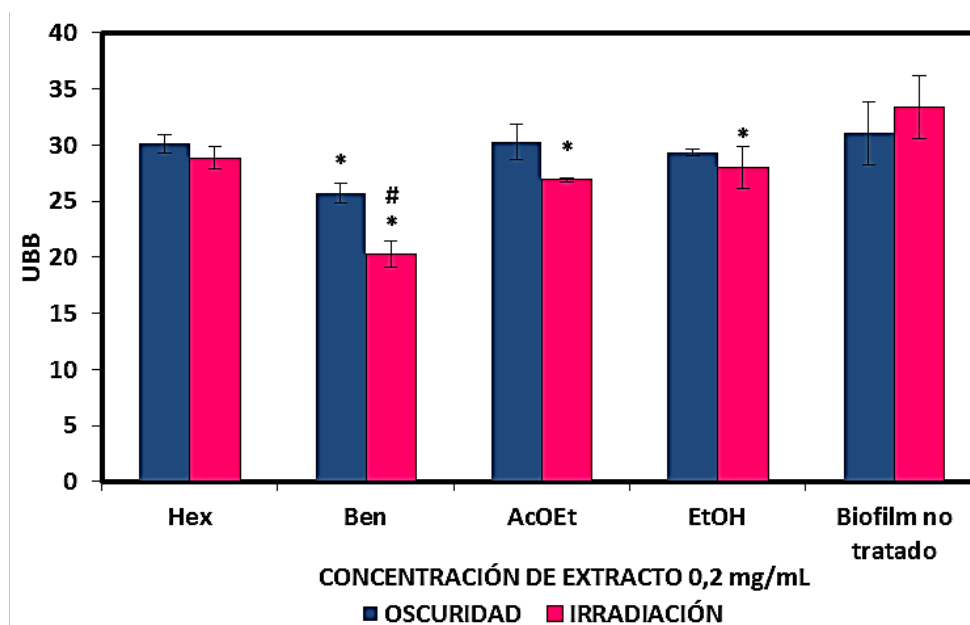
En oscuridad, el extracto Ben redujo levemente el biofilm (Fig. 4.3) a la mayor concentración probada (0,2 mg/mL). Bajo irradiación, la disminución en las UBB ($20,26 \pm 1,18$) fue 1,65 veces respecto al biofilm no tratado ($33,4 \pm 2,8$) (* $p < 0,05$), alcanzando un porcentaje de reducción (%R) de $39,3 \pm 3,5$ con luz comparado con el $17,1 \pm 2,8$ %R en oscuridad (# $p < 0,05$).

Figura 4.2 Actividad antifúngica *in vitro* de los extractos de *H. pustulata* sobre biofilms de una cepa clínica de *C. tropicalis* CRF6 (expresada en UBB), bajo condiciones de oscuridad e irradiación a las 3 concentraciones ensayadas (0,05, 0,1; 0,2 mg/mL).



Bajo irradiación, los extractos AcOEt y EtOH a 0,2 mg/mL redujeron las UBB pero este efecto no fue significativo respecto a la misma condición en oscuridad ($p > 0,05$). Por lo tanto, sólo el extracto Ben fue capaz de disminuir el biofilm de *C. tropicalis* mediante un efecto de fotoestimulación, determinando que la concentración más activa para reducir el biofilm fue 0,2 mg/mL, tanto bajo la acción de la luz como en oscuridad (Marioni *et al.*, 2016a). Esto significa que estarían involucrados varios factores en el efecto antibiofilm, unos que se activarían con luz y otros que serían independientes de esta (ver más adelante).

Figura 4.3 Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *H. pustulata* (0,2 mg/mL) sobre biofilms de la cepa clínica de *C. tropicalis* CRF6 (expresada en UBB), bajo condiciones de oscuridad e irradiación.



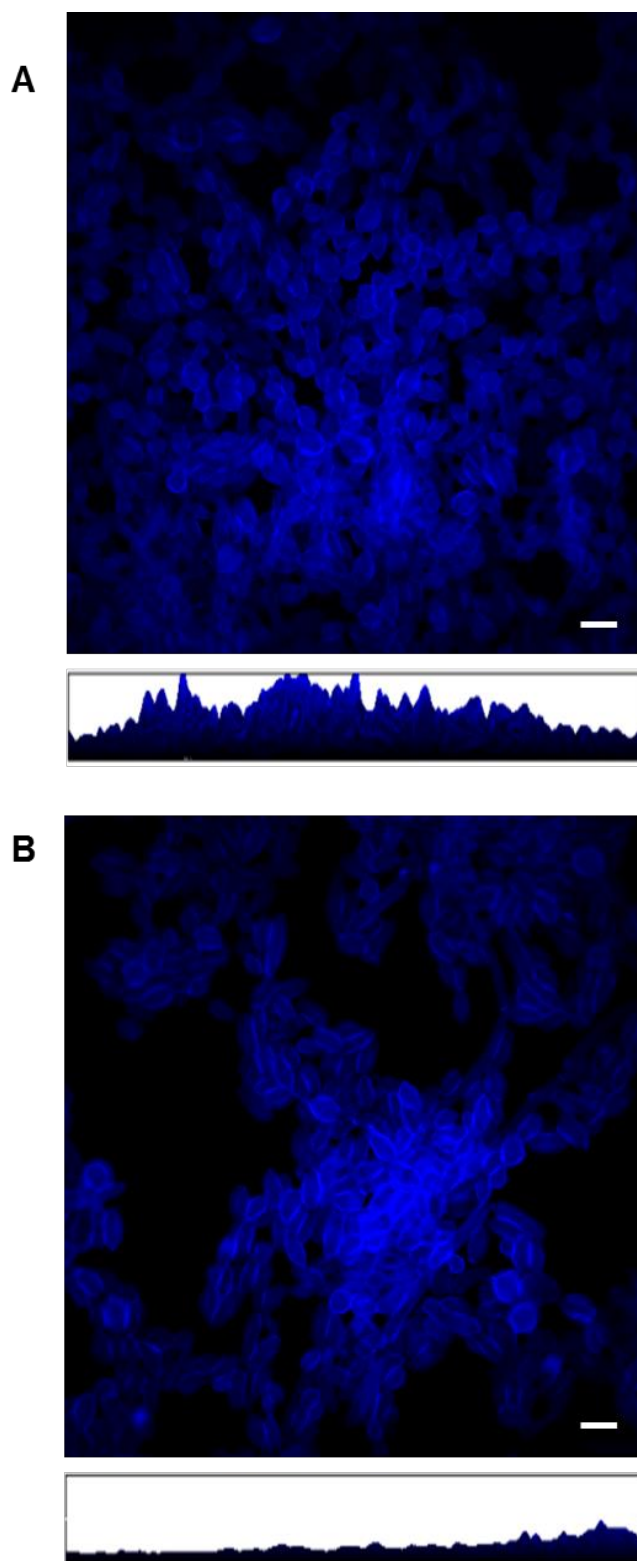
Extractos: Hex: hexánico, Ben: bencénico, AcOEt: acetato de etilo, EtOH: etanólico. La barra de error representa la desviación estándar obtenida de tres experimentos independientes con n=3 cada uno. * $p < 0.05$ respecto al biofilm no tratado; # $p < 0.05$ cuando se compararon oscuridad e irradiación.

B- Cuantificación del biofilms por Microscopia confocal de exploración LÁSER

La actividad antibiofilm del extracto Ben fue confirmada por MCEL. En la Fig. 4.4 se muestran las imágenes del eje XY (vista superior) y XZ (vista del perfil) de las células sésiles del biofilm de *C. tropicalis* CRF6 teñidas con Calcofluor-White (azul).

Se pudo observar la reducción del espesor del biofilm tratado con el extracto Ben a la concentración más activa (0,2 mg/mL) en condiciones de irradiación (Fig. 4.4.B) comparado con el control (Fig. 4.4.A). El análisis por COMSTAT demostró que la biomasa del biofilm y el grosor se redujeron luego del tratamiento con el extracto Ben cuando se compararon con el control. El grosor del biofilm tratado fue $12,96 \pm 0,05 \mu\text{m}$, con una reducción de la biomasa del $37,87 \pm 1,08 \%$ en comparación al biofilm no tratado (100 % de biomasa) que presentó un espesor de $20,86 \pm 0,05 \mu\text{m}$. Esta reducción de la biomasa coincidió con el %R obtenido por CV ($39,3 \pm 3,5 \%$ R).

Figura 4.4 Imágenes de MCEL de la actividad antifúngica del extracto Benceno sobre el biofilm de *C. tropicalis* CRF6 bajo la acción de la luz. **(A)** Biofilm no tratado, **(B)** Biofilm tratado con extracto bencénico (0,2 mg/mL).



El azul muestra la pared de las células sésiles teñidas con Calcofluor-White. El panel superior muestra la vista del eje XY y el panel inferior, la vista ortogonal del perfil XZ. Magnificación 60x, escala de la barra 5 µm. Foto representativa de 20 campos.

IV.2.2- Producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno

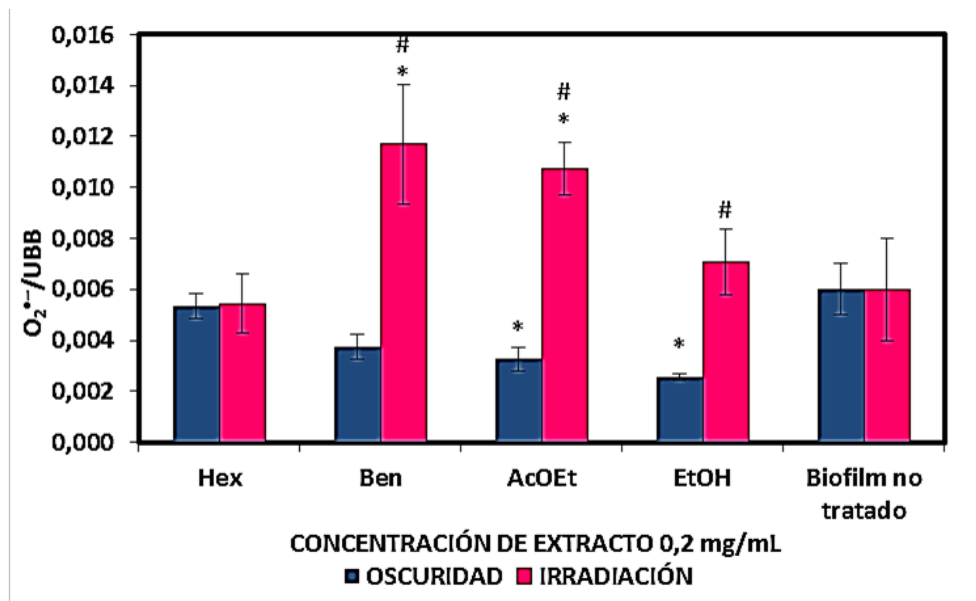
A- Generación de radical anión superóxido

Se analizó la producción del $O_2^{\bullet-}$ como principal ERO, ya que se forma en primer lugar y es promotora de las demás especies.

Ningún extracto ensayado incrementó la producción de $O_2^{\bullet-}$ en oscuridad (Fig. 4.5). Por lo tanto, otro mecanismo de acción estaría involucrado en el efecto inhibitorio del extracto Ben sobre el biofilm, bajo esta condición experimental (Fig. 4.3).

Sin embargo, cuando el sistema biológico fue irradiado, se observó que tanto el extracto Ben como AcOEt fueron los responsables del mayor incremento esta ERO. En el caso del extracto Ben este aumento fue casi el doble respecto al basal ($0,0117 \pm 0,0023$ vs. $0,0060 \pm 0,0020$) y más del triple respecto a su producción en oscuridad ($0,0037 \pm 0,0005$). Similares resultados se observaron para el extracto AcOEt.

Figura 4.5 Generación de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) extracelular por acción de los extractos de *H. pustulata* sobre biofilms de *C. tropicalis* CRF6, bajo condiciones de oscuridad e irradiación.



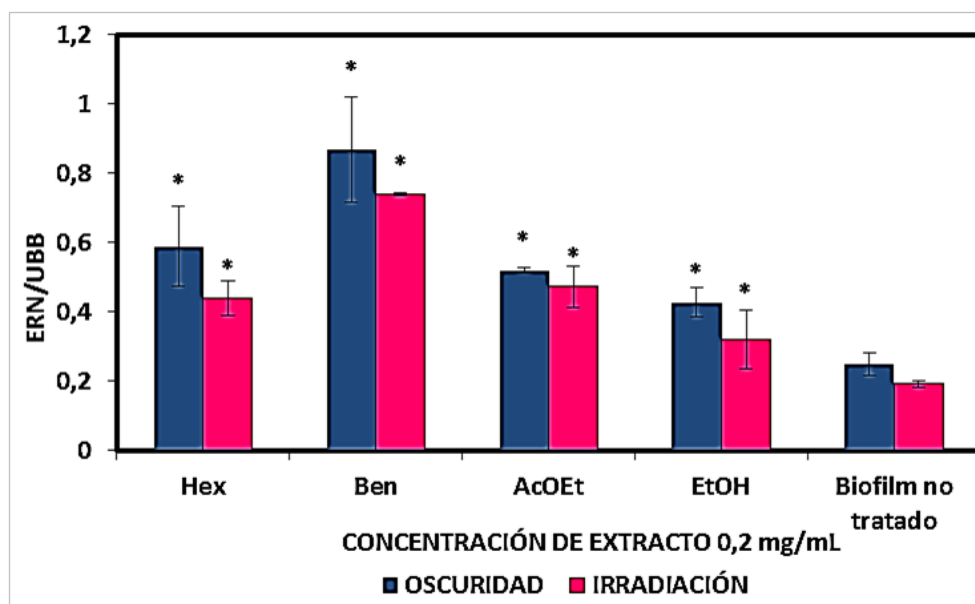
Extractos a 0,2 mg/mL. Hex: hexánico, Ben: bencénico, AcOEt: acetato de etilo, EtOH: etanólico. La barra de error representa la desviación estándar obtenida de tres experimentos independientes con $n=3$ cada uno. * $p < 0,05$ respecto al biofilm no tratado; # $p < 0,05$ cuando se compararon oscuridad e irradiación.

B- Producción de óxido nítrico

Se estudió la generación de NO^{\bullet} en forma indirecta con el reactivo de Griess, ya que esta especie es la precursora de las demás ERN (Cuéllar-Cruz *et al.*, 2014).

Todos los extractos generaron un aumento del NO• en distintas proporciones respecto al biofilm no tratado, siendo esta producción similar bajo ambas condiciones experimentales (luz y oscuridad) (Fig. 4.6).

Figura 4.6 Producción de especies reactivas del nitrógeno (ERN) por acción de los extractos de *H. pustulata* sobre biofilms de *C. tropicalis* CRF6, bajo condiciones de oscuridad e irradiación.



Extractos a 0,2 mg/mL: Hex: hexánico, Ben: bencénico, AcOEt: acetato de etilo, EtOH: etanólico. La barra de error representa la desviación estándar obtenida de tres experimentos independientes con $n=3$ cada uno. * $p < 0.05$ respecto al biofilm; # $p < 0.05$ cuando se compararon oscuridad e irradiación.

Se destacó el extracto Ben por incrementar en mayor medida la generación de las ERN. En oscuridad, el extracto Ben produjo un incremento de 3,5 veces ERN/UBB respecto al biofilm sin tratar; el cual podría ser responsable del escaso efecto inhibitorio observado sobre el biofilm ($17,1 \pm 2,8 \%R$) (Fig. 4.3), ya que no se detectó producción de $O_2^{\bullet-}$ (Fig. 4.5). En este contexto, se puede destacar que ya se ha descrito que incluso bajos niveles de NO• inducen dispersión del biofilm con la consecuente reducción del mismo (Barraud *et al.*, 2009; Angel Villegas *et al.*, 2015). Por otro lado, el incremento de NO• producido por los demás extractos, no sería suficiente para reducir la biomasa del biofilm en oscuridad. Seguramente, estarían actuando sistemas de defensa del biofilm que desactivan las ERN generadas. En el caso del extracto Ben, estas defensas no lograrían contrarrestar el estrés nitrosativo generado y consecuentemente, se observó una baja reducción del biofilm.

Dado que el incremento de NO• en oscuridad no tuvo efecto sobre el biofilm, excepto para el extracto Ben (Fig. 4.3), se infiere que la generación de NO• bajo

irradiación no sería la principal especie involucrada en la reducción del biofilm, debido a que los niveles de $\text{NO}\bullet$ observados en irradiación y oscuridad son similares (Fig. 4.6).

Por lo tanto, en presencia de irradiación, la disminución en la biomasa estaría mediada principalmente por un aumento en la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Fig. 4.3 y 4.5). Sin embargo, se estima que el $\text{NO}\bullet$ generado podría contribuir junto con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ al efecto reductor observado, especialmente para el extracto Ben. Está descrito en bibliografía que una sobreproducción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ favorece la reacción de este radical con el $\text{NO}\bullet$, para generar $\text{ONOO}\bullet$, una especie altamente reactiva, capaz de oxidar y nitrar proteínas y lípidos de membranas externas e intracelulares (Misall *et al.*, 2004; Tillmann *et al.*, 2011). En esta condición, el $\text{NO}\bullet$ se desempeña como un secuestrante que es directamente dependiente de la concentración de $\text{O}_2^{\bullet-}$, a través de una reacción rápida no enzimática que produce $\text{ONOO}\bullet$ (reacción radical-radical), aumentando las reacciones oxidativas y nitrosativas que favorecen y generan procesos de daño celular. Por lo tanto, existe una competencia entre el $\text{NO}\bullet$ y la enzima SOD por el $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Hurtado Bredda *et al.*, 2005; Powers *et al.*, 2011). En base a estos antecedentes, a continuación se evaluó la actividad de la SOD bajo las dos condiciones experimentales.

IV.2.3- Determinación de la activación de la enzima superóxido dismutasa y de la capacidad antioxidante total

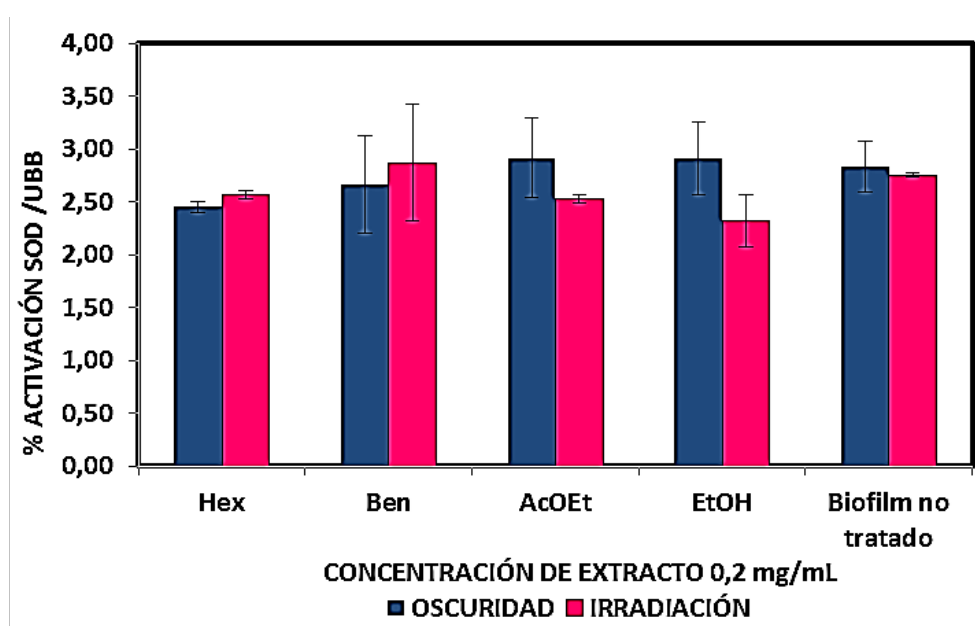
A- Activación de la enzima superóxido dismutasa

Tanto en oscuridad como bajo irradiación, no se observó activación de la SOD del biofilm tratado con los extractos (Fig. 4.7). Dado que los valores de SOD en los biofilms tratados con extractos fueron similares al biofilm no tratado, se podría decir que todo el $\text{O}_2^{\bullet-}$ que reacciona con la enzima es generado por la riboflavina agregada en este ensayo, y que no hay otra fuente productora de esta ERO. Esto puede observarse para la condición oscuridad (Fig. 4.5). Sin embargo, dado que en presencia de luz se observa incremento en la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Fig. 4.5), se puede estimar que otra vía de desactivación de esta ERO estaría actuando. En este caso sería la reacción con el $\text{NO}\bullet$ para generar $\text{ONOO}\bullet$, si consideramos que la reacción radical-radical ($\text{O}_2^{\bullet-}$ y $\text{NO}\bullet$) es más rápida que la reacción enzimática entre $\text{O}_2^{\bullet-}$ y SOD (Astuti *et al.*, 2016; Powers *et al.*, 2011).

De esta forma, se demostró que cuando el biofilm fue irradiado en presencia del extracto Ben, se produjo un incremento significativo de $\text{O}_2^{\bullet-}$ que fue acompañado

por un aumento de ERN. Esto sería debido a que el NO^\bullet , en presencia de una sobreproducción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ tiende a reaccionar rápidamente con éste en su rol de secuestrante de ERO, generando ONOO^\bullet . Dado que no hubo un aumento en la actividad de la SOD en esta condición experimental, se podría inferir que la desactivación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ fue mediada principalmente por la reacción radical-radical y fue predominante sobre la reacción enzimática (Astuti *et al.*, 2016; Powers *et al.*, 2011).

Figura 4.7 Activación de la enzima superóxido dismutasa (SOD) por acción de los extractos de *H. pustulata* sobre biofilms de *C. tropicalis* CRF6, bajo condiciones de oscuridad e irradiación.



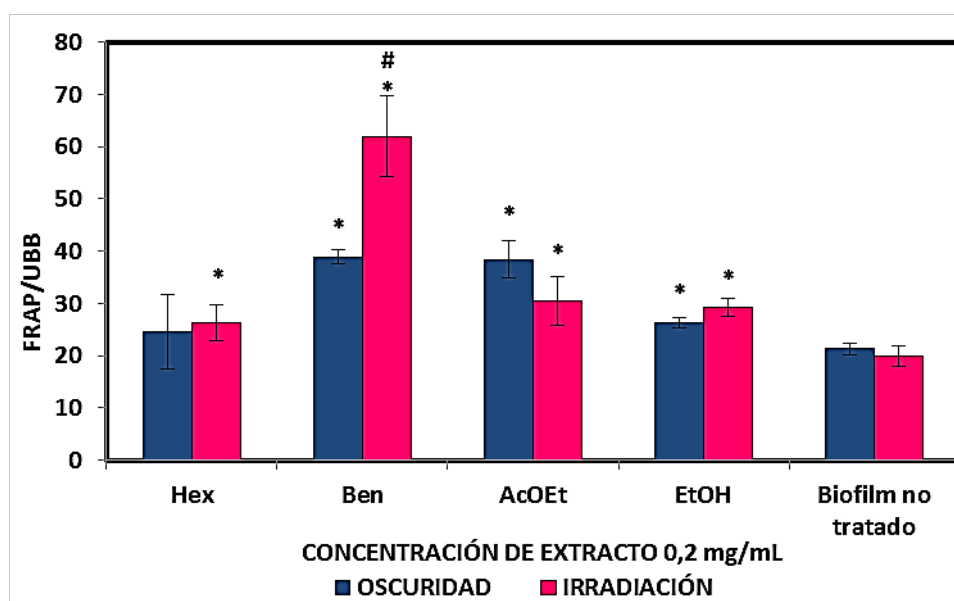
Extractos a 0,2 mg/mL. Hex: hexánico, Ben: bencénico, AcOEt: acetato de etilo, EtOH: etanólico. La barra de error representa la desviación estándar obtenida de tres experimentos independientes con $n=3$ cada uno. * $p < 0.05$ respecto al biofilm no tratado; # $p < 0.05$ cuando se compararon oscuridad e irradiación.

B- Activación de la capacidad antioxidante total: Ensayo FRAP

Frente a una sobreproducción de especies reactivas, se estudió la respuesta antioxidante total del biofilm (enzimático y no enzimático) que tiene como función contrarrestar la generación de ERO y ERN (Missall *et al.*, 2004). En la Fig. 4.8 se muestra la activación del sistema antioxidante total como respuesta a la acción de los extractos en ambas condiciones experimentales (oscuridad e irradiación). El extracto Ben provocó una gran estimulación del sistema antioxidante total en oscuridad e irradiación, respecto de los demás extractos. La activación producida por el extracto Ben fue 1,8 veces en oscuridad ($38,9 \pm 1,3$ vs. $21,3 \pm 1,2$) y 3,1 veces en luz ($61,9 \pm 7,7$ vs. $19,9 \pm 1,9$) respecto al biofilm no tratado.

En función de los resultados obtenidos, se podría estimar que en oscuridad este incremento es suficiente para contrarrestar las ERN generadas por los extractos Hex, AcOEt y EtOH (Fig. 4.6). Por lo tanto, no se observó un efecto reductor sobre el biofilm (Fig. 4.3). Por otra parte, esta activación de la capacidad antioxidante no fue suficiente para compensar la acción del extracto Ben, que provocó una disminución del biofilm mediada por las ERN (Peralta *et al.*, 2015).

Figura 4.8 Efecto de los extractos de *H. pustulata* sobre la capacidad antioxidante total del biofilm de *C. tropicalis* CRF6, bajo condiciones de oscuridad e irradiación.



Extractos a 0,2 mg/mL. Hex: hexánico, Ben: bencénico, AcOEt: acetato de etilo, EtOH: etanólico. La barra de error representa la desviación estándar obtenida de tres experimentos independientes con n=3 cada uno. * $p < 0.05$ respecto al biofilm no tratado; # $p < 0.05$ cuando se compararon oscuridad e irradiación.

Bajo irradiación, los extractos Hex, AcOEt y EtOH generaron una estimulación del sistema antioxidante total que parecería anular completamente el efecto de las ERO y ERN producidas por el extracto Hex que resultó inactivo, o contrarrestarlo parcialmente en el caso de los extractos AcOEt y EtOH que redujeron levemente el biofilm, pero no lo suficiente para observar una fotoactivación de los mismos. Si bien, en presencia del extracto Ben y luz, la activación del sistema antioxidante total fue mayor que para los demás extractos, no fue capaz de contrarrestar las especies reactivas generadas (las cuales alcanzaron niveles más altos respecto a los otros extractos), provocando una reducción significativa del biofilm mediante una fotoestimulación.

Si bien la principal enzima detoxificante de $O_2^{\cdot-}$ (SOD) no se activó, la capacidad antioxidante total del biofilm en particular los componentes no enzimáticos

estarían actuando como una defensa al estrés oxidativo y nitrosativo generado; y por lo tanto no fue posible alcanzar la erradicación del biofilm.

IV.2.4- Generación de oxígeno singlete por los extractos de *H. pustulata*

En base a los resultados anteriores, que demuestran una fotoestimulación del efecto antibiofilm del extracto Ben, se evaluó la producción de $^1\text{O}_2$. Esta ERO sólo se genera bajo irradiación, ya que necesita una transferencia de energía desde el FS* al $^3\text{O}_2$, en un proceso conocido como fotosensibilizante Tipo II. Por tal motivo, se evaluó si los extractos en solución tenían capacidad de incrementar la generación $^1\text{O}_2$ bajo acción de la luz. Para ello, se usó la sonda SOSG que mide la fluorescencia del producto de reacción con $^1\text{O}_2$ cuando el FS está en solución.

En la Tabla 4.2 se observa el aumento en la producción de $^1\text{O}_2$ generado por los extractos en soluciones de PBS y en presencia de SOSG. Bajo irradiación, se observó un incremento de $4,6 \pm 1,2$ y $2,55 \pm 0,04$ veces de esta ERO para los extracto Hex y Ben, respectivamente, en comparación a SOSG.

Tabla 4.2 Incremento en la generación de $^1\text{O}_2$ por los extractos de *H. pustulata*, en condiciones de oscuridad e irradiación respecto de la sonda SOSG.

EXTRACTO	INCREMENTO EN LA PRODUCCIÓN DE $^1\text{O}_2$	
	OSCURIDAD	LUZ
Hex	nd *	$4,6 \pm 1,2$
Ben	nd	$2,55 \pm 0,04$
AcOEt	nd	nd
EtOH	nd	nd

*no detectado

Se evidenció que los extractos no polares (Hex y Ben) tendrían capacidad para actuar por el mecanismo fotosensibilizante Tipo II. Este resultado indicaría que los metabolitos secundarios presentes en estos extractos podrían actuar como potenciales FS Tipo II.

El estudio de la actividad antifúngica de los extractos obtenidos de *H. pustulata* sobre biofilms de *C. tropicalis* CRF6, mostró que el extracto Ben fue el único bioactivo bajo las dos condiciones experimentales, exhibiendo un importante efecto reductor sobre el crecimiento del biofilm bajo la acción de la luz. Así, se estableció que el leve

efecto reductor de este extracto en oscuridad fue mediado solamente por un estrés nitrosativo (incremento en la generación de ERN); mientras que bajo irradiación, el estrés oxidativo fue el proceso predominante (aumento en la generación de ERO). De esta forma, se evidenció una inactivación fotodinámica del biofilm por acción del extracto Ben, ya que se ha demostrado que las sustancias fotosensibilizantes incrementan los niveles de ERO en presencia de luz, lo cual resulta finalmente en un estrés oxidativo sobre el microorganismo (Dai *et al.*, 2012; Hamblin, 2016). Se entiende como estrés a una sobreproducción de especies reactivas, como consecuencia de una estimulación en la producción de las especies o una reducción en el sistema de defensa antioxidante (Powers *et al.*, 2011). Por tal motivo, la producción de $O_2^{\bullet-}$ (asociada al mecanismo fotosensibilizante Tipo I) y de NO^{\bullet} (secuestrante de $O_2^{\bullet-}$) se evaluó, como los principales precursores de las ERO y de las ERN, respectivamente. En consecuencia, se estudió en forma simultánea la capacidad antioxidante total del sistema (enzimático y no-enzimático), como una respuesta a ambos tipos de estrés por medio del ensayo FRAP. Además, la activación de la enzima SOD se estudió por su acción específica sobre el $O_2^{\bullet-}$ (dismutación de esta ROS en H_2O_2). Los resultados obtenidos, permitieron concluir que frente a una sobreproducción de ERO y de ERN (en menor medida) por parte del extracto Ben bajo irradiación, se activa la SOD y el sistema antioxidante total del biofilm. Esto se traduce en una reducción de la biomasa del biofilm, desencadenada por la acción de la luz, pero que no logra la erradicación completa de éste.

En conclusión, se observó una significativa acción antibiofilm del extracto Ben, mediada por un efecto fotodinámico, en donde predominaría la estimulación de la producción de $O_2^{\bullet-}$ (mecanismo fotosensibilizante Tipo I).

A pesar que no se pudo demostrar que el mecanismo fotosensibilizante Tipo II (generación de 1O_2) estaría actuando sobre el biofilm, se evidenció que el extracto Ben y por lo tanto, sus constituyentes químicos, incrementan esta ERO en solución de PBS bajo irradiación. Por lo cual, los metabolitos secundarios presentes en este extracto cobran especial interés como potenciales FS.

Con el fin de establecer los metabolitos secundarios responsables del efecto observado por los extractos ensayados, a continuación se procedió a realizar el análisis químico de los mismos.

IV.3- ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS EXTRACTOS DE *H. pustulata* ENSAYADOS SOBRE BIOFILMS

Estudios químicos previos demostraron que derivados antraquinónicos y flavonoideos caracterizan esta especie vegetal, siendo las AQs aglicones los metabolitos secundarios mayoritarios (Fig. 1.6 de Introducción) (Núñez Montoya *et al.*, 2003; 2006). En consecuencia, para determinar la composición química de los extractos, se desarrolló una metodología mediante HPLC-UV-Vis y una metodología HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF.

IV.3.1 – Análisis químico mediante HPLC-UV-Vis

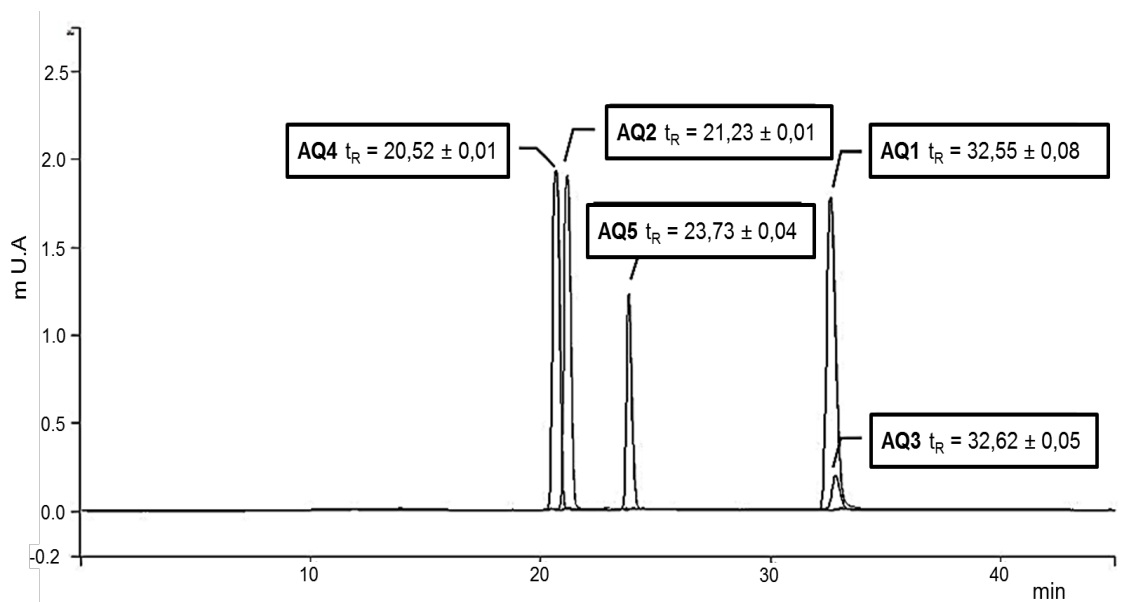
A-Validación de la metodología de HPLC-UV-Vis

Previo al análisis químico de los extractos por HPLC, fue necesario validar la metodología a utilizar. Para ello, se utilizó una columna y un sistema de dos solventes como FM que se utilizan de forma rutinaria en la separación e identificación de AQs presentes en una matriz compleja, como es un extracto de planta (He *et al.*, 2009; Panichayupakaranant *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2013).

El gradiente de la FM y la velocidad de flujo de la misma se optimizaron con el fin de obtener una buena separación y resolución de los compuestos de interés. A ambos disolventes que conforman la FM, se les añadió ácido fórmico (0,16 M) para reducir las colas de los picos, y así obtener señales de forma simétrica. Esto se puede observar en los perfiles cromatográficos de los cinco compuestos que se utilizaron como testigos para la identificación, los cuales se muestran superpuestos en la Fig. 4.9. A pesar de todas las condiciones experimentales probadas (cambio de gradiente y de flujo en la FM), no se logró la separación de **rubiadina (AQ1)** y **soranjidiol (AQ3)** (Fig. 1.6 en Introducción), los cuales son isómeros de posición. La solución de **AQ3** se diluyó para demostrar que eluye con el mismo tiempo de retención (t_R) que **AQ1**. Por otro lado, se obtuvo una buena resolución en la separación de sus derivados metilados en posición 1-: **1 metil éter de rubiadina (AQ2)** y **1 metil éter de soranjidiol (AQ4)**.

Para identificar los derivados antraquinónicos y flavonoides se seleccionó la longitud de onda de 269 nm, ya que las AQs tienen un máximo de absorbancia a 270 nm aproximadamente y los flavonoides exhiben un máximo de absorción a 258 nm con un hombro a 269 nm (Núñez Montoya, 2002). En los cromatogramas de las muestras no se observó interferencia para los compuestos.

Figura 4.9 Superposición de los perfiles cromatográficos de los compuestos estándar: **AQ1** (rubiadina), **AQ2** (1-metil éter de rubiadina), **AQ3** (soranjidiol) **AQ4** (1-metil éter de soranjidiol) y **AQ5** (2-hydroxy-3-metil antraquinona).



AQ1, AQ2, AQ4 y AQ5 a 1 mg/mL, y **AQ3** a 125 µg/mL.

Debido a que la concentración de cada AQ identificada se expresó en función de rubiadina (**AQ1**) y la de cada flavonoide como quercetina (**Quer**), se realizaron dos curvas de calibración, una para cada compuesto testigo. En la Tabla 4.3 se muestra la ecuación obtenida para cada curva de calibración y su R^2 . Se puede observar que en el rango de concentraciones ensayadas se cumple con la Ley de Lambert-Beer, y junto con los resultados de la prueba- t se confirma que el método es lineal en ese mismo rango de concentraciones.

Tabla 4.3 Curva de calibración, límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para rubiadina (**AQ1**) y quercetina (**Quer**) determinados por HPLC-UV-Vis.

Compuesto	Rango de linealidad (µg/mL)	Ecuación de la curva de calibración ^a	R ²	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
AQ1	6,25 - 100	$y = 59334x + 71$	0,9953*	0,22	0,43
Quer	12,5 - 200	$y = 57994x - 527,04$	0,997*	1,12	1,63

^a Cinco puntos (n = 2), x = concentración de los compuestos (mg/mL) y = área del pico.* t -test: $p < 0.05$

Se llevó a cabo un estudio de validación para garantizar la precisión y exactitud del método analítico desarrollado, incluyendo el sistema cromatográfico utilizado. Para esto, se realizaron una serie de ensayos, incluyendo la determinación de límite de

detección y cuantificación (LOD y LOQ), linealidad, precisión intra-día y entre días, y exactitud. La determinación de los valores de LOD y LOQ de los compuestos testigos **AQ1** y **Quer**, se realizó mediante la dilución secuencial de las soluciones estándar de los correspondientes compuestos. También se muestran en la Tabla 4.3 los valores de LOD (relación señal-ruido proporción = 3) y el LOQ (S/N = 10) para cada compuesto de referencia.

Para determinar la precisión y la exactitud del sistema cromatográfico, se utilizaron las variaciones intra e inter- día de los dos compuestos de referencia (Tabla 4.4). Los valores de RSD intra y entre días de los analitos fueron menores a 4 %, estando por debajo del máximo valor de RSD calculado mediante la ecuación de Horwitz ($RSD_{\text{máx}} = 16,85$ para **AQ1**, y $14,93$ para **Quer**). Estos resultados muestran una buena repetitividad y reproducibilidad del sistema cromatográfico. Por otra parte, la precisión observada fue buena (% RSD <3). Como estos experimentos se realizaron durante tres días consecutivos, la estabilidad de los estándares **AQ1** y **Quer** en las soluciones de trabajo se estudió simultáneamente. Los datos muestran que tanto **AQ1** como **Quer** en solución, fueron estables dentro de los 3 días después de su preparación, conservados durante 8 h a temperatura ambiente y 12 h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tabla 4.4).

Resultados y Discusión

Tabla 4.4 Valores de precisión y exactitud intra y entre días para los compuestos de referencia: Rubiadina (**AQ1**) y quercetina (**Quer**).

Compuesto de Referencia	Concentración (µg/mL)	Precisión intra-día (n = 3) (Repetitividad)						Precisión entre días (n = 9) (Reproducibilidad)		Exactitud intra-día			Exactitud entre días
		Día 1		Día 2		Día 3		µg/mL	RSD %	Día 1	Día 2	Día 3	RSD %
		µg/mL	RSD %	µg/mL	RSD %	µg/mL	RSD %			RSD %	RSD %	RSD %	
AQ1	50	51,2 ± 1,9	3,71	51,9 ± 2,0	2,91	51,4 ± 0,7	1,36	51,5 ± 0,3	0,58	2,33	3,62	2,78	2,91
	6,25	6,43 ± 0,16	2,49	6,27 ± 0,17	1,87	6,4 ± 0,1	1,56	6,37 ± 0,07	1,09	2,75	0,40	2,41	1,87
Quer	100	98,4 ± 0,9	0,91	99,6 ± 0,6	-1,33	98,1 ± 0,7	0,71	98,7 ± 0,6	0,64	-1,59	-0,44	-1,95	-1,33
	50	49,1 ± 0,7	1,43	49,3 ± 0,8	-1,74	49,0 ± 0,9	1,84	49,13 ± 0,09	0,24	-1,76	-1,49	-1,96	-1,74
		t _R (min)	RSD %	t _R (min)	RSD %	t _R (min)	RSD %	t _R (min)	RSD %				
AQ1	50 y 6,25	33,16 ± 0,12	0,36	33,01 ± 0,05	0,15	32,52 ± 0,15	0,46	32,89 ± 0,34	1,03				
Quer	100 y 50	12,78 ± 0,02	0,15	12,73 ± 0,06	0,47	13,03 ± 0,13	0,99	12,85 ± 0,13	1,01				

Resultados y Discusión

Se determinó la precisión intra e inter-día del método analítico propuesto, analizando el contenido de los compuestos testigos en una solución de extracto Ben enriquecido con **AQ1** (45 mg/mL) y otra de extracto de AcOEt enriquecido con **Quer** (30 mg/mL), las cuales fueron inyectadas por triplicado durante tres días consecutivos. Los valores se expresaron como porcentaje de RSD cuyos valores fueron menores a 4 % (Tabla 4.5). Por lo tanto, el método analítico mostró una buena repetitividad y reproducibilidad.

Tabla 4.5 Valores de precisión intra y entre días para rubiadina (**AQ1**) y quercetina (**Quer**) detectadas en los extractos de *H. pustulata*.

Compuesto	Precisión intra-día (n= 3)						Precisión entre días (n= 9)	
	Día 1		Día 2		Día 3		Contenido (µg/mL)	RSD %
	Contenido (µg/mL)	RSD %	Contenido (µg/mL)	RSD %	Contenido (µg/mL)	RSD %		
AQ1 ^a	59,75 ± 2,24	3,75	60,52 ± 0,97	1,60	64,67 ± 2	3,14	61,64 ± 2,16	3,50
Quer ^b	56,64 ± 0,60	1,06	56,46 ± 0,7	1,24	56,49 ± 0,90	1,59	56,53 ± 0,08	0,14

^a Detectado en el extracto Ben.

^b Detectado en el extracto AcOEt.

La precisión se determinó utilizando las mismas soluciones de extracto Ben con el agregado de **AQ1** y del extracto AcOEt con el agregado de **Quer**, y se expresó como un porcentaje de recuperación. Las recuperaciones porcentuales obtenidas de ambos analitos se muestran en la Tabla 4.6, y sus valores establecen que el método mostró una buena precisión.

Tabla 4.6 Datos de recuperación de rubiadina (**AQ1**) y quercetina (**Quer**) de los extractos de *H. pustulata*, enriquecidos con los compuestos de referencia.

Compuesto	Agregado (µg/mL)	Detectado ^a (µg/mL)	Recuperación promedio (%)	RSD (%)
AQ1	45	44,3 ± 1,2	97,2 ± 2,5	2,57
Quer	30	29,7 ± 0,4	98,8 ± 1,5	1,52

^a Calculado como la diferencia entre la cantidad total después del agregado del estándar al respectivo extracto y la cantidad de ese compuesto en el extracto antes del agregado del estándar. Los datos se expresaron como el promedio de 3 experimentos.

Este estudio de validación demostró que el método de HPLC propuesto es razonablemente preciso y exacto para la detección (t_R) y cuantificación de AQs y flavonoides. Todos los valores de RSD en los experimentos de precisión intra- e inter-

día fueron menores al 4 %, y mostraron una alta tasa de recuperación para ambos tipos de compuestos químicos (AQs y flavonoides). Por lo tanto, teniendo en cuenta la naturaleza compleja de los extractos vegetales y los requisitos analíticos, se puede considerar que este método de HPLC resultó adecuado para la detección simultánea de AQs y flavonoides, como así también su cuantificación en los extractos de *H. pustulata*.

B- Análisis químico de los extractos de partes aéreas de *H. pustulata* por HPLC-UV-Vis: Correlación entre su composición química y la actividad antibiofilm *in vitro*

La caracterización química de los extractos mediante el análisis por HPLC, demostró que el extracto Ben sólo contiene derivados antraquinónicos (Tabla 4.7), mostrando poseer una gran variedad de éstos a altas concentraciones en comparación con los demás extractos. En este extracto, las AQs mayoritarias resultaron ser **rubiadina (AQ1)** y **soranjidiol (AQ3)**, seguidas en orden decreciente por **pustulina (AQ6)** (Fig. 1.6 en Introducción y Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en extractos de partes aéreas de *H. pustulata* mediante HPLC-UV-Vis.

METABOLITOS SECUNDARIOS	IDENTIFICACIÓN	CUANTIFICACIÓN (% p/p)*			
ANTRAQUINONAS	t _R en extractos (min)	Hex	Ben	AcOEt	EtOH
Damnacantal (AQ7)	-	-	-	-	-
Damnacantol (AQ8)	13,85 ± 0,01	-	0,34 ± 0,07	-	-
1-metil éter de soranjidiol (AQ4)	20,53 ± 0,01	0,014 ± 0,003	0,58 ± 0,08	-	-
1-metil éter de rubiadina (AQ2)	21,12 ± 0,01	0,05 ± 0,06	0,15 ± 0,08	-	-
2-OH-3-CH ₃ -AQ (AQ9)	23,78 ± 0,04	0,09 ± 0,03	0,30 ± 0,05	0,4 ± 0,1	0,03 ± 0,02
Pustulina (AQ6)	23,25 ± 0,05	0,49 ± 0,07	1,64 ± 0,08	0,52 ± 0,01	0,077 ± 0,002
Rubiadina (AQ1)	32,57 ± 0,08	0,4 ± 0,1	2,7 ± 0,8	0,416 ± 0,007	0,12 ± 0,02
Soranjidiol (AQ3)					
Heterofilina (AQ5)	30,9 ± 0,1	0,12 ± 0,09	0,33 ± 0,02	0,038 ± 0,005	-
5,5'-bisoranjidiol (AQ10)	34,4 ± 0,1	0,09 ± 0,05	0,09 ± 0,07	0,06 ± 0,01	-
FLAVONOIDES					
Quercetina (Quer)	11,85 ± 0,04	-	-	2,36 ± 0,03	-
Isoquercitrina	8,0 ± 0,2	-	-	1,91 ± 0,07	2,19 ± 0,09
3-O-β-D-(6"-acetilglucosil) quercetina	9,2 ± 0,1	-	-	3,2 ± 0,4	1,89 ± 0,04

* (g de compuesto en 100 g de extracto desecado). Hex: extracto hexano. Ben: extracto benceno. AcOEt: extracto acetato de etilo. EtOH: extracto etanol

En el caso del extracto Hex, las concentraciones de AQs fueron menores que en el extracto Ben. Por su parte, los extractos de AcOEt y EtOH poseen un mayor contenido de flavonoides que de AQs. Así, se estableció que la principal diferencia entre los extractos no polares (Hex y Ben) y los polares (AcOEt y EtOH) es que éstos últimos poseen una significativa cantidad de flavonoides (Marioni *et al.*, 2016a).

El efecto producido por cada extracto de *H. pustulata* sobre biofilms de *C. tropicalis* se puede explicar mediante el análisis de su composición química. Así, la significativa actividad antibiofilm del extracto Ben observada bajo irradiación (Fig. 4.3), podría atribuirse su alto contenido de AQs con propiedades fotosensibilizantes, ya que se demostró que el efecto de este extracto se debe a una alta producción de $O_2^{\bullet-}$ (Fig. 4.5). Es importante destacar, que las AQs predominantes en el extracto Ben son rubiadina (**AQ1**) y soranjidiol (**AQ3**), las cuales han demostrado ser buenos compuestos fotosensibilizadores mediante la estimulación de la producción de $O_2^{\bullet-}$ (Mecanismo fotosensibilizante Tipo I) (Núñez Montoya *et al.*, 2005; Comini *et al.*, 2007). Además, esta ERO es la principal precursora de otras especies de oxígeno altamente reactivas como H_2O_2 y HO^{\bullet} .

Por otro lado, la baja concentración de AQs fotosensibilizantes en los extractos Hex, AcOEt y EtOH (Tabla 4.7), junto con la presencia de cantidades importantes de flavonoides, especialmente en los extractos polares (AcOEt y EtOH), podría ser la causa de la baja detección de ERO en los mismos. Esto sería una consecuencia de un gran consumo de las ERO por mecanismos antioxidantes como FRAP y a su vez propiciados por los flavonoides. Consecuentemente, esto deriva en un leve efecto de estos extractos sobre los biofilms.

En el caso del extracto Hex, la concentración de AQs fue menor respecto al extracto Ben, y parecería que la activación de la SOD y del sistema antioxidante total del biofilm podría contrarrestar el efecto de las escasas ERO y ERN generados por las AQs presentes en este extracto (Fig. 4.5 y 4.6). Por el contrario, los extractos de AcOEt y EtOH poseen un mayor contenido de flavonoides que AQs, dos de ellos con reconocida actividad antioxidante (**Quer** e Isoquercitrina) (Permana *et al.*, 2003; Boots *et al.*, 2008). Esto podría explicar la baja generación de ERO y de ERN por estos extractos bajo irradiación, que a su vez fue contrarrestada por la activación del sistema antioxidante total del biofilm.

IV.3.2 – Análisis químico mediante HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF

Mediante esta metodología se corroboró la identificación de los derivados antraquinónicos presentes en los extractos de partes aéreas de *H. pustulata* (Tabla 4.8).

Como se puede observar, los tiempos de retención como así también el ión [M-1] y los respectivos fragmentos de los iones de los metabolitos secundarios presentes en los extractos coinciden con los de los testigos. Así se logró confirmar la identificación de las AQs y flavonoides.

Resultados y Discusión

Tabla 4.8. Identificación de metabolitos secundarios en extractos de partes aéreas obtenidos de *H. pustulata* mediante HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF.

EXTRACTOS DE PARTES AÉREAS							
Compuesto	[M-1] (m/z)	Testigo			Extractos		
		t _R	Fragmentos MS/MS (m/z)	UV-Vis (nm)	t _R	Fragmentos MS/MS (m/z)	UV-Vis (nm)
2-OH-3-CH ₃ -AQ (AQ9)	237	26,7 ± 0,2	209	277, 328 (sh), 385	26,5 ± 0,2	209	281, 340 (sh), 371 (1, 2, 3, 4)
Rubiadina (AQ1)	253	35,1 ± 0,1	----	245, 278, 337, 411	35,2 ± 0,1	225	277, 337 (sh), 414 (1, 2, 3, 4)
Soranjidiol (AQ3)		35,3 ± 0,2	225	269, 291 (sh), 411	35,5 ± 0,1	----	270, 291 (sh), 413 (1, 2, 3, 4)
1-metil éter de soranjidiol (AQ4)		24,15 ± 0,07	252, 224	269, 288 (sh), 353	24,2 ± 0,0	252, 224	269, 288 (sh), 353 (1, 2)
1-metil éter de rubiadina (AQ2)	267	24,8 ± 0,2	252, 224	280, 356	24,5 ± 0,0	252, 224	280, 356 (1, 2)
Pustulina (AQ6)		26,5 ± 0,0	252, 224	254 (sh), 283, 342 (sh), 400 (sh)	26,5 ± 0,0	252, 224	256 (sh), 283, 337 (sh), 380 (sh) (1, 2, 3, 4)
Damnacantol (AQ8)	283	19,8 ± 0,2	239, 183	242, 278, 317 (sh), 362 (sh)	19,7 ± 0,1	253, 210	273, 369 (2)
Heterofillina (AQ5)		34,2 ± 1,1	268, 240	286, 305 (sh), 406 (sh), 426, 442 (sh)	33,5 ± 0,0	268, 240	287, 304 (sh), 408 (1, 2, 3)
Quercetina (Quer)	301	18,1 ± 0,2	255	257, 268 (sh), 299 (sh), 374	18,3 ± 0,0	---	256, 267 (sh), 371 (3)
Isoquercitrina	463	15,97 ± 0,06	300	257, 265 (sh), 297 (sh), 356	16,0 ± 0,0	301	257, 265 (sh), 300 (sh), 355 (3, 4)
3-O-β-D-(6"-acetilglucosil) quercetina	505	16,7 ± 0,01	301	258, 268 (sh), 299 (sh), 362	16,7 ± 0,0	301	255, 264 (sh), 296 (sh), 357 (3, 4)
5, 5'-bisoranjidiol (AQ10)		36,06 ± 0,09	456, 253	276, 298 (sh), 441	36,05 ± 0,05	455,253	272, 304 (sh), 386 (sh)

1: extracto Hex, 2: extracto Ben, 3: extracto AcOEt, 4: extracto EtOH

Otro logro de esta tesis, fue el desarrollo de dos métodos para identificar AQs y flavonoides: HPLC-UV-Vis y HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF. Además, se realizó la validación del método HPLC-UV-Vis, lo cual permitió además cuantificar el contenido de los metabolitos en los extractos. Así, se demostró que las AQs aglicones son los metabolitos secundarios mayoritarios, especialmente en los extractos apolares debido a su naturaleza aglicón. Además, se pudo determinar que sólo los extractos más polares contienen flavonoides.

Esta caracterización química de los extractos de *H. pustulata* por HPLC, permitió estimar que el efecto fotodinámico del extracto Ben podría ser atribuido al alto contenido de AQs con propiedades fotosensibilizantes y a la ausencia de flavonoides antioxidantes (Núñez Montoya *et al.*, 2003; Marioni *et al.*, 2016a). Se destaca como principal constituyente rubiadina (**AQ1**) que ha mostrado propiedades fotosensibilizantes Tipo I (generación de $O_2^{\bullet-}$) y Tipo II (producción de 1O_2) (Núñez Montoya *et al.*, 2005; Comini *et al.*, 2007).

IV.4- SEPARACIÓN, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ANTRAQUINONAS

A partir del análisis por HPLC del extracto Ben de partes aéreas de *H. pustulata* que resultó activo sobre biofilm de *C. tropicalis* CRF6, se estableció que AQ1 (Fig. 1.6 en Introducción) es una de las AQs mayoritarias (Tabla 4.7). Por tal motivo, se decidió probar su actividad antibiofilm fotoactivada in vitro, y compararla con otra AQ relacionada estructuralmente, su derivado metilado: 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**).

En la búsqueda de la cantidad necesaria y suficiente de ambas AQs, se llevó a cabo una estrategia de purificación que resultara más simple. Como los extractos de raíces de esta planta no poseen clorofilas que interfieren en el proceso de purificación, se analizó la composición química de los mismos. A partir de 90 g de raíces de esta especie vegetal se obtuvieron los extractos Hex $0,4325 \pm 0,0002$ g, Ben $0,3036 \pm 0,0002$ g, AcOEt $0,3350 \pm 0,0002$ g y EtOH $2,3893 \pm 0,0002$ g. Mediante el análisis por HPLC se demostró que las raíces poseen un alto contenido de derivados antraquinónicos, sin presencia de flavonoides (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en extractos de raíces obtenidos de *H. pustulata* mediante HPLC-UV-Vis.

METABOLITOS SECUNDARIOS	IDENTIFICACIÓN	CUANTIFICACIÓN (% p/p)*			
ANTRAQUINONAS	t_R in extracts (min)	Hex	Ben	AcOEt	EtOH
Damnacantal (AQ7)	-	-	-	-	-
Damnacantol (AQ8)	$19,8 \pm 0,2$	$0,61 \pm 0,05$	$29,47 \pm 0,02$	$11,27 \pm 0,04$	$3,13 \pm 0,03$
1-metil éter de soranjidiol (AQ4)	-	-	-	-	-
1-metil éter de rubiadina (AQ2)	$24,85 \pm 0,07$	$9,79 \pm 0,02$	$38,49 \pm 0,05$	$16,15 \pm 0,04$	$7,38 \pm 0,02$
2-OH-3-CH3-AQ (AQ9)	$26,95 \pm 0,07$	$2,9 \pm 0,1$	$14,21 \pm 0,02$	$4,57 \pm 0,02$	$1,46 \pm 0,02$
Pustulina (AQ6)	-	-	-	-	-
Rubiadina (AQ1)	$34,95 \pm 0,07$	$13,26 \pm 0,03$	$35,82 \pm 0,04$	$8,51 \pm 0,03$	$5,02 \pm 0,03$
Soranjidiol (AQ3)	-	-	-	-	-
Heterofilina (AQ5)	-	-	-	-	-
5,5'-bisoranjidiol (AQ10)	$36,05 \pm 0,07$	$0,45 \pm 0,03$	$7,58 \pm 0,02$	$4,07 \pm 0,03$	$2,49 \pm 0,02$
ω -metil éter de Lucidina	$28,75 \pm 0,07$	-	$0,36 \pm 0,06$	$0,44 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,07$
FLAVONOIDES					
Quercetina (Quer)	-	-	-	-	-
Isoquercitrina	-	-	-	-	-
3-O- β -D-(6"-acetilglucosil) quercetina	-	-	-	-	-

* (g de compuesto en 100 g de extracto desecado). Hex: extracto hexano. Ben: extracto benceno. AcOEt: extracto acetato de etilo. EtOH: extracto etanol

Esto también constituye una ventaja en la obtención de las AQs, ya que la ausencia de flavonoides facilita el proceso de purificación. Al igual que en partes aéreas, el extracto Ben se destacó por su alto contenido de AQs, especialmente de **AQ1** y **AQ2**. Incluso, la concentración de **AQ1** fue mayor en raíces ($35,82 \pm 0,04$ % p/p), que en las partes aéreas ($2,74 \pm 0,84$ % p/p en partes aéreas) (Tabla 4.9 y Tabla 4.7). En consecuencia, se seleccionó el extracto Ben de raíces para purificar **AQ1** y su derivado metilado.

IV.4.1- Separación y purificación de rubiadina y 1-metil éter de rubiadina

Una fracción del extracto bencénico de raíces (1,018 g), se procesó por cromatografía en columna de sílica gel con el gradiente de FM que se muestra en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10: Gradiente de FM de la columna de sílica gel del extracto Benceno de raíces.

Gradiente FM	Alícuotas
Ben	1-27
Ben - AcOEt (8:2)	28-50
Ben - AcOEt (1:1)	51-60
Ben - AcOEt (2:8)	61-66
AcOEt	67-68
AcOEt - Acetona (8:2)	69-76
AcOEt - Acetona (1:1)	77-91
AcOEt - Acetona (2:8)	92-97
Acetona	98
EtOH	99

Posteriormente, las 99 alícuotas obtenidas se testearon por TLC analítica en dos FM: CHCl_3 -AcOEt (8:2) y Ben-MeOH (95:5). De esta forma, se agruparon en 23 fracciones, teniendo en cuenta su patrón cromatográfico (I a XXIII).

A continuación, las 23 fracciones obtenidas se testearon por TLC contra testigo de **AQ1** y **AQ2**, usando las mismas FM anteriores, con el fin de determinar las fracciones donde estaban presentes.

A partir de la fracción III, se aisló **AQ2** mediante TLCp utilizando como FM Ben-MeOH (95:5). Esta AQ se observó de color opaco cuando fue revelada con luz UV, incluso con vapores de NH₃ y a simple vista se observó de color rojizo.

AQ1 fue aislada y purificada de la fracción V por TLCp con MeOH-Ácido fórmico 0,16 M (8:2). Esta AQ se reveló a la luz UV con un color naranja-opaco, que se intensificó con vapores de NH₃ bajo luz UV, siendo a simple vista observada como una mancha rojiza.

A su vez, ambas AQs también se obtuvieron de la fracción IV. Al estar juntas, se necesitó realizar una cromatografía columna similar a la anterior. Se utilizó la misma FE y el mismo gradiente de elución, obteniéndose 31 fracciones analizadas por TLC (I a XXXI-bis). La fracción IVbis (proveniente de esta segunda columna) se purificó por TLCp en varios pasos: primero se realizaron dos corridas sucesivas en CHCl₃ y posteriormente, una tercera corrida en CHCl₃- AcOEt (9:1) a frente fluente para obtener en forma separada **AQ1** y **AQ2**.

IV.4.2- Identificación de rubiadina y 1-metil éter de rubiadina

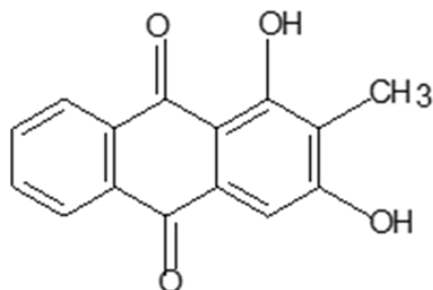
AQ1 y **AQ2** se identificaron siguiendo la metodología descrita por Núñez Montoya (2002). En primer lugar, se identificaron por comparación de sus R_f contra testigo en TLC, específicamente se realizó co-cromatografía en varias FM. En la Tabla 4.11 se muestran sus R_f en las FM utilizadas, que fueron coincidentes con los compuestos estándares.

Tabla 4.11 R_f de las AQs purificadas: Rubiadina (**AQ1**) y 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**)

AQ	R _f x100			Revelado	Testigo
	Ben-AcOEt (8:2)	Ben-MeOH (95:5)	CHCl ₃ -AcOEt (9:1)		
AQ1	95	55	58	Nop/ Nop/ R	rubiadina
AQ2	38	47	80	Op/ Op/ R	1-metil éter de rubiadina

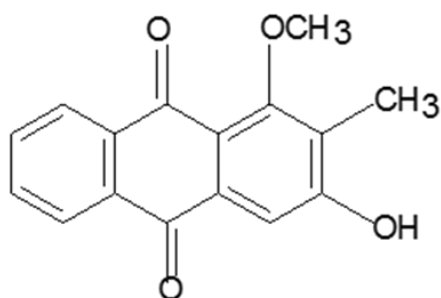
UV: luz UV; UV+NH₃: vapores de NH₃ bajo luz UV; Vis+NH₃: vapores de NH₃ bajo luz visible. Nop: naranja-opaco; Op: opaco; R: rojizo

En la Tabla 4.12 se muestran los datos espectrales (UV-Vis, EM, RMN ¹H y ¹³C) de las AQs purificadas, los cuales fueron coincidentes con los de los testigos (Núñez Montoya, 2002).

Tabla 4.12 Datos espectrales de las AQs purificadas: **(A)** rubiadina (**AQ1**) y **(B)** 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**).**A**

EM-IE m/z (rel.int.)		254 (100)	[M ⁺]		
		236 (7)	[M ⁺ - 18]		
		226 (13)	[M ⁺ - 28]		
		225 (10)	[M ⁺ - 29]		
		208 (5)	[M ⁺ - 18 - 28]		
		197 (12)	[M ⁺ - 28 - 29]		
		180 (7)	[M ⁺ - 18 - 28 - 28]		
		169 (5)	[M ⁺ - 28 - 29 - 28]		
		152 (16)	[M ⁺ - 28 - 29 - 28 - 17]		
		141 (12)	[M ⁺ - 28 - 29 - 28 - 28]		
		115 (18) y			
		105 (11)			
RMN-¹H δ (ppm)	(Acetona-d ₆)	2,30	[3H; s; CH ₃ -2];	8,36	[2H; m; H-5 y 8];
		7,48	[1H; s; H-4];	10,07	[1H; s; OH-2];
		8,01	[1H; m; H-6 y 7];	13,32	[1H; s; OH-1]
	(DMSO-d ₆)	2,05	[3H; s; CH ₃ -2]	8,14	[2H; m; H-5 y 8]
		7,22	[1H; s; H-4]	11,17	[1H; s; OH-2]
		7,89	[2H; m; H-6 y 7]	12,49	[1H; s; OH-1]
RMN-¹³C (DMSO-d ₆) δ (ppm)		C-1	162,45;	C-6	134,38;
		C-1a	108,94;	C-7	134,48;
		C-2	no aparece;	C-8	126,66;
		C-3	162,80;	C-8a	132,97;
		C-4	107,36;	C-9	186,18;
		C-4a	131,69;	C-10	181,74 y
		C-5	126,33;	CH ₃ -2	8,04
		C-5a	132,88;		
IR γ max. (cm-1)		3400 [OH libre]; 2956; 2925; 2848; 1675 [C=O libre]; 1645; [C=O quelado]; 1581; 1451; 1381.			
UV-V λ max (nm). [log ε]	(EtOH)	243,0 [0,13]; 279,0 [0,18]; 315,0 (sh) [0,03] y 411,0 [0,03]			
	(EtOH/MeONa)	240,2 [0,16]; 314,0 [0,17]; 341,0 (sh) [0,07] y 494,0 [0,05]			
	(CHCl ₃)	246,0 [0,57]; 279,0 [0,80]; 333,0 [0,07] y 411,0 [0,14]			

B

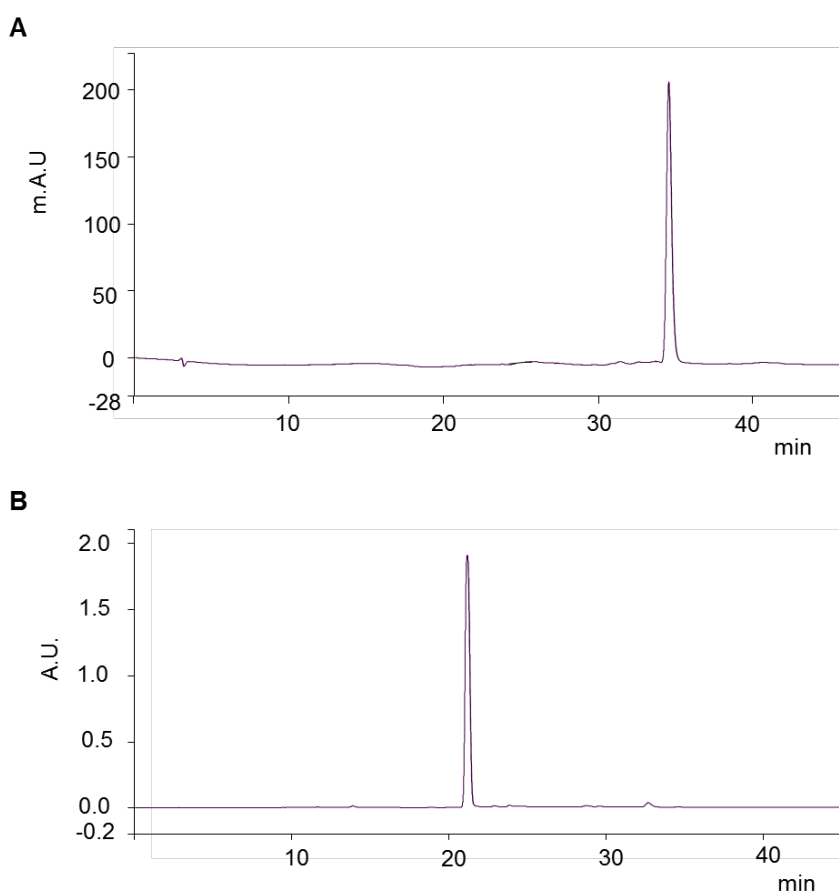


EM-IE m/z (rel.int.)	268 (100)	[M ⁺]		
	253 (52)	[M ⁺ - 15]		
	251 (34)	[M ⁺ - 17]		
	250 (35,5)	[M ⁺ - 18]		
	240 (30)	[M ⁺ - 28]		
	239 (34)	[M ⁺ - 29]		
	223 (18)	[M ⁺ - 17 - 28]		
	222 (22)	[M ⁺ - 18 - 28]		
	212 (7,6)	[M ⁺ - 28 - 28]		
	210 (7)	[M ⁺ - 29 - 29]		
	195 (10)	[M ⁺ - 17 - 28 - 28]		
	194 (14,5)	[M ⁺ - 18 - 28 - 28]		
	181 (20)	[M ⁺ - 29 - 29 - 29]		
	166 (10)	[M ⁺ - 17 - 28 - 28 - 29]		
165 (21,6)	[M ⁺ - 18 - 28 - 28 - 29]			
152 (25)	[M ⁺ - 29 - 29 - 29 - 29] y			
139 (16,6)				
RMN-¹H (DMSO-d ₆) δ (ppm)	2,18	[3H; s; CH ₃ -2];	7,90	[2H; m; H-6 y 7];
	3,81	[3H; s; OCH ₃ -1];	8,16	[2H; m; H-5 y 8] y
	7,53	[1H; s; H-4];		OH-3 no aparece.
RMN-¹³C (DMSO-d ₆) δ (ppm)	C-1	160,60;	C-6	133,29;
	C-1a	117,90;	C-7	134,48;
	C-2	126,10;	C-8	126,58;
	C-3	161,57;	C-8a	133,70;
	C-4	108,98;	C-9	182,56;
	C-4a	132,03;	C-10	180,14;
	C-5	125,99;	OCH ₃ -1	60,55 y
	C-5a	134,48;	CH ₃ -2	8,96
IR γ max. (cm ⁻¹)	3316 [OH libre]; 2923; 2854; 1670 y 1648 [C=O libre];			
	1562; 1460; 1374; 1166.			
UV-V λ max (nm). [log ε]	(EtOH)	240,0 [0,38]; 279,0 [0,68]; 330,0 [0,08] y 351,0 (sh) [0,07]		
	(EtOH/MeONa)	245,0 [1,24]; 314,0 [1,22] y 479,0 [0,22]		
	(CHCl ₃)	276,0 [1,78]; 339,0 [0,22] y 360,0 (sh) [0,19]		

Al finalizar la purificación e identificación de ambas AQs, se obtuvo $8,9 \pm 0,2$ mg de **AQ1** y $9,4 \pm 0,2$ mg de **AQ2**. Esto corresponde a un rendimiento de 0,88 % y 0,92 %, respectivamente respecto de la fracción de extracto procesado. Este procedimiento se repitió en la medida que se necesitó más cantidad de estas AQs, para estudiar su actividad antifúngica sobre biofilms de *Candida*.

Se determinó el grado de pureza de las AQs por HPLC-UV-Vis, siguiendo la metodología descrita previamente. La misma fue calculada por el programa del equipo, en base a los cromatogramas obtenidos para cada una (Fig. 4.10). La pureza de **AQ1** fue de $91,9 \pm 0,1$ % y de **AQ2** $94,0 \pm 0,1$ %.

Figura 4.10 Pureza de las AQs ensayadas: (A) rubiadina (**AQ1**) y (B) 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**), determinada por HPLC-UV-Vis.



Habiendo establecido que rubiadina (**AQ1**), una AQ con propiedades fotosensibilizantes (Núñez Montoya *et al.*, 2005), es una de las AQs mayoritarias presente en el extracto que resultó fotoactivo sobre biofilms de *C. tropicalis* (Ben), se

planteó una estrategia de purificación. El propósito fue obtener esta AQ en cantidad necesaria para evaluar su actividad antibiofilm *in vitro* bajo la acción de luz. A su vez, se decidió purificar su derivado metilado, 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**), a fin de correlacionar los efectos fotobiológicos con la diferencia estructural, dada por un grupo metilo en posición 1- (Fig. 1.6).

Dado que los extractos de raíces presentaron mayor contenido de estas AQs, sin presencia de flavonoides y otros pigmentos, especialmente clorofilas, que pudieran interferir en su purificación, la estrategia fue obtener **AQ1** y **AQ2** a partir del extracto Ben de raíces, en donde se encontraron en mayor proporción. Mediante la combinación de cromatografía en columna y TLCp, se logró el aislamiento y purificación de ambas AQs. La identidad se corroboró por sus datos espectrales, especialmente RMN- ^1H y ^{13}C . Con el fin de ser utilizadas en ensayos fotobiológicos, fotoquímicos y/o fotofísicos, se obtuvieron estas AQs con un alto grado de pureza determinado por HPLC-UV-Vis.

IV.5- DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD DE LAS ANTRAQUINONAS

La citotoxicidad de las AQs a ensayar como posibles agentes antifúngicos sobre biofilms, se determinó sobre células Vero, una línea celular eucariota de mamífero que se toma como modelo de célula hospedadora para este tipo de ensayos. El objetivo no sólo fue establecer la CC_{50} para cada AQ, si no conocer las concentraciones en donde la VC es \geq al 90 % (MCNC) o \geq al 80 % (CSubT). De esta manera, se estableció el rango de concentraciones en donde cada AQ puede ser ensayada como agente antifúngico, con baja o nula citotoxicidad sobre una célula eucariota hospedadora.

Los valores de CC_{50} , CSubT y MCNC estimados para cada AQ, se muestran en la Tabla 4.13. Estos valores nos indican que **AQ2** es menos citotóxica que **AQ1**. De esta forma, la presencia de un grupo metoxi (-OCH₃) en lugar de un grupo hidroxilo (-OH) en posición 1, estaría otorgando una menor citotoxicidad a la AQ, lo cual se reflejó en mayores valores de MCNC, CSubT y CC_{50} para **AQ2** (Konigheim *et al.*, 2012b).

Tabla 4.13 Valores de citotoxicidad para rubiadina (**AQ1**) y 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**)

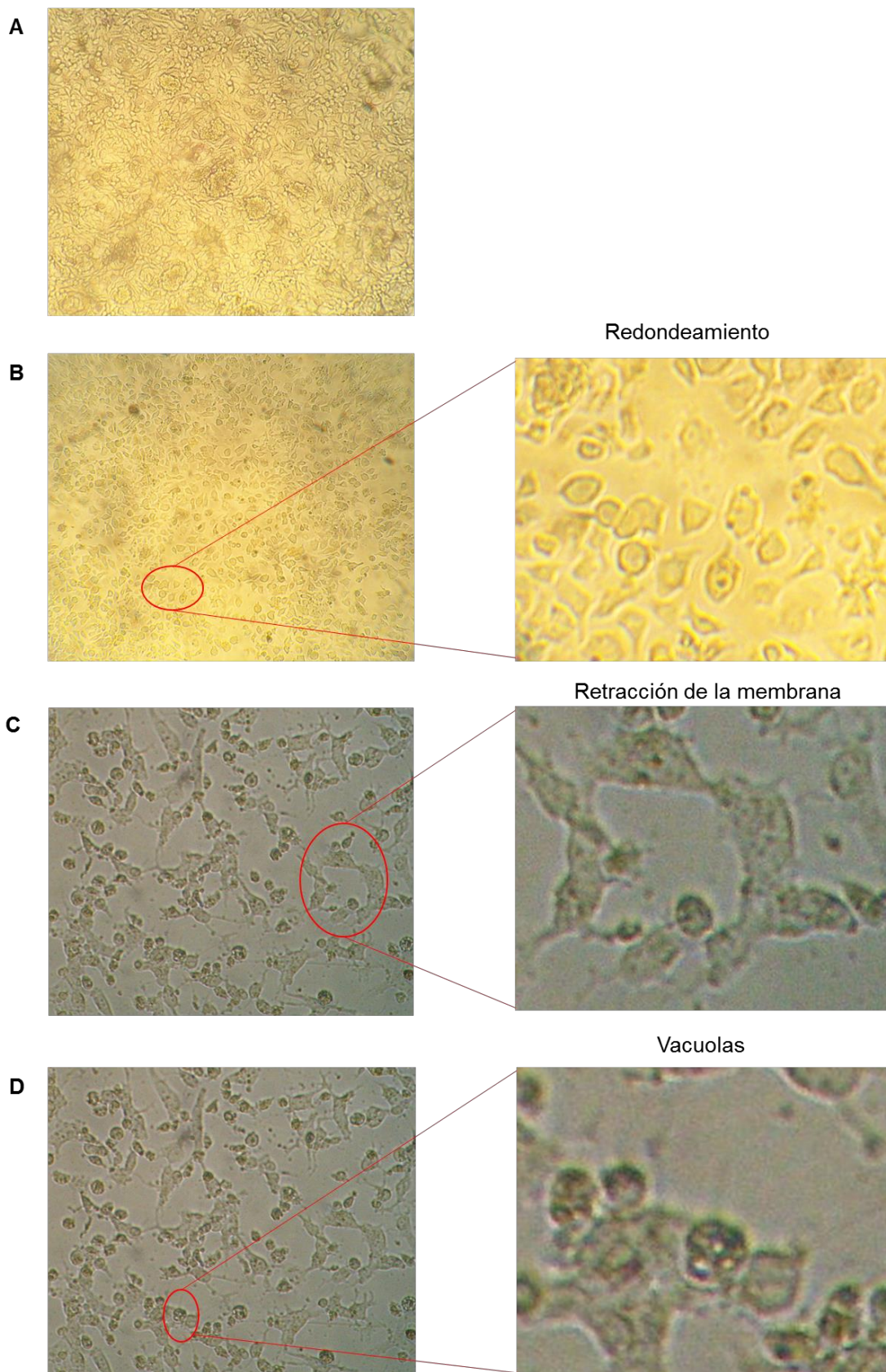
AQ	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CSubT ($\mu\text{g/mL}$)	MCNC ($\mu\text{g/mL}$)
AQ1	14,9 \pm 0,2	8,2 \pm 0,1	5,3 \pm 0,3
AQ2	34,4 \pm 0,2	26,8 \pm 0,1	22,2 \pm 0,4

CC_{50} : Concentración citotóxica al 50% de VC; CSubT: Concentración subtóxica (corresponde al 80% de VC); MCNC: Máxima concentración no citotóxica (corresponde a > 90% de VC)

En la Fig. 4.11, a modo de ejemplo, se puede observar el efecto citopático (EC) causado por **AQ1** en comparación al control celular (CC). Se muestra la monocapa homogénea del CC (**A**), la cual se perdió cuando fue tratada con **AQ1** a la CC_{50} (**B**). En toda la monocapa celular como un efecto masivo se observó la retracción de la membrana con redondo de las células y desprendimiento de las mismas principalmente (**C**).

Mediante el estudio de citotoxicidad en células Vero *in vitro*, se pudo establecer el rango de concentraciones en el cual cada AQ no posee o presenta bajo efecto citotóxico. Este rango quedó limitado por la CSubT y MCNC: para **AQ1** hasta 8,2 \pm 0,1 $\mu\text{g/mL}$ y para **AQ2** hasta 26,8 \pm 0,1 $\mu\text{g/mL}$. Se demostró además, que **AQ1** es más citotóxica que **AQ2**, con un rango de concentraciones menor que **AQ2**.

Figura 4.11 Efecto citopático de rubiadina (**AQ1**) a la CC_{50} (**B, C y D**), comparado con el CC (**A**).



A y B magnificación 40x; C y D magnificación 400x con microscopía óptica de fase invertida. Representativa de 20 campos.

IV.6- ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA FOTOESTIMULADA DE ANTRAQUINONAS AISLADAS DE *H. pustulata* SOBRE BIOFILMS DE *C. tropicalis*

Antes de probar el efecto de las AQs sobre biofilms de *C. tropicalis* se consideró necesario evaluar su actividad sobre las levaduras en forma planctónica. Así, se determinó la CIM y la CIM fotoactiva. El objetivo fue tener un parámetro de concentración a la cual cada AQ podía ser ensayada sobre el biofilm.

IV.6.1- Determinación de la CIM y CIM fotoactiva de las antraquinonas en levaduras planctónicas de *C. tropicalis*

La CIM de rubiadina y 1-metil éter de rubiadina se realizó siguiendo las normas del CLSI en condiciones de luz y oscuridad, explicadas en materiales y métodos, sobre una cepa clínica CRF6 y una cepa de referencia *C. tropicalis* NCPF 3111. Se observó que los valores de CIM resultaron menores bajo la acción de la luz para ambas cepas (Tabla 4.14). La CIM de ambas AQs con irradiación disminuyó 8 veces en la cepa clínica y 2 veces en la de referencia.

Tabla 4.14 Valores de CIM de las AQs en oscuridad e irradiación, determinados según las normas del CLSI y expresadas en µg/mL.

Cepas	AQ1		AQ2		AMB	
	Oscuridad	Irradiación	Oscuridad	Irradiación	Oscuridad	Irradiación
<i>C. tropicalis</i> CRF6	15,6	1,96	250	31,3	0,5	0,5
<i>C. tropicalis</i> NCPF 3111	1,96	0,98	31,3	15,6	0,5	0,5

AQ1: rubiadina; AQ2: 1-metil éter de rubiadina; AMB: anfotericina B

Se utilizó AMB como control positivo para evaluar los resultados obtenidos con las AQs fotosensibilizantes en comparación con un fármaco usualmente usado en la terapia clínica para tratar infecciones fúngicas. Como AMB (control positivo) no es un compuesto fotosensibilizador, se obtuvo el mismo valor de CIM bajo las condiciones ensayadas (luz/oscuridad).

Los resultados muestran que ambas AQs son más activas al ser irradiadas, ya que con menor concentración se obtiene un efecto similar al de oscuridad (100 % de inhibición en el crecimiento de las levaduras). De esta manera, se determinó la CIM fotoactiva para cada AQ, es decir, la concentración en donde la AQ es activada por la luz para producir un efecto antifúngico. De las dos AQs ensayadas, **AQ1** fue más activa sobre ambas cepas (16 veces), al necesitar menos concentración para producir el mismo efecto que **AQ2**, con un valor de CIMf cercano al de la CIM de AMB sobre la

cepa de referencia. Además, la CIMf de ambas AQs está por debajo de la MCNC, excepto para **AQ2** sobre la cepa clínica. Esto significa que a la concentración activa sobre levaduras planctónicas, no se observaría citotoxicidad sobre células Vero.

En función de la CIMf obtenida sobre cada cepa en estado planctónico, se eligieron las concentraciones a ensayar sobre el biofilm (Marioni *et al.*, 2016b).

IV.6.2- Actividad antibiofilm fotoestimulada de rubiadina y su derivado metilado

Cada AQ se ensayó sobre biofilms de *C. tropicalis* a su CIMf, la mitad de ésta (Sub-CIMf) y el doble (Supra-CIMf), incluida AMB (Tabla 4.15).

Tabla 4.15 Concentraciones de las AQs ensayadas sobre biofilms de *C. tropicalis* en oscuridad e irradiación.

<i>C. tropicalis</i> CRF6		<i>C. tropicalis</i> NCPF 3111	
Concentración (µg/mL)	Compuesto	Concentración (µg/mL)	
AQ1			
0,98	Sub-CIMf	0,49	
1,96	CIMf	0,98	
3,92	Supra-CIMf	1,96	
AQ2			
15,6	Sub-CIMf	7,8	
31,3	CIMf	15,6	
62,6	Supra-CIMf	31,3	
AMB			
0,25	Sub-CIM	0,25	
0,5	CIM	0,5	
1	Supra-CIM	1	

AQ1: rubiadina; AQ2: 1-metil éter de rubiadina; AMB: anfotericina B; CIMf: Concentración inhibitoria mínima fotoactiva; Sub-CIMf: CIMf/2; Supra-CIMf: CIMfx2

La Tabla 4.16 muestra la actividad de ambas AQs sobre biofilms de *C. tropicalis* (clínica y referencia), a las tres concentraciones ensayadas. Las dos AQs no fueron activas en oscuridad a las concentraciones probadas. Sin embargo, bajo la acción de la luz se observó un efecto antibiofilm sobre ambas cepas.

Resultados y Discusión

Sobre el biofilm de la cepa clínica, las dos AQs mostraron actividad desde la concentración más baja probada (Sub-CIMf). **AQ1** y **AQ2** redujeron 4,6 y 3,8 veces el biofilm, respectivamente, valores que no son significativamente diferentes entre sí ($p > 0,05$). Además, las dos AQs produjeron la mayor reducción (5,6 veces) a la SupraCIMf: 3,92 µg/mL de **AQ1** y 62,6 µg/mL de **AQ2**.

Sobre el biofilm de la cepa de referencia, el efecto reductor de las AQs comienza recién a la CIMf y a su vez fue menor respecto de la cepa clínica. A esta concentración, **AQ1** redujo 1,8 veces las UBB, y **AQ2** 2,0 veces ($p > 0,05$). Además, sólo **AQ1** logró una mejor reducción del biofilm (2,6 veces) a la SupraCIMf (1,96 µg/mL). Para **AQ2** no se observa un incremento de la actividad la SupraCIMf (31,3 µg/mL) debido probablemente a un efecto de agregación

Tabla 4.16 Cuantificación del efecto de las AQs sobre biofilms de *C. tropicalis* en condiciones de oscuridad e irradiación, expresado en Unidades de Biomasa del Biofilm (UBB).

	<i>C. tropicalis</i> CRF6		<i>C. tropicalis</i> NCPF 3111	
	Oscuridad	Irradiación	Oscuridad	Irradiación
Biofilm no tratado	42,6 ± 6,3	44,5 ± 6,7	45,3 ± 3,7	45,10 ± 1,38
SubCIMf	44,6 ± 7,7	9,6 ± 3,8 ^{##}	46,3 ± 5,0	46,1 ± 3,1
AQ1 CIMf	41,3 ± 1,9	11,8 ± 3,8 ^{##}	45,1 ± 2,9	25,3 ± 4,6 ^{##}
SupraCIMf	35,2 ± 7,3	7,9 ± 1,4 ^{##}	43,5 ± 3,1	16,5 ± 2,0 ^{##}
SubCIMf	43,5 ± 6,2	11,4 ± 1,1 ^{##}	45,49 ± 3,85	44,6 ± 1,7
AQ2 CIMf	40,9 ± 2,1	9,5 ± 2,5 ^{##}	46,57 ± 5,42	23,6 ± 7,8 ^{##}
SupraCIMf	38,5 ± 2,9	7,9 ± 1,6 ^{##}	45,47 ± 2,29	42,2 ± 3,0

AQ1: rubiadina; AQ2: 1-metil éter de rubiadina; CIMf: Concentración inhibitoria mínima fotoactiva; Sub-CIMf: CIMf/2; Supra-CIMf: CIMfx2

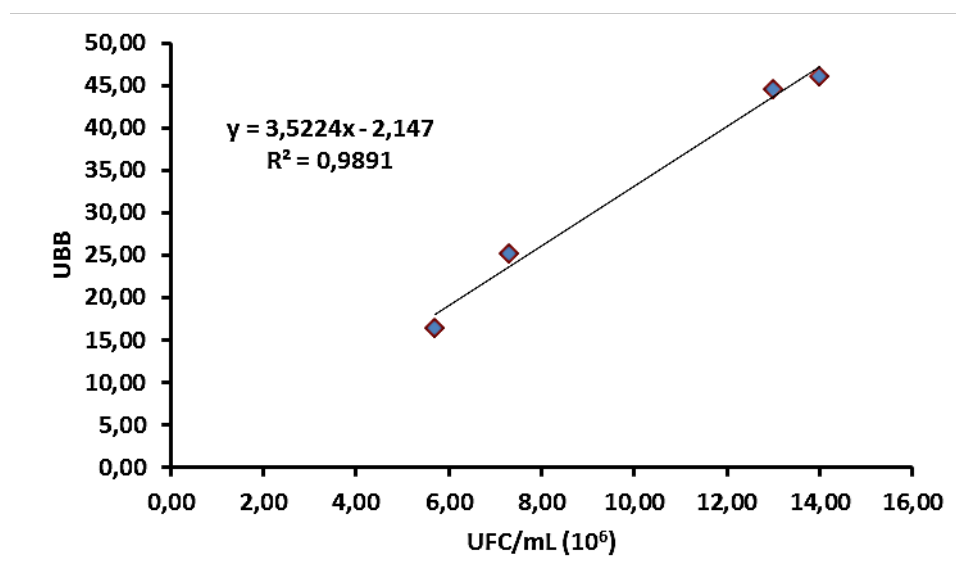
* $p < 0,005$ vs biofilm no tratado; [#] $p < 0,005$ irradiación vs. Oscuridad.

Estos resultados demuestran que **AQ1** es más activa que **AQ2** sobre los biofilms de *C. tropicalis*. Esta AQ requiere una concentración menor que **AQ2** para producir una significativa reducción del biofilm (SupraCIMf): 3,92 µg/mL sobre cepa clínica y 1,96 µg/mL sobre cepa de referencia.

Por su parte, AMB sólo fue activa a la CIM (0,5 µg/mL), produciendo una reducción de 2,5 veces sobre ambas cepas, sin observarse efecto de la luz. Por lo tanto, sobre la cepa clínica, **AQ1** y **AQ2** a la concentración más baja ensayada (SubCIMf), logran una mayor reducción de las UBB que AMB (4,6 y 3,8 veces vs. 2,5 veces). Estos resultados demuestran que bajo irradiación, **AQ1** es más activa que **AQ2** al producir similar nivel de reducción con menos concentración (0,98 µg/mL vs. 15,65 µg/mL); y a su vez, a esa concentración, genera una mayor reducción que AMB (4,6 veces vs 2,5 veces). Sobre la cepa de referencia, solo **AQ1** alcanza una reducción similar a AMB, pero a una concentración mayor (1,96 µg/mL vs 0,5 µg/mL) (Marioni *et al.*, 2016b).

Para demostrar que la disminución en la biomasa obtenida por el ensayo de CV se corresponde con una inactivación del biofilm, se realizó correlación entre el ensayo de CV y UFC/mL. Se observó que las UBB fueron proporcionales a las UFC, demostrando que hubo fotoinactivación del biofilm tratado con las AQs (Fig. 4.12).

Figura 4.12 Correlación entre Cristal Violeta (CV) y UFC/mL



En función de los resultados obtenidos, se observó que la concentración de antifúngico necesaria para disminuir un 50 % las UBB en el biofilm de la cepa de referencia (CIMS-50) fue de 1,23 µg/mL para **AQ1** y 15,6 µg/mL para **AQ2**. Este efecto fue mayor en los biofilms de la cepa clínica, logrando una reducción del 80 % a la misma concentración para **AQ2** (15,6 µg/mL = CIMS-80) y a una menor concentración para **AQ1** (0,98 µg/mL = CIMS-80) (Marioni *et al.*, 2016b).

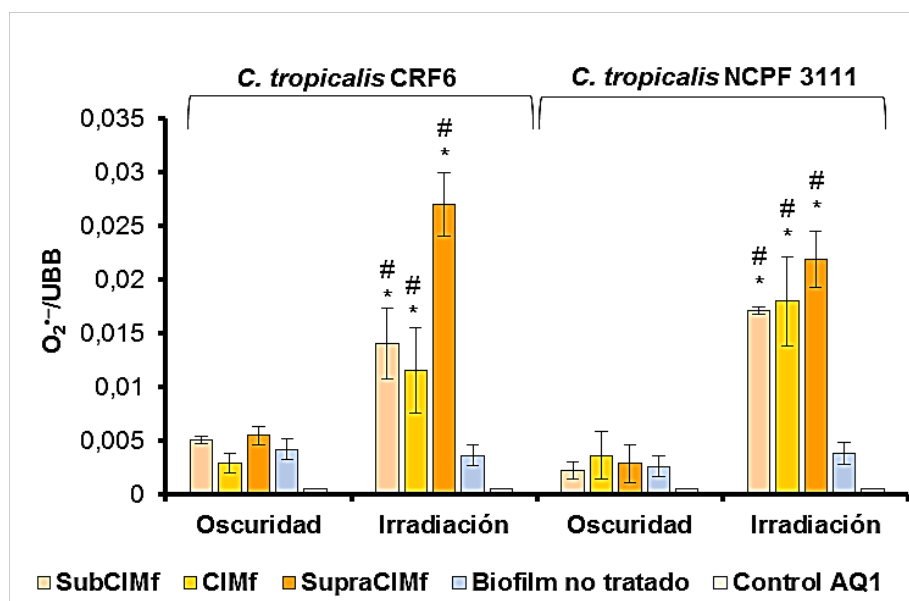
Como las propiedades fotosensibilizantes implican la generación de ERO (Núñez Montoya *et al.*, 2005), esto se evaluó como un factor determinante para

modificar la homeostasis del biofilm. La homeostasis redox tiene un rol fundamental en la supervivencia de las células, aquellas situaciones que provocan un desequilibrio entre la producción de ERO y los niveles de defensas antioxidantes pueden afectar el crecimiento microbiano y la viabilidad microbiana (Mishra y Imlay, 2012; Peralta *et al.*, 2015). Aunque las respuestas adaptativas contra el estrés oxidativo causado por esta sobreproducción de ERO han sido ampliamente estudiados en las células planctónicas, se sabe relativamente poco acerca de las respuestas del biofilm (Arce Miranda *et al.*, 2011; Angel Villegas *et al.*, 2013; Angel Villegas *et al.*, 2015; Peralta *et al.*, 2016) y la base de esta resistencia adquirida aparente se desconoce en la actualidad.

IV.6.3- Efecto de rubiadina sobre la generación de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno en el biofilm

Bajo las condiciones de experimentación (oscuridad e irradiación, a las tres concentraciones ensayadas), la generación de ERO se evaluó midiendo la producción de $O_2^{\bullet-}$ (principal precursor de las demás ERO) a través del ensayo de NBT. La producción de ERN se estudió midiendo indirectamente la formación de NO^{\bullet} con el reactivo de Griess.

Figura 4.13 Producción de $O_2^{\bullet-}$ en biofilms de *C. tropicalis* tratados con rubiadina (AQ1) en oscuridad e irradiación.

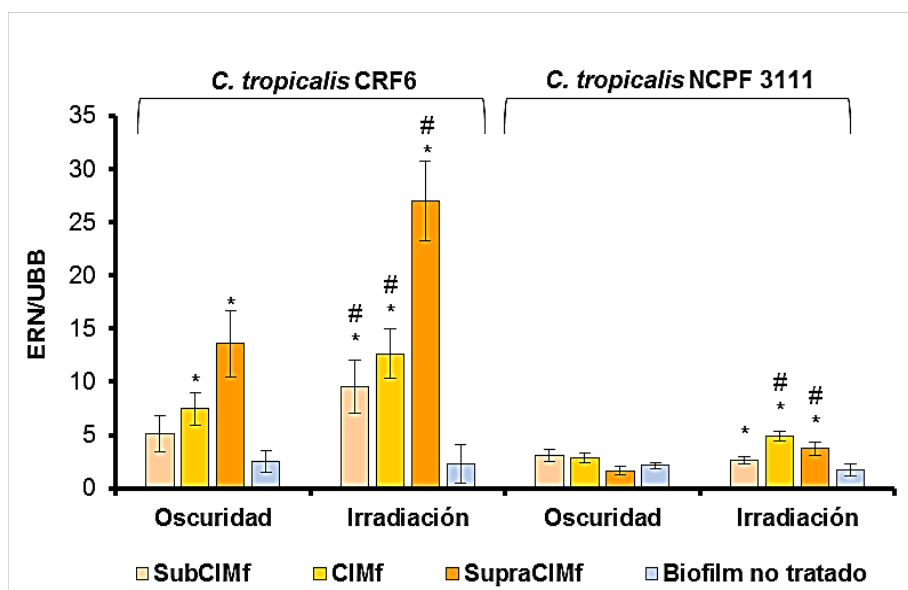


* $p < 0.005$ vs biofilm no tratado; # $p < 0.005$ irradiación vs. oscuridad. Expresada como $O_2^{\bullet-}$ /UBB.

Bajo irradiación, la producción de $O_2^{\bullet-}$ se incrementó significativamente en ambas cepas ($\#p < 0,005$) tratadas con **AQ1**. La mayor producción de $O_2^{\bullet-}$ se generó a la SupraCIMf respecto al biofilm no tratado ($*p < 0,005$) (Fig. 4.13), concentración que produce la mayor reducción del biofilm de ambas cepas (Tabla 4.16).

Dado que se ha demostrado previamente que las ERN promueven la muerte celular y la dispersión del biofilm, se midió la generación de las mismas (Arce Miranda *et al.*, 2011; Barraud *et al.*, 2009). La Fig. 4.14 muestra un aumento de los niveles de ERN en el biofilm de la cepa clínica tratado con **AQ1**, en ambas condiciones experimentales (oscuridad y luz) respecto al control ($*p < 0,005$). Se observó que los niveles de ERN fueron dependientes de la concentración de la AQ. Si bien el aumento de las ERN se produjo tanto en oscuridad como bajo la acción de la luz, en ésta última condición el incremento fue más significativo ($\#p < 0,005$). Por otro lado, en el biofilm de la cepa de referencia, sólo hubo un leve aumento en los niveles de ERN cuando fue irradiado en presencia de **AQ1**, específicamente a la CIM y SupraCIM fotoactivas.

Figura 4.14 Producción de ERN en biofilms de *C. tropicalis* tratados con rubiadina (**AQ1**) en oscuridad e irradiación.



* $p < 0.005$ vs biofilm no tratado; $\#p < 0.005$ irradiación vs. oscuridad. Expresada como ERN/UBB.

Estos resultados explicarían el mayor efecto de **AQ1** sobre la cepa clínica (alrededor del 82 %R a la SupraCIMf), ya que no sólo se observa un incremento de ERO (mediadas por $O_2^{\bullet-}$), sino también un importante aumento de las ERN (mediado por NO^{\bullet}), lo cual es menor sobre la cepa de referencia.

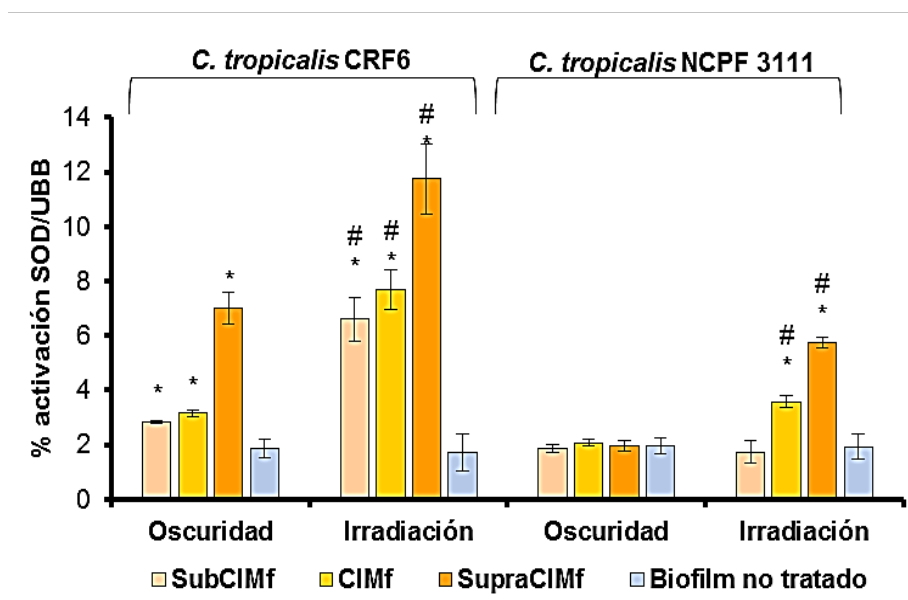
Esto indicaría que **AQ1** generaría estrés oxidativo y nitrosativo sobre el biofilm de la cepa clínica, mientras que sobre la cepa de referencia el estrés oxidativo

predomina sobre el nitrosativo. Como ya se explicó para el extracto bioactivo, una sobreproducción de $O_2^{\bullet-}$ estimula la producción de NO^{\bullet} , especialmente bajo irradiación. Así, el NO^{\bullet} actúa como secuestrante de esta ERO para producir $ONOO^{\bullet}$, una especie altamente reactiva del nitrógeno, a través de una reacción radicalaria más rápida que la reacción enzimática mediada por SOD (Brown *et al.*, 2009; Powers *et al.*, 2011, Marioni *et al.*, 2016b).

IV.6.4- Efecto de rubiadina sobre mecanismos antioxidantes: activación de la enzima SOD y capacidad antioxidante total del biofilm

Se observó una estimulación de la actividad de la enzima SOD cuando los biofilms fueron tratados con **AQ1** bajo irradiación, la cual fue dependiente de la concentración en ambas cepas (Fig. 4.15). En el biofilm de la cepa clínica, se observó estimulación de la activación de la enzima en oscuridad, así como bajo irradiación ($*p < 0,005$). De forma que en oscuridad, esta activación enzimática parecería ser suficiente para contrarrestar el aumento en la producción de $O_2^{\bullet-}$.

Figura 4.15 Activación de la SOD en biofilms de *C. tropicalis* tratados con rubiadina (AQ1) en oscuridad e irradiación.



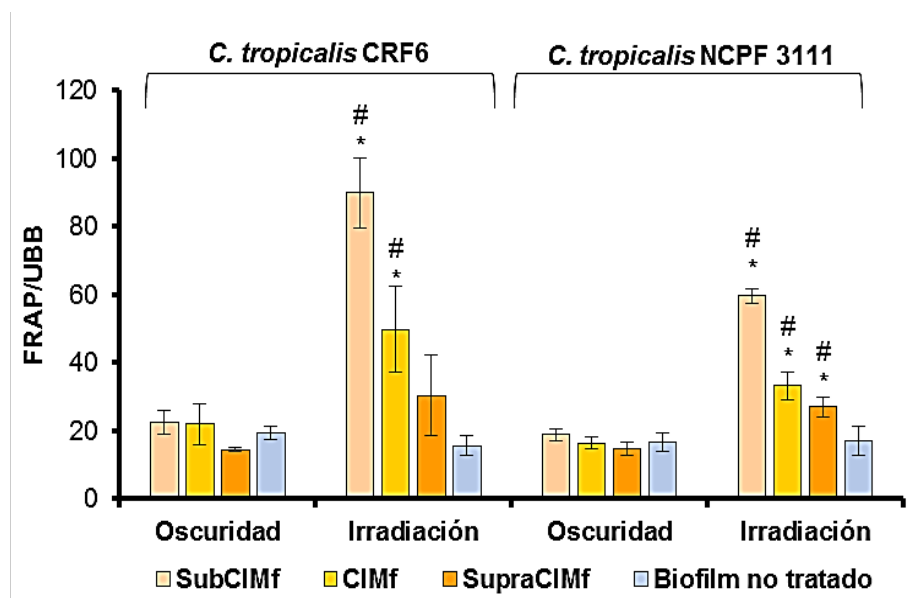
* $p < 0.005$ vs biofilm no tratado; # $p < 0.005$ irradiación vs. oscuridad. Expresada como % activación SOD/UBB.

Bajo irradiación, se observa que la actividad de la SOD fue alta en respuesta a los grandes niveles de $O_2^{\bullet-}$ mostrados anteriormente en la Fig. 4.13, en particular a la SupraCIMf por acción de la luz. En cambio, la actividad enzimática en el biofilm de

C. tropicalis NCPF 3111 se estimuló solamente bajo irradiación, mostrando que la cepa clínica tuvo mejor respuesta antioxidante. Sin embargo, esta activación de la SOD, no sería suficiente para disminuir los niveles de $O_2^{\bullet-}$ generados en la Fig. 4.13.

Además, mediante el ensayo FRAP se evaluó la capacidad antioxidante total del biofilm, tanto enzimática como no enzimática. En los biofilms (cepa clínica y de referencia) tratados con **AQ1**, la capacidad antioxidante solamente se vio incrementada por la acción de luz respecto al control (Fig. 4.16). Además, se observó que a mayores concentraciones de **AQ1**, más bajos son los niveles de FRAP en ambas cepas, probablemente debido a los altos niveles de metabolitos oxidativos y nitrosativos bajo irradiación que no pudieron contrarrestar.

Figura 4.16 Activación de la capacidad antioxidante total en biofilms de *C. tropicalis* tratados con rubiadina (**AQ1**) en oscuridad e irradiación.



* $p < 0.005$ vs biofilm no tratado; # $p < 0.005$ irradiación vs. oscuridad. Expresada como FRAP/UBB.

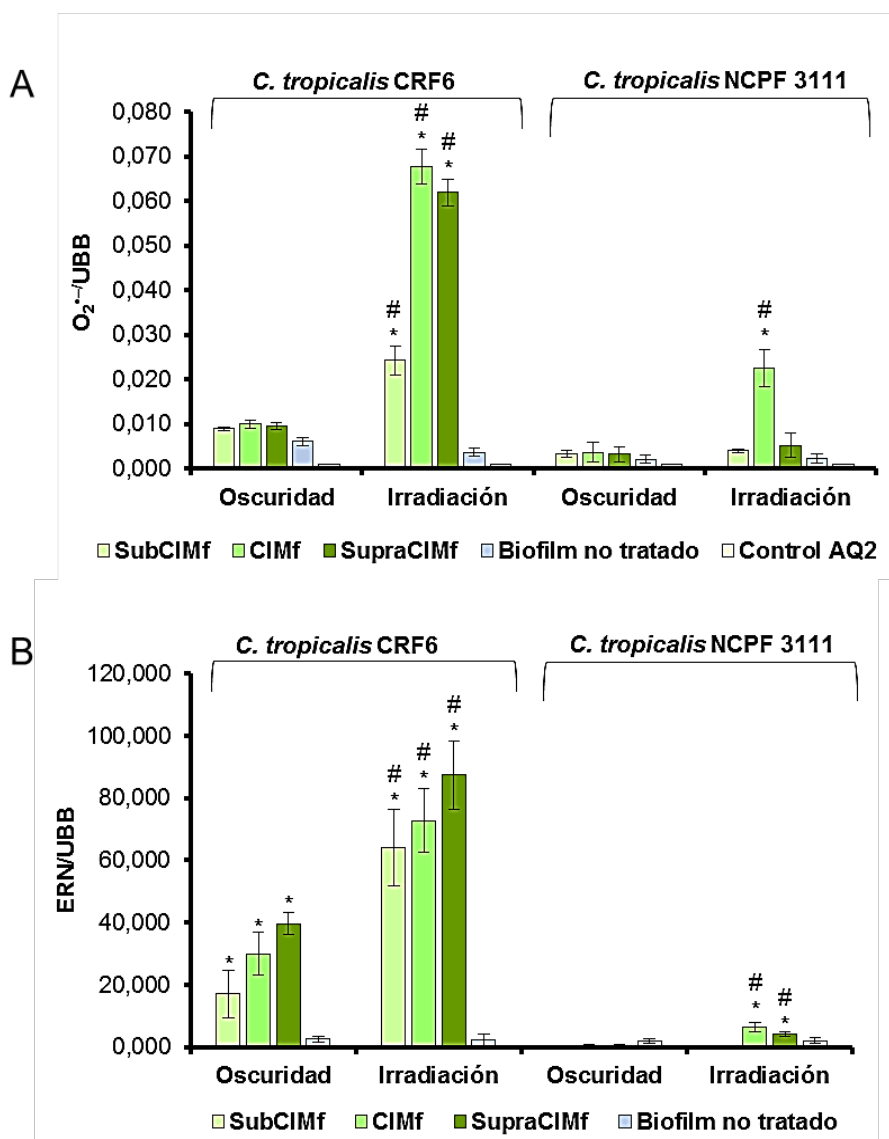
Por lo tanto, la capacidad antioxidante total del biofilm puede no ser suficiente para contrarrestar el estrés celular, lo que resulta en la reducción de las UBB aunque sin alcanzar su erradicación completa por desbalance oxidativo.

IV.6.5- Efecto de 1-metil éter de rubiadina sobre el estrés celular: Desbalance oxidativo y nitrosativo.

AQ2 presentó un comportamiento similar a **AQ1** sobre la producción de $O_2^{\bullet-}$, especialmente a las concentraciones activas en cada cepa. Así, para **AQ2** el mayor

incremento de esta ERO se observó a la CIMf en ambas cepas (Fig. 4.17 A), y este valor se mantuvo a la SupraCIMf en la cepa clínica, coincidiendo que estas concentraciones son las más activas sobre los biofilms de la cepa clínica (Tabla 4.16).

Figura 4.17 (A) Producción de $O_2^{\cdot-}$ en biofilms de *C. tropicalis* tratados con 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) en oscuridad e irradiación. **(B)** Producción de ERN en biofilms de *C. tropicalis* tratados con **AQ2** en oscuridad e irradiación.



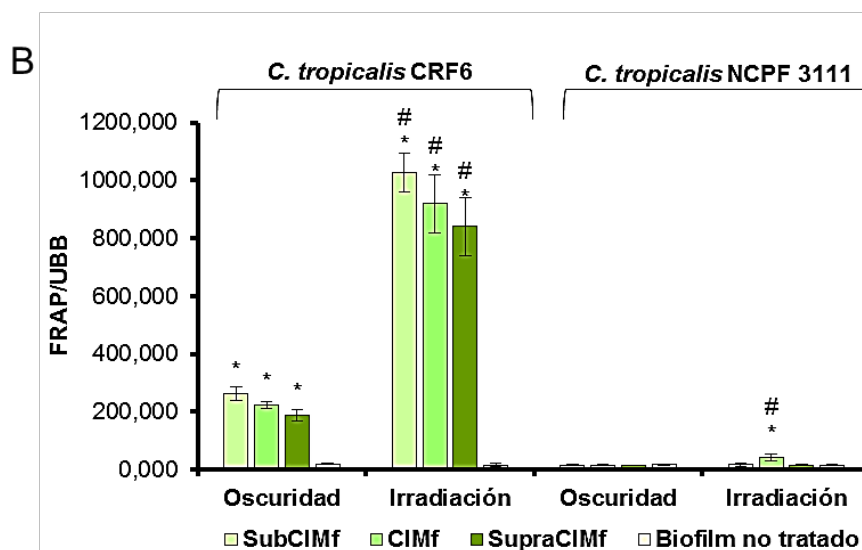
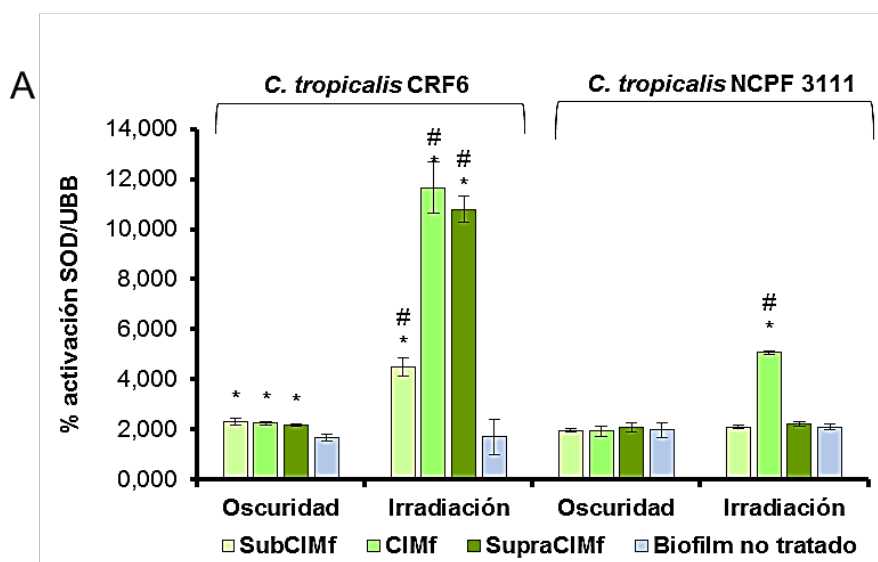
* $p < 0.005$ vs biofilm no tratado; # $p < 0.005$ irradiación vs. oscuridad. (A) Expresada como $O_2^{\cdot-}$ /UBB. (B) Expresada como ERN/UBB.

En cuanto a los niveles de ERN, la Fig. 4.17 B muestra un aumento de éstos en el biofilm de la cepa clínica tratado con **AQ2**, en oscuridad y luz respecto al control (* $p < 0,005$). De la misma forma que para **AQ1**, los niveles de ERN fueron dependientes de la concentración de AQ y bajo la acción de la luz, su incremento fue mayor (# $p < 0,005$). Además, en el biofilm de la cepa de referencia, sólo hubo un leve aumento en los niveles de ERN cuando fue irradiado en presencia **AQ2**,

específicamente a la CIMf fotoactivas. Al igual que para **AQ1**, esto explicaría el mayor efecto de **AQ2** sobre la cepa clínica, donde se observó tanto estrés oxidativo como nitrosativo.

Por otra parte, cuando se estudiaron los sistemas de defensa, **AQ2** generó una leve activación de la SOD en oscuridad cuando el biofilm de la cepa clínica fue tratado con esta AQ (Fig. 4.18 A). Este efecto fue potenciado por la acción de la luz ($p < 0,005$) y se correspondería con los niveles de $O_2^{\bullet-}$ mostrados bajo esta condición.

Figura 4.18 (A) Activación de la SOD en biofilms de *C. tropicalis* tratados con 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) en oscuridad e irradiación. **(B)** Activación de la capacidad antioxidante total en biofilms de *C. tropicalis* tratados con **AQ2** en oscuridad e irradiación.



* $p < 0.005$ vs biofilm no tratado; # $p < 0.005$ irradiación vs oscuridad. (A) Expresada como % activación SOD/UBB. (B) Expresada como FRAP/UBB.

En el biofilm de la cepa de referencia, la activación de la SOD sólo ocurrió bajo irradiación a la CIMf, la concentración que resultó activa (Tabla 4.16) y que incrementó los niveles de $O_2^{\bullet-}$ (Fig. 4.18 A).

Además, cuando se estudió la estimulación de la capacidad antioxidante total por **AQ2**, se observó que en el biofilm de la cepa clínica hubo una estimulación en oscuridad, aumentada notablemente con la irradiación (Fig. 4.18 B). Al igual que **AQ1** la activación del sistema antioxidante total fue menor a mayor concentración de la AQ y mayor incremento de las ERO y ERN. Por otro lado, en el biofilm de la cepa de referencia, la capacidad antioxidante sólo se estimuló levemente en irradiación a la CIM, lo que se corresponde con el efecto antibiofilm y el desbalance redox mostrado.

Los resultados obtenidos para **AQ2** también se traducen en una reducción del biofilm que en función de la activación de los sistemas antioxidante no permitió la erradicación de los biofilms, necesitando en el caso de esta AQ mayor concentración que **AQ1** para obtener un efecto similar.

En los biofilms tratados con cada una de las AQs, la producción de $O_2^{\bullet-}$ se incrementó significativamente en ambas cepas bajo irradiación, lo que confirma su acción fotosensibilizante sobre el biofilm. Se observó una diferencia significativa entre las condiciones de oscuridad y de irradiación, con una menor producción de metabolitos de estrés en oscuridad. Cabe notar que ninguna de las **AQs** en solución de CSG y en ausencia de biofilm (Control AQ), produjo incremento de $O_2^{\bullet-}$ en presencia de irradiación. Además, como respuesta a este estrés oxidativo, los niveles de SOD aumentaron significativamente, en particular bajo irradiación.

Por otro lado, el estrés nitrosativo se produce cuando la producción de NO^{\bullet} u otra ERN, aumenta en cantidades importantes. El NO^{\bullet} reacciona con el oxígeno, el $O_2^{\bullet-}$ y agentes reductores para generar otros productos generadores de eventos tóxicos, ya que si sobrepasan la capacidad de la célula para eliminarlos, producen daño irreversible en varios componentes celulares (Hughes, 2008). Se demostró que el biofilm de la cepa clínica genera mayores niveles de NO^{\bullet} respecto al de la cepa de referencia, siendo con **AQ2** más notable esta respuesta (Cuéllar-Cruz *et al.*, 2014). Esto podría estar relacionado con la menor capacidad antioxidante total determinada por FRAP a las concentraciones más activas en este biofilm, ya que otras investigaciones en células eucariotas han indicado que el agotamiento químico de las defensas antioxidantes aumentó significativamente la citotoxicidad del NO^{\bullet} . Además,

altos niveles de defensas antioxidantes no enzimáticas son críticas para la protección celular contra los efectos de las ERN (Ridnour *et al.*, 2004).

Por lo tanto, fue necesario considerar varios factores para comprender el desequilibrio redox en los biofilms de *C. tropicalis*, específicamente para contrarrestar el estrés oxidativo y nitrosativo generado por las AQs. De esta manera, una posible disminución en los niveles de FRAP se estudió como otro factor involucrado en el desequilibrio. Así, el efecto antibiofilm de las AQs podría explicarse por el desequilibrio redox, el cual interfiere en el crecimiento celular y la viabilidad en el interior de los biofilms, desencadenado por la acción de la luz.

IV.6.6- Cuantificación de la biomasa del biofilm y de la producción de especies reactivas del oxígeno intracelular por MCEL

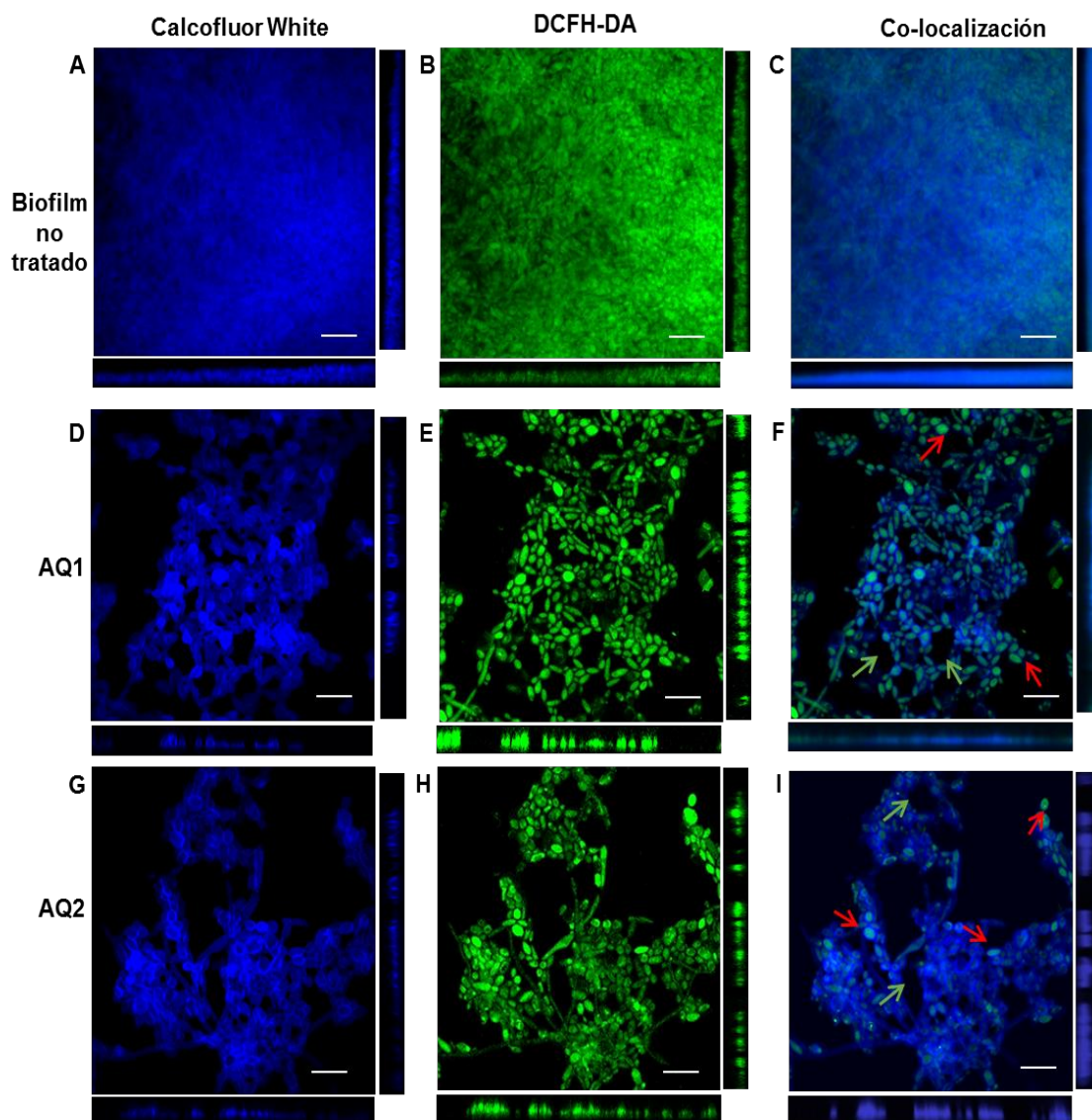
La estructura tridimensional del biofilm se estudió por MCEL, metodología que permitió además cuantificar el espesor del biofilm de *C. tropicalis* tratado con cada AQ, en comparación con el biofilm no tratado. Además, se determinó las ERO generadas en el interior del biofilm.

En las imágenes de MCEL (Fig. 4.19 A, D y G), tanto para los ejes XY (arriba) y XZ (parte inferior), las células sésiles del biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 se tiñeron con Calcofluor-White (azul).

Mediante esta metodología, se evaluó la acción de cada AQ sobre el biofilm, ensayadas a las concentraciones que resultaron más activas bajo irradiación. Se observó que el espesor del biofilm se redujo un 68,8 % por acción de **AQ1** (SupraCIM) (Fig. 4.19 D), y un 53 % por acción de **AQ2** (CIM) (Fig. 4.19 G) en comparación con el control (Fig. 4.19 A, Tabla 4.17). Estos valores fueron similares a los obtenidos por tinción con CV, expresados como reducción de UBB, en donde **AQ1** generó un $63,5 \pm 4,5$ % y **AQ2** un 47 ± 10 % de reducción (Tabla 4.16).

Además, se observó que la rugosidad del biofilm se estaría afectada por el tratamiento por las AQs respecto al control, lo cual muestra una leve heterogeneidad de la biomasa respecto al biofilm no tratado (Tabla 4.17).

Figura 4.19 Imágenes de MCEL de biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 tratados con rubiadina (**AQ1**) y 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) bajo irradiación, incluyendo la visualización de ERO intracelular



El canal azul muestra la tinción de la pared de células sésiles con Calcofluor-White (**A, D y G**); el canal verde muestra la oxidación de la sonda DCFH como un indicador de la producción de ERO dentro del biofilm (**B, E y H**). Co-localización de los dos canales (**C, F e I**). Magnificación 60x y escala 10 μ m. Representativa de 20 campos.

La producción de ERO se observó dentro de las células sésiles, resultando en una alta intensidad de fluorescencia del DCF en los biofilms tratados con **AQ1** y **AQ2** bajo irradiación (Fig. 4.19 E y H, respectivamente), en comparación con el biofilm no tratado (basal) (Fig. 4.19 B). En las Fig. 4.19 C, F e I, se observa la superposición de los dos canales, la tinción de la pared de células sésiles con Calcofluor-White (A, D y G) y la oxidación de la sonda DCFH como un indicador de la producción de ERO dentro del biofilm (B, E y H), cuando las imágenes se fusionaron en una sola imagen de dos colores.

Tabla 4.17: Análisis COMSTAT de biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 tratados con rubiadina (**AQ1**) y 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**).

	AQ1	AQ2	Biofilm no tratado
Biomasa ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)	9,12 \pm 0,40	13,7 \pm 0,4	29,1 \pm 0,7
Coefficiente de rugosidad	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,10	1,0 \pm 0,1
Distribución del espesor (μm)	9,03 \pm 0,40	12,14 \pm 0,40	27 \pm 1

Midiendo las intensidades de fluorescencia de DCF (verde), en función de las células sésiles, se cuantificó la generación de ERO. Este análisis cuantitativo, muestra que ambas AQs incrementaron las ERO dentro de las células, bajo la acción de la luz. Se estableció que la generación de ERO para **AQ1** fue 3 veces mayor respecto al control y 1,5 veces para **AQ2** (Tabla 4.18).

Tabla 4.18: Cuantificación de las ERO intracelular en biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 tratados con rubiadina (**AQ1**) y 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**), expresado en intensidad relativa de fluorescencia.

	Oscuridad	Luz
Biofilm no tratado	0,4 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1
AQ1	0,4 \pm 0,1	1,2 \pm 0,2*#
AQ2	0,41 \pm 0,07	0,60 \pm 0,01*#

* $p < 0.005$ vs biofilm no tratado; # $p < 0.005$ irradiación vs. oscuridad.

IV.6.7- Generación de oxígeno singlete por antraquinonas en solución

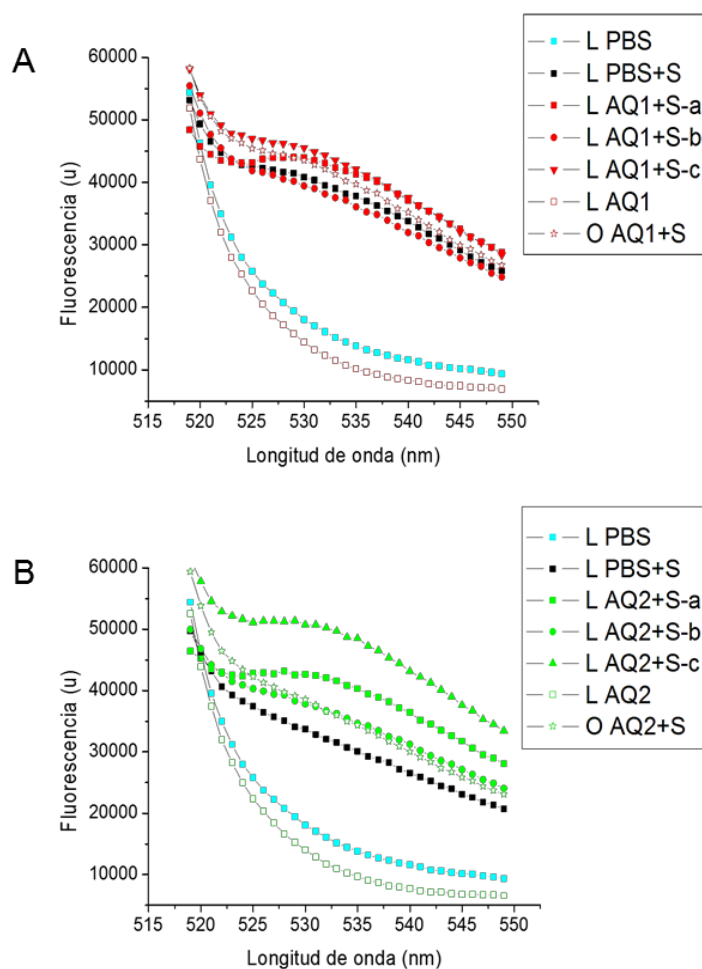
Con el objetivo de estudiar si las AQs ensayadas poseen la propiedad de generar $^1\text{O}_2$ cuando son irradiadas, se utilizó la sonda SOSG. Cada AQ se ensayó a la concentración que resultó más activa sobre el biofilm de *C. tropicalis* NCPF 3111.

En la Fig. 4.20 se muestra la generación de $^1\text{O}_2$ para **AQ1** (Supra CIMf) y para **AQ2** (CIMf) en soluciones de PBS ($n = 3$). Se puede observar que la SOSG en PBS cuando es irradiada reacciona con el $^1\text{O}_2$ del medio, produciendo emisión fluorescente que se tomó como control basal. El medio usado para disolver la sonda y las AQS (PBS) no tuvo emisión al ser irradiado. En cuanto a los controles de cada AQ, se determinó que cada AQ sin sonda e irradiada no emitió fluorescencia; mientras que el control en oscuridad de cada AQ con sonda fue similar a la curva obtenida por la

sonda irradiada. Esto último demuestra que cuando cada AQ no es irradiada en presencia de la sonda, se obtiene la curva del control basal. Al comparar la fluorescencia de cada AQ en presencia de sonda e irradiación, se estableció que la generación de 1O_2 de **AQ1** a 0,98 $\mu\text{g/mL}$ fue despreciable ($0,7 \pm 0,4$), mientras que con **AQ2** a 15,6 $\mu\text{g/mL}$ fue levemente mayor ($0,9 \pm 0,3$). Sin embargo, se puede ver que en estas condiciones no son grandes generadoras de 1O_2 . El uso de perinaftena (PN) como control positivo produjo 100 veces más respecto a la sonda.

Estos resultados muestran que la generación de 1O_2 por ambas AQs bajo irradiación es muy baja en PBS, destacándose **AQ2**. Por lo tanto, la posibilidad que este mecanismo fotosensibilizante actúe sobre el biofilm es también baja.

Figura 4.20 Generación de de 1O_2 por AQs: **(A)** rubiadina (**AQ1**) a 1,96 $\mu\text{g/mL}$ y **(B)** 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) a 15,6 $\mu\text{g/mL}$ en solución de PBS (concentraciones que resultaron más activas sobre biofilms).



L PBS: PBS irradiado; L PBS+S: Sonda en PBS irradiada (basal); L AQ1/AQ2+S: tres mediciones (a, b y c) de cada AQ en PBS irradiada con sonda; L AQ1/AQ2: cada AQ en PBS irradiada sin sonda; O AQ1/AQ2+S: cada AQ en PBS con sonda y en oscuridad

IV.6.8- Incorporación de antraquinonas en biofilms de *Candida*

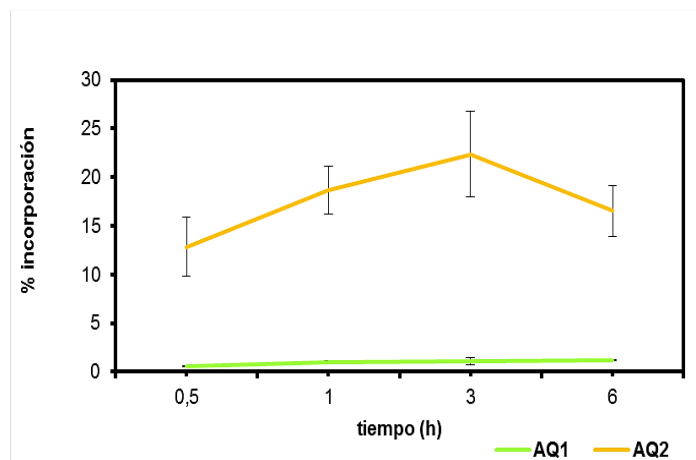
Para estudiar si las AQs ensayadas pueden o no incorporarse al modelo de biofilm utilizado, y estimar además, el porcentaje de las mismas que puede acumularse en esta estructura, se utilizó el método de HPLC previamente descrito y validado. Se eligió esta metodología porque estas AQs han demostrado tener bajo rendimientos cuánticos de fluorescencia en CHCl_3 (Comini *et al.*, 2007).

Las AQs se adicionaron en el biofilm en exceso para no limitar el proceso de incorporación por falta de compuesto en el medio; y su vez, garantizar la detección y cuantificación de cada AQ incorporada al biofilm por el método de HPLC. Teniendo en cuenta la concentración más activa de cada AQ sobre el biofilm de *C. tropicalis* NCPF 3111 (SupraCIMf para **AQ1** y CIMf para **AQ2**), se probaron concentraciones superiores a éstas. Así, **AQ2** se ensayó a 30 $\mu\text{g/mL}$ (2 veces CIMf). En cambio, utilizar el doble de la concentración más activa de **AQ1**, resultaba un valor muy bajo (3,92 $\mu\text{g/mL}$), que al incorporarse al biofilm podía no ser detectado por el método (LOQ = 0,43 $\mu\text{g/mL}$). Por lo tanto, **AQ1** se ensayó a 10 $\mu\text{g/mL}$ (5 veces SupraCIMf). De modo que la acumulación de cada AQ no está limitada por la cantidad inicial agregada; y lo que se incorpora en función del tiempo, se debe a las características lipofílicas de cada AQ y a los mecanismos presentes en el biofilm que posibilitan su acumulación. Estas concentraciones en oscuridad no mostraron actividad antibiofilm *in vitro* durante el período ensayado ($45,16 \pm 2,25$ UBB).

La Fig. 4.21 muestra el porcentaje de incorporación de cada AQ al biofilm, en función del tiempo ensayado. Se estableció que **AQ2** presenta un máximo de incorporación a las 3 h de incubación de $22,4 \pm 4,4\%$, mientras que **AQ1** tiene un bajo porcentaje de acumulación ($1,22 \pm 0,01\%$) hasta las 6 h de incubación.

Esta diferencia observada se debería a que **AQ2** es un compuesto con menor polaridad que **AQ1**, debido a la metilación del grupo OH en posición 1- de rubiadina (Fig. 1.6 en Introducción). Previamente, se ha demostrado la naturaleza no polar de ambas AQs, con valores de LogP de 2,26 para **AQ1** y 2,83 para **AQ2** (Comini *et al.*, 2006). La comparación de estos valores con el valor de LogP de metoprolol, una droga que posee una alta permeabilidad en membranas (95 %) (Kasim *et al.*, 2003), permitió categorizar estos compuestos como fármacos altamente permeables. Si bien, las 2 AQs usadas en este trabajo, tendrían una elevada posibilidad de atravesar membranas biológicas; **AQ2** presentó mayor facilidad para ingresar a la fase lipofílica del biofilm por difusión pasiva.

Figura 4.21 Porcentaje de incorporación en biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 de rubiadina (**AQ1**) y 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) en función del tiempo.



Conocer el porcentaje máximo de incorporación de los compuestos en el biofilm y el tiempo en que se alcanza éste es importante para establecer el momento oportuno en el cual la irradiación tendría un mayor efecto estimulante sobre el FS (Rezusta *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2013). Así, mediante este ensayo se determinó el tiempo requerido por las AQs para alcanzar su máxima incorporación en el biofilm (6h para **AQ1** y 3h para **AQ2**). Esto permite diseñar un tratamiento de irradiación para mejorar la fotoinactivación.

IV.7- ACCIÓN FOTOSENSIBILIZANTE *IN VITRO* DE ANTRAQUINONAS NATURALES SOBRE BIOFILM DE *C. tropicalis*

Con los experimentos realizados, se demostró que las AQs aisladas de *H. pustulata*, **AQ1** y **AQ2**, poseen actividad antifúngica sobre biofilms de *C. tropicalis* sólo si la luz actúa como promotor (Marioni *et al.*, 2016b). Estas AQs producen fotoinactivación del biofilm a través de un desbalance oxidativo que es consecuencia de la producción excesiva de ERO, generadas por mecanismos fotosensibilizantes.

Es conocido que en todo proceso fotodinámico, el FS en estado excitado (en este caso la AQ*), puede interaccionar con el oxígeno molecular a través de reacciones de transferencia de electrones y/o hidrógenos (mecanismo fotosensibilizante Tipo I) para generar $O_2^{\bullet-}$, y/o procesos de transferencia de energía (mecanismo fotosensibilizante Tipo II) produciendo 1O_2 . Se demostró que la fotoactivación de estas AQs, resulta en una elevada producción de $O_2^{\bullet-}$ (fotosensibilización Tipo I) que estimula las defensas antioxidantes del biofilm, las cuales a su vez no son suficientes para contrarrestar las ERO generados. Así, se produjo un desbalance redox que sería el responsable de la reducción observada en la biomasa del biofilm (Marioni *et al.*, 2016b).

A pesar que previamente establecimos que **AQ2** en PBS, puede generar un leve incremento en los niveles 1O_2 medido por la SOSG (IV-6.7), no se podría afirmar que estas AQs generarían una concentración suficiente de esta ERO como para tener un efecto antifúngico sobre el biofilm a través de la fotosensibilización Tipo II.

Con el propósito de estudiar los mecanismos fotosensibilizantes de estas AQs sobre biofilms, especialmente el Tipo II, se realizaron una serie de experimentos que incluyen el estudio de algunas propiedades fotofísicas y fotoquímicas de estas AQs.

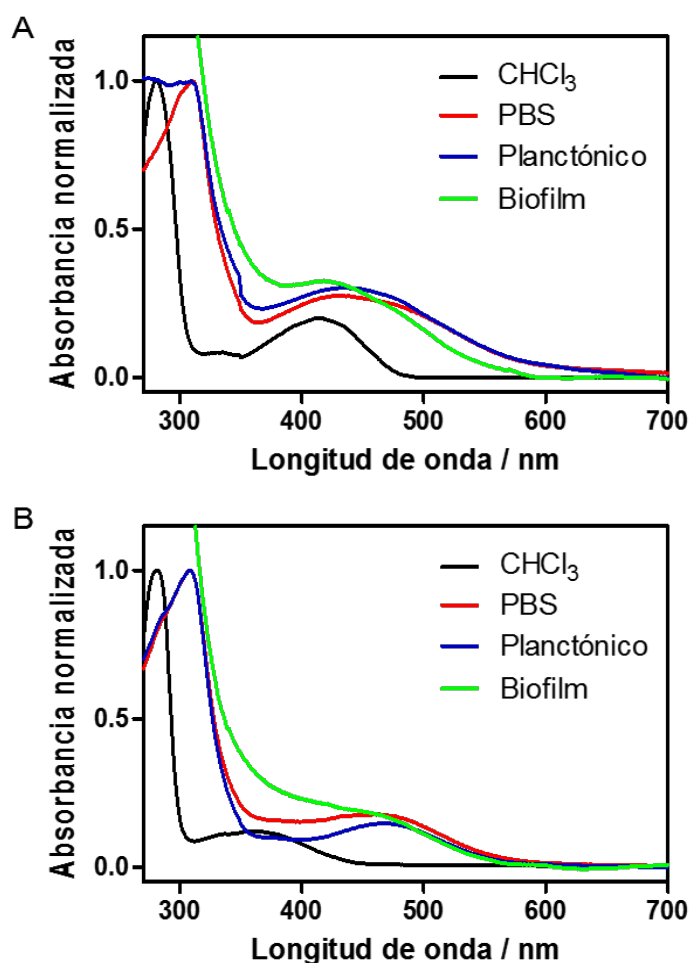
IV.7.1- Medidas espectroscópicas de antraquinonas

A- Espectros de absorción y fluorescencia

Se registraron los espectros de absorción de ambas AQs (56 μ M) en distintos medios: $CHCl_3$, PBS, en presencia de levaduras en estado plantónico ($\sim 10^3$ UFC/mL) y biofilms de *C. tropicalis* ($47,9 \pm 2,6$ UBB) (Fig. 4.22). Se eligió esta concentración porque la absorbancia en PBS fue de 0,2 a 355 nm, de manera que el mismo número de fotones es absorbido por las soluciones de ambas AQS, y en definitiva son estas concentraciones las que se ensayan sobre el biofilm.

Los espectros de absorción de las AQs en PBS y en levaduras en estado planctónico fueron similares, con bandas más anchas y corridas al rojo respecto al espectro de las AQs en CHCl_3 . Los corrimientos son más marcados para **AQ2**. Estos desplazamientos hacia al rojo son debido a la agregación de estas AQs en medio acuoso, siendo agregados de tipo J (producen desplazamientos batocrómicos) (Eisfeld & Briggs, 2006; Gouloumis *et al.*, 2006). Los espectros de las AQs en los biofilms mostraron comportamientos diferentes a los observados en CHCl_3 y PBS, lo cual indicaría que su interacción con el biofilm es preferentemente en zonas apolares, debido al carácter lipofílico de las AQs, y ésta localización favorecería la desagregación (Comini *et al.*, 2006; Gouloumis *et al.*, 2006).

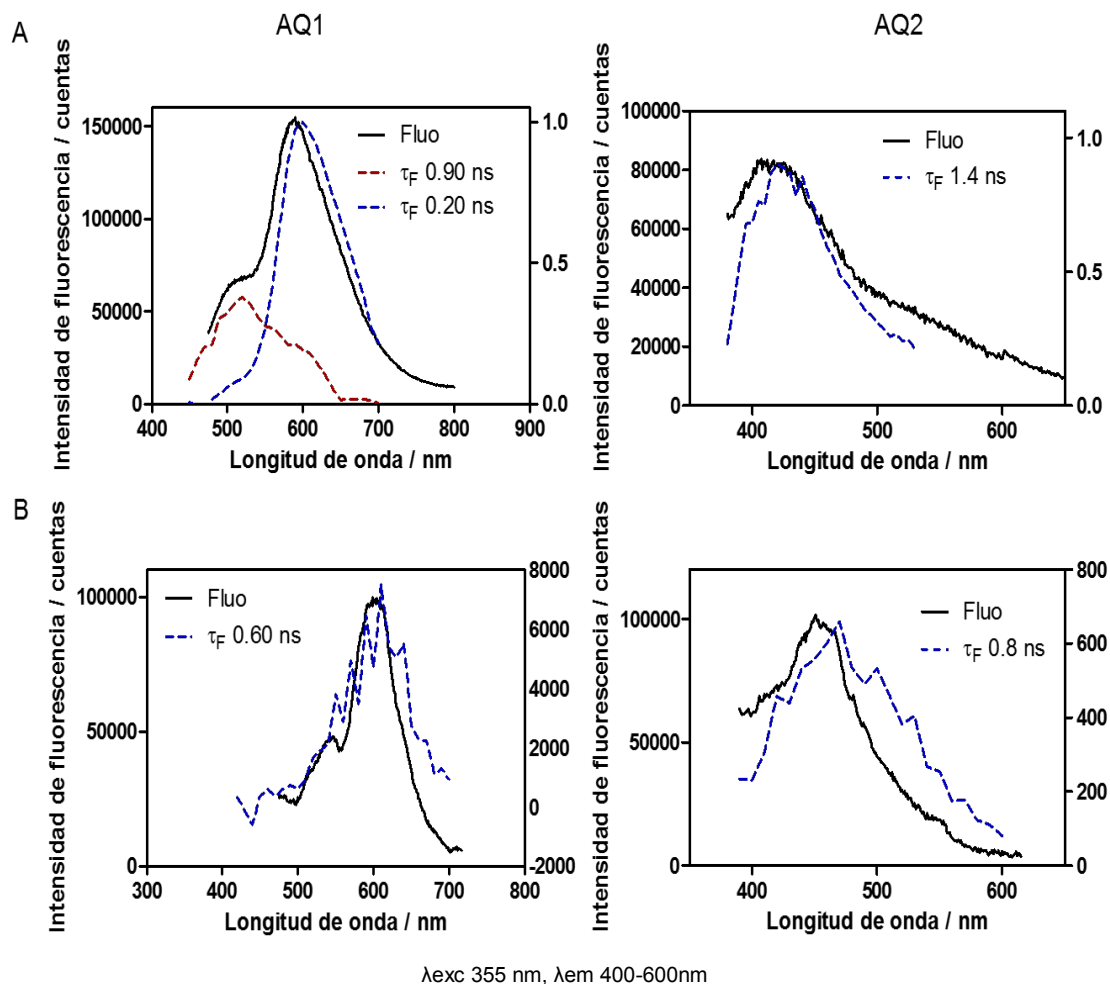
Figura 4.22 Espectros de absorción de AQs en CHCl_3 , PBS, *C. tropicalis* NCPF 3111 en estado planctónico y en biofilm: **(A)** rubiadina (**AQ1**) y **(B)** 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**).



Se registraron los espectros de fluorescencia para las AQs en CHCl_3 y PBS. Se observó que estas AQs son muy poco fluorescentes en estos medios (Fig. 4.23). Aun

así, se pudo determinar el tiempo de vida de fluorescencia de los estados singlete excitado ($^1AQ^*$) para cada una.

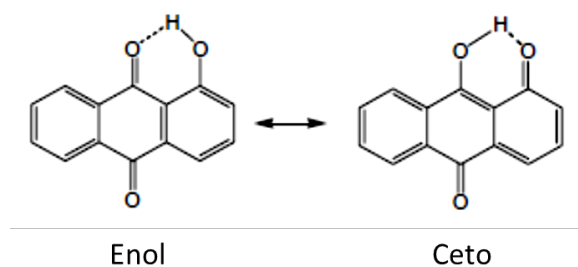
Figura 4.23 Espectros de emisión de fluorescencia de rubiadina (**AQ1**) y 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) en $CHCl_3$ (**A**) y en PBS (**B**).



Para **AQ1** en $CHCl_3$, se observa un decaimiento bi-exponencial, ya que mostró una componente corta de 0,2 ns con una contribución aproximadamente de 2/3 y una componente larga de 0,8 ns (contribución aproximadamente de 1/3) (Fig. 4.23). Esto indicaría que hay dos especies en el estado excitado que se debería a una transferencia intramolecular de protones (ESIPT), entre el grupo hidroxilo en posición 1- y el grupo ceto (Choi *et al.*, 2004). El primer decaimiento (alrededor de 450 nm) sería la fluorescencia del estado excitado de la AQ; y el segundo (alrededor de 600 nm) se debería probablemente a otra especie en estado excitado, en donde hay una transferencia de protón. Este decaimiento bi-exponencial no se observa para **AQ2** porque no es posible el equilibrio ceto-enólico al tener un grupo $-OCH_3$ en posición 1- (Fig. 4.24).

Además este ESIPT en **AQ1** se corrobora porque en PBS, la señal del tiempo de vida de mayor contribución desaparece, ya que en solvente prótico el equilibrio tautomérico está favorecido hacia la forma ceto, dado el puente hidrógeno se forma con el medio (Palit *et al.*, 1990; Smulevich *et al.*, 1987).

Figura 4.24 Proceso de transferencia intramolecular de protones en el estado excitado (ESIPT) de 1-hidroxi antraquinona.



Dados que se trata de compuestos débilmente fluorescentes, no fueron determinados sus rendimientos cuánticos.

Sabiendo que la *Candida* exhibe fluorescencia por si misma (Graham, 1983), estas mediciones no se realizaron en presencia de levaduras en estado planctónico y formando biofilms.

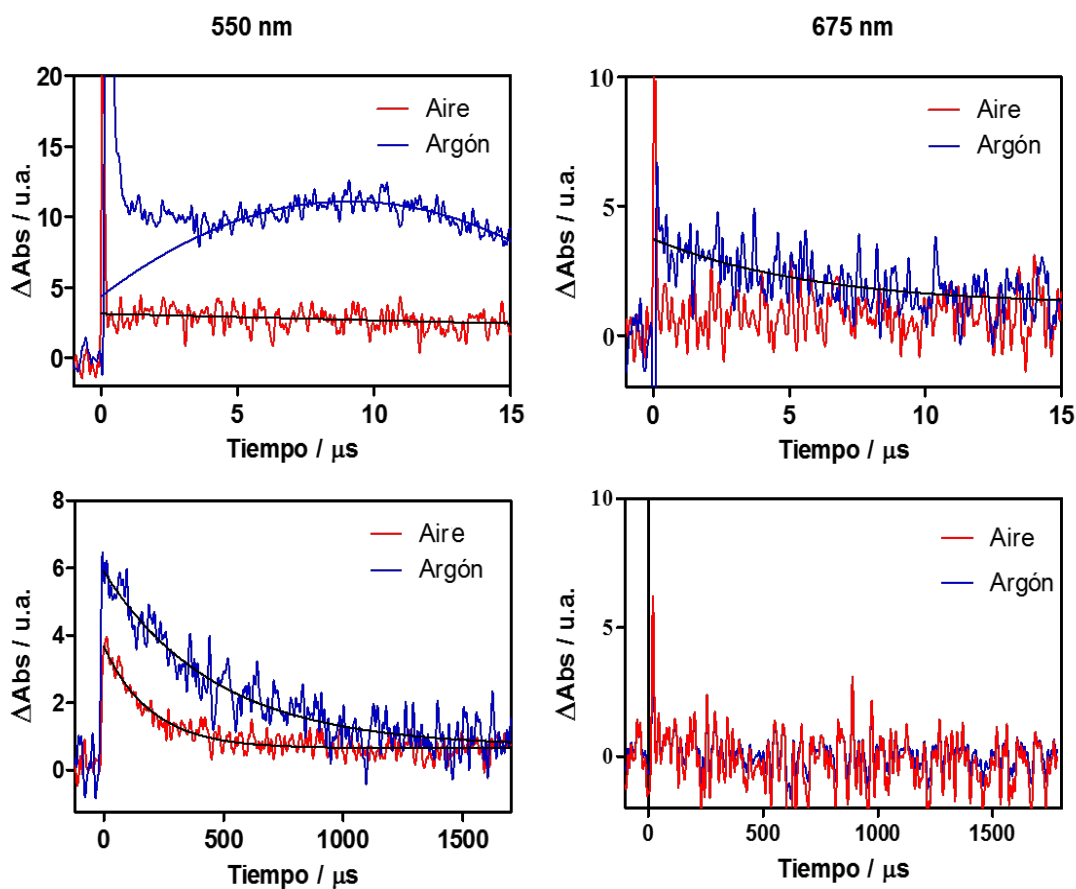
B- Absorción de estados transitorios

Mediante espectroscopia de absorción transitoria, se estudió la formación del estado triplete ($^3AQ^*$) y el anión radical ($AQ^{\bullet-}$) de cada AQ, en $CHCl_3$, PBS, levaduras en estado planctónico ($\sim 10^3$ UFC/mL) y formando biofilm ($47,9 \pm 2,6$ UBB). Las longitudes de onda correspondientes para detectar cada estado transitorio de las AQS fueron: 675 nm para $^3AQ^*$ y 550 nm para $AQ^{\bullet-}$ (Shida, 1998).

Para **AQ1** no fue posible detectar ningún estado transitorio en ninguno de los sistemas anteriores.

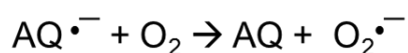
Para **AQ2** se detectaron señales importantes del $AQ^{\bullet-}$ solo en solución de $CHCl_3$ (Fig. 4.25).

Figura 4.25 Absorción de los estados transitorios de 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) en soluciones de CHCl_3 saturadas con argón y aire, tomadas a dos longitudes de onda.



Las señales tomadas a 550 nm corresponden a $\text{AQ}^{\bullet-}$, mientras que las señales a 675 nm corresponden a ${}^3\text{AQ}^*$.

Los resultados muestran que en solución de CHCl_3 saturada con argón, el radical anión de **AQ2** se genera con un tiempo de vida de 4 μs y desaparece con un tiempo de 450 μs . Cuando se introduce O_2 al sistema (CHCl_3 saturado de aire), este radical anión se forma con un tiempo de vida inferior al tiempo de resolución del equipo (<100 ns) y desaparece con un tiempo de 150 μs . Esto indica que tanto la formación como la desaparición del $\text{AQ}^{\bullet-}$ están afectadas por la concentración de O_2 . Se propone que la especie $\text{AQ}^{\bullet-}$ se forma parcialmente a partir del ${}^3\text{AQ}^*$, ya que en presencia de oxígeno en el medio se observa una desactivación parcial, pero no total del transitorio atribuible al $\text{AQ}^{\bullet-}$. Y esto permitiría la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$, siguiendo la reacción característica del mecanismo fotosensibilizante Tipo I:

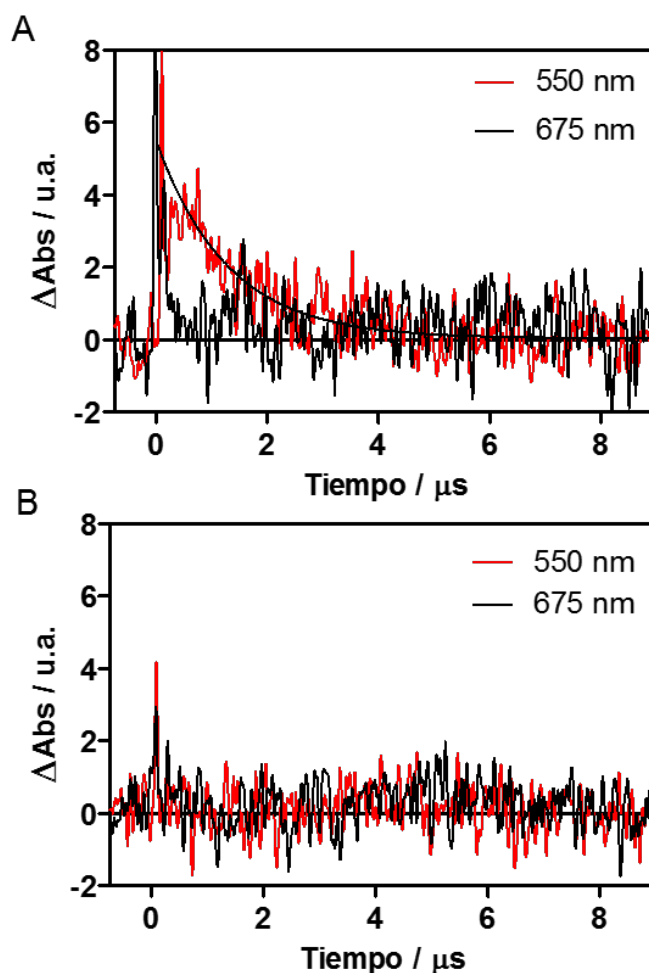


En concordancia con las observaciones anteriores, el $^3\text{AQ}^*$ decayó con un tiempo de vida similar ($5 \mu\text{s}$), en soluciones saturadas de argón y también desapareció cuando se dejó el oxígeno en el sistema.

Cuando se realizaron estos mismos experimentos en PBS, únicamente se pudieron observar transitorios débiles a 550 y 675 nm, los cuales vivieron aproximadamente $1 \mu\text{s}$ en ambas longitudes de onda. Además, el oxígeno no tuvo efecto en su cinética de decaimiento. Estos transitorios se atribuyen a las especies agregadas, las cuales parecen que prácticamente no interactúan con el $^3\text{O}_2$.

En suspensiones de levaduras en estado planctónico, sólo se observó un transitorio débil a 550 nm ($\text{AQ}^{\bullet-}$) ($1,7 \mu\text{s}$) (Fig. 4.26).

Figura 4.26 Absorción de los estados transitorios de 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) en suspensiones de levaduras saturadas con aire (**A**) y control de levaduras (**B**).

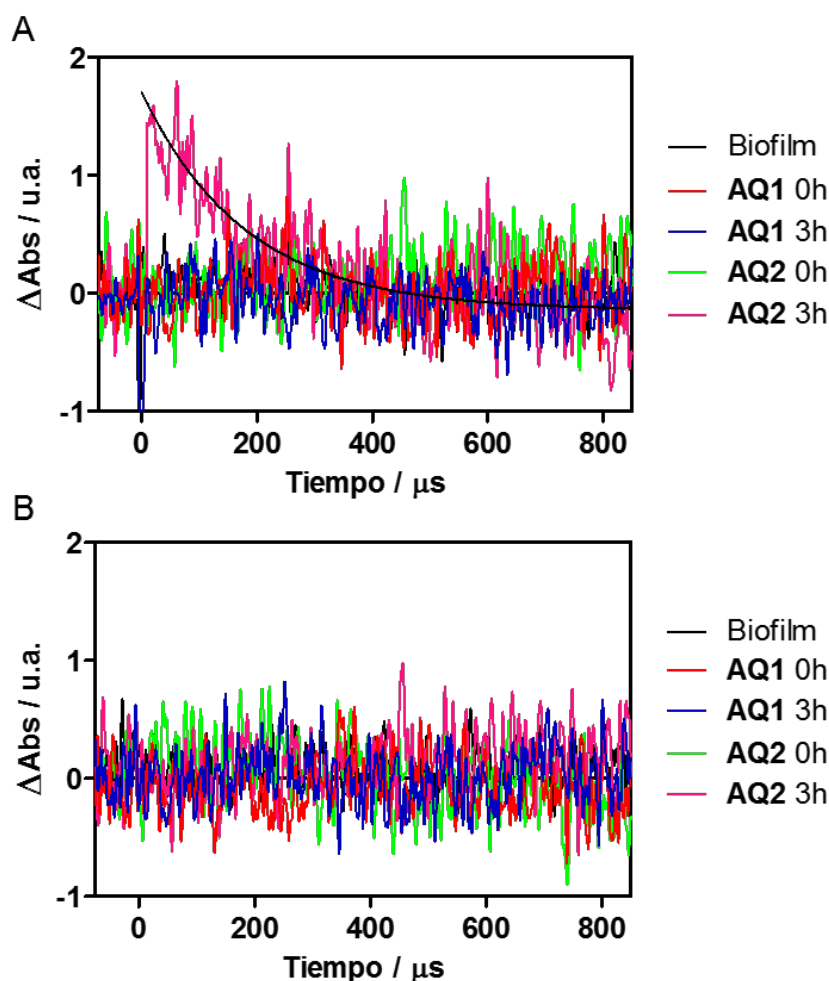


Las señales tomadas a 550 nm corresponden a $\text{AQ}^{\bullet-}$, mientras que las señales a 675 nm corresponden a $^3\text{AQ}^*$.

En los biofilms, el $AQ^{\bullet-}$ pudo detectarse sólo cuando se incubaron durante 3 h (Fig. 4.27), observándose un tiempo de vida de 170 μs . Esto estaría correlacionado con los resultados obtenidos en los ensayos de incorporación, donde a tiempo 0, la AQ se encontraría agregada en PBS y no da una señal apreciable; mientras que cuando se va incorporando a las partes internas del biofilm (22 % a las 3 h), se iría desagregando y consecuentemente aumentaría su capacidad para formar el $AQ^{\bullet-}$.

No se observa la presencia del ${}^3AQ^*$ en biofilms como se observó en las mediciones de absorción transitoria anteriores (Fig. 4.27). La falta de evidencia de la presencia de ${}^3AQ^*$ en biofilms, podría explicarse por la baja sensibilidad de la técnica para la medición en biofilms (reducción de la sensibilidad por un factor 10, comparar eje y de las Fig. 4.25 y 4.27).

Figura 4.27 Absorción de los estados transitorios de rubiadina (**AQ1**) y 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) en biofilms saturados de aire a $t = 0$ y luego de 3 horas de incubación. Las señales tomadas a 550 nm (**A**) corresponden a $AQ^{\bullet-}$, mientras que las señales a 675 nm (**B**) corresponden a ${}^3AQ^*$.



IV.7.2- Determinación de oxígeno singlete

La detección de la luminiscencia resuelta en el tiempo en el IR cercano es una técnica altamente sensible para estudiar el proceso de fotosensibilización por $^1\text{O}_2$ (Tipo II), ya que esta ERO se puede monitorear directamente a través de su fosforescencia a 1275 nm (Jimenez-Banzo *et al.*, 2008; López- Chicón *et al.*, 2012; Snyder *et al.*, 2006; Ragás *et al.*, 2010). Se observaron señales de $^1\text{O}_2$ para **AQ1** y **AQ2** en CHCl_3 y PBS. Los rendimientos cuánticos de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ) en PBS fueron bajos: $\Phi_\Delta < 0,01$ para **AQ1** y $\Phi_\Delta = 0,02$ para **AQ2**. Los valores en CHCl_3 ya fueron informados por Núñez Montoya *et al.* (2005).

Las señales de luminiscencia también se obtuvieron para las levaduras en estado planctónico ($\sim 10^3$ UFC/mL) y formando biofilm ($47,9 \pm 2,6$ UBB) (Φ_Δ aparentes). En la Fig. 4.28 y 4.29 se muestran las señales obtenidas para el cultivo planctónico y el biofilm, respectivamente. Estas señales se han asignado a la fosforescencia del $^1\text{O}_2$ por su distribución espectral (desaparición de la señal a 1325 nm, en donde el $^1\text{O}_2$ casi no muestra fosforescencia), y por el incremento del tiempo de vida del decaimiento cuando se incubaron las levaduras en medios deuterados (el $^1\text{O}_2$ vive más en medios deuterados, ya que su decaimiento no radiativo es menor) (Snyder *et al.*, 2006, Ogilby, 1982).

Para las levaduras en estado planctónico, se detectó una señal débil de $^1\text{O}_2$ cuando fueron incubadas con las AQs en PBS (Fig. 4.28), la cual se incrementó cuando las levaduras se incubaron con PBS-d (Tabla 4.19). Podría estar sucediendo que la producción de $^1\text{O}_2$ ocurra con un rendimiento cuántico apreciable, pero que la desactivación química o física de la especie sea muy alta, y consecuentemente su detección no sea apreciable. Esto explicaría la baja intensidad de la señal de $^1\text{O}_2$ en ambos medios, ya que sólo se detecta el $^1\text{O}_2$ que no ha sido desactivado. A su vez, el incremento de esta señal en PBS-d, estaría indicando que el transiente $^3\text{AQ}^*$ realmente se forma para ambas AQs, aun cuando este transiente no fue capaz de producir una señal (Fig. 4.26). Por medio de la comparación de las señales de fosforescencia, se observó que para **AQ2** éstas son mayores que para **AQ1**, tanto en PBS como en PBS-d (1,6 y 1,3 veces respectivamente).

Figura 4.28 Cinética del $^1\text{O}_2$ para (A) rubiadina (AQ1) y (B) 1-metil éter de rubiadina (AQ2) en levaduras de *C. tropicalis* NCPF 3111 en PBS y en PBS-d, observada a 1275 nm y a 1325 nm (control negativo).

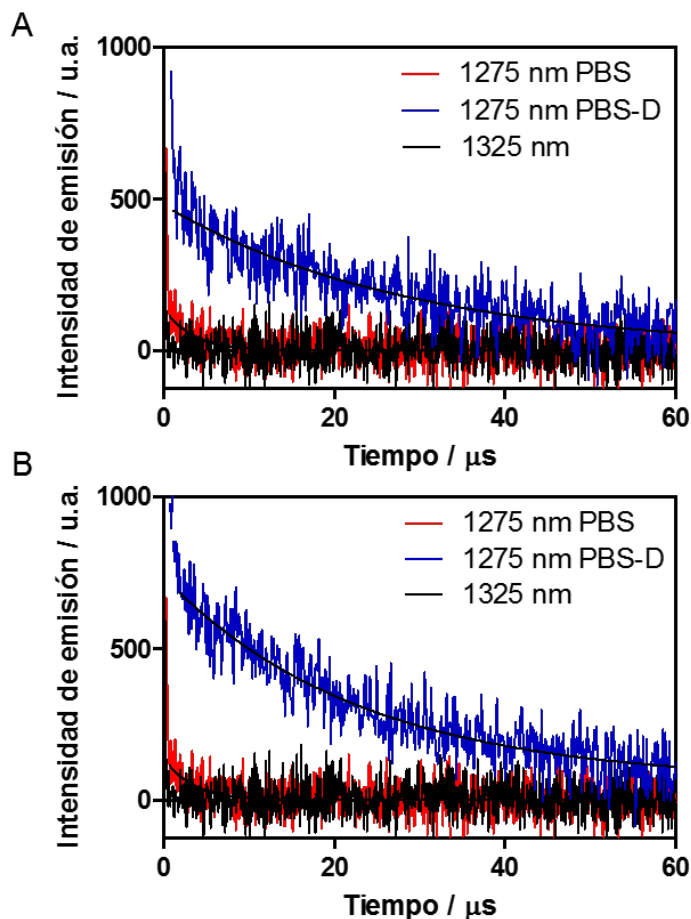


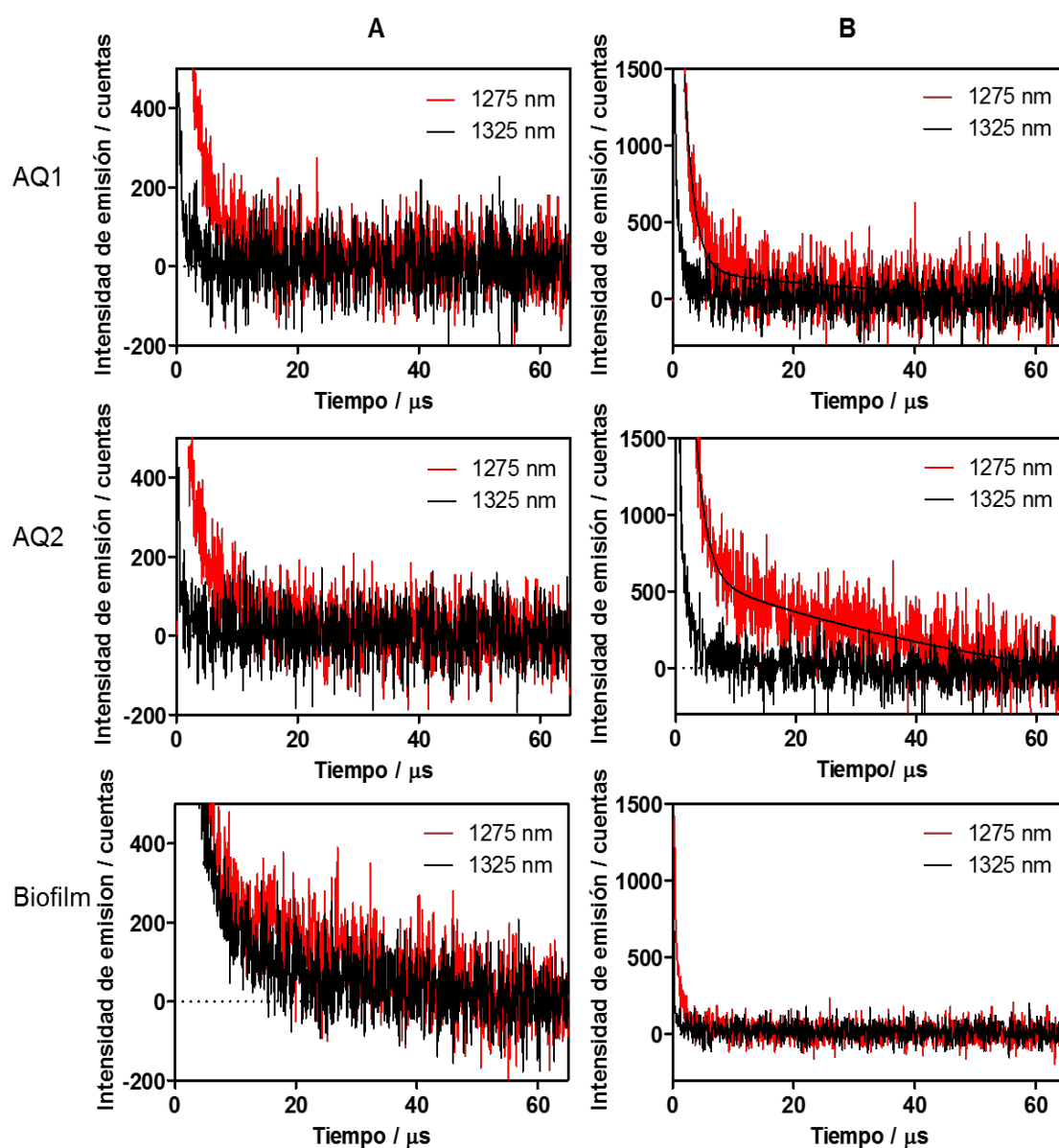
Tabla 4.19 Producción de $^1\text{O}_2$ de rubiadina (AQ1) y 1-metil éter de rubiadina (AQ2) en levaduras en forma planctónica de *C. tropicalis* NCPF 3111 en PBS y PBS-d.

AQ	PBS		PBS-d	
	Intensidad de emisión	Tiempo de vida (μs)	Intensidad de emisión	Tiempo de vida (μs)
AQ1	114	3,4	193	28,5
AQ2	460	5	623	23,4

Para las levaduras en estado de biofilm, no se pudo detectar la emisión de $^1\text{O}_2$ cuando las AQs se incubaron en PBS (Fig. 4.29 A). En cambio, en PBS-d se observó la fosforescencia atribuible a $^1\text{O}_2$ con un tiempo de vida de 56 μs para AQ1 y 64 μs

para **AQ2** (Fig. 4.29 B). Para los biofilms, además de la desactivación que puede estar afectando a la producción de $^1\text{O}_2$, se suma el estado fisiológico de las células que forman el biofilm que podría afectar la disponibilidad de $^3\text{O}_2$ necesario para generar esta ERO. Sin embargo, es necesario destacar que el comportamiento de las AQs en el biofilms fue similar al observado en las levaduras en forma planctónica. Por otro lado, se observó que en la primera parte del decaimiento hay una fuerte dispersión de la señal (Fig. 4.29 B), que en general está asociada a las muestras que no son transparentes y que no se debería a $^1\text{O}_2$.

Figura 4.29 Cinética del $^1\text{O}_2$ de rubiadina (**AQ1**) y 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) en biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 en PBS (**A**) y en biofilms incubados con PBS-d (**B**), observada a 1275 nm y a 1325 nm (control negativo).



Por lo tanto, las señales de $^1\text{O}_2$ confirmarían que se genera el estado $^3\text{AQ}^*$, pero su concentración es demasiado pequeña para producir una señal de absorción transitoria. Mediante la comparación de la intensidad de las señales de fosforescencia de las dos Aqs, es evidente que para **AQ2** se detecta una señal de $^1\text{O}_2$ aproximadamente tres veces mayor que para **AQ1** en el biofilm de *C. tropicalis* (Fig. 4.29 B).

Si bien en los experimentos en medios biológicos se detectó la señal de $^1\text{O}_2$, no se pudo estimar los valores de rendimiento cuántico, ya que la principal desventaja es su baja sensibilidad. Se estima que el rendimiento cuántico de fosforescencia del $^1\text{O}_2$ en medios biológicos es inferior a 10^{-6} (Snyder *et al.*, 2006); lo cual unido a los bajos rendimientos de los detectores en esta región dificultan su cuantificación. Sin embargo, la principal ventaja de esta técnica es la selectividad, ya que en esa región del IR cercano prácticamente ninguna otra especie emite fosforescencia.

A pesar que no se pudo detectar el estado $^3\text{AQ}^*$ para ambas Aqs en el biofilm, se pudo demostrar indirectamente que este estado transitorio se genera. Esto debido principalmente, a que se detecta una leve generación de $^1\text{O}_2$ para ambas Aqs en los biofilms con PBS-d, siendo esta producción más significativa para **AQ2** (Fig. 4.29 B). Además, el estado $^3\text{AQ}^*$ se detectó brevemente para **AQ2**, solo en soluciones de CHCl_3 saturadas con argón (Fig. 4.25). Asimismo, en el biofilm se detectó el transitorio $\text{AQ}^{\bullet-}$ para **AQ2**, luego de 3 h de incubación. A pesar que el $\text{AQ}^{\bullet-}$ para **AQ1** no pudo ser detectado, los bajos valores de $^1\text{O}_2$ medidos en el biofilm para ambas Aqs, sugieren que el $^3\text{AQ}^*$ que se estaría generando se deriva principalmente en la formación del $\text{AQ}^{\bullet-}$. Por lo tanto, la reacción de esta especie transitoria con el oxígeno molecular para generar $\text{O}_2^{\bullet-}$ sería predominante (mecanismo fotosensibilizante Tipo I).

IV.7.3- Efecto de secuestrantes/desactivantes de especies reactivas del oxígeno en la fotoinactivación de biofilms fúngicos

Cuando los biofilms fueron tratados con las Aqs a la concentración utilizada para estudiar los estados transitorios y la generación de $^1\text{O}_2$ ($56 \mu\text{M}$), las UBB se redujeron 3,3 veces por acción de **AQ1** y 2,6 veces para **AQ2** bajo irradiación (Tabla 4.20). Esta concentración testeada corresponde a la concentración activa de **AQ2** sobre el biofilm de *C. tropicalis* (CIMS-50), y es una concentración superior a la más activa de **AQ1** (7,9 veces). Se puede observar, que ambas Aqs tuvieron una actividad similar, alrededor del 65 %R ($p > 0,05$ cuando se compararon ambas Aqs).

Tabla 4.20 Actividad antibiofilm *in vitro* de las AQs, ensayadas a 56 μM bajo oscuridad e irradiación, expresada en UBB.

Condición	OSCURIDAD	IRRADIACIÓN
AQ1	54,5 \pm 3,1	17,8 \pm 3,8
AQ2	50,1 \pm 6,3	22,3 \pm 7,8
Biofilm no tratado	56,9 \pm 6,9	58,5 \pm 4,5

* $p < 0,05$ cuando rubiadina (**AQ1**) se comparó con 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**).

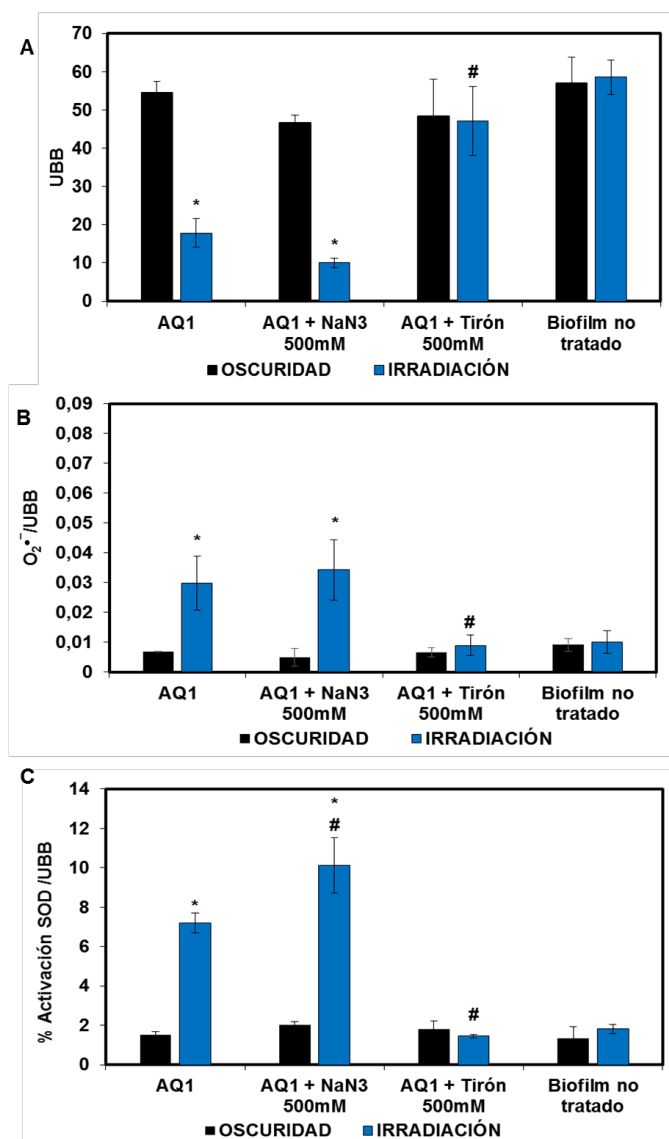
En función de los resultados obtenidos, la ausencia de la señal del $^3\text{AQ}^*$ y la detección de una señal leve de $^1\text{O}_2$ en presencia de PBS-d, no sería posible correlacionar la fotoinactivación producida por las AQs con el mecanismo fotodinámico Tipo II. Por lo tanto, se proyecta que el mecanismo Tipo I sería el predominante en el efecto antibiofilm de estas AQs naturales. Con el objetivo de corroborar esto, esta condición de fotoinactivación (biofilm, tratado con 56 μM de cada AQ), se repitió para evaluar el efecto de diferentes secuestrantes/desactivantes de ERO.

Se usó Tiron que es un secuestrante de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Angel Villegas *et al.*, 2015; Meerovich *et al.*, 2014), y azida de sodio que es un desactivador de $^1\text{O}_2$ (quencher, López- Chicón *et al.*, 2012). Se observó que la actividad antibiofilm fotoinducida de **AQ1** y **AQ2** no fue modificada en presencia de azida de sodio (Fig. 4.30, 4.31).

Sin embargo, el efecto fue completamente revertido por Tiron, alcanzando los niveles de UBB del biofilm no tratado (Fig. 4.30 A, 4.31 A). Esto implica que las AQs fotoestimuladas actuarían principalmente a través de la generación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (mecanismo fotosensibilizante Tipo I), ya que en presencia de Tiron, éste actúa secuestrando el $\text{O}_2^{\bullet-}$ generado y así contrarresta la actividad antifúngica. Esto fue corroborado por el ensayo de reducción del NBT (Fig. 4.30 B, 4.31 B), el cual demostró que la actividad antibiofilm bajo irradiación de ambas AQs se correlacionó con mayores niveles de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y consecuentemente, se produjo un incremento en la activación de la enzima SOD (Fig. 4.30 C, 4.31 C). Sólo en presencia de Tiron, la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y la activación de la enzima SOD regresaron a sus niveles basales (biofilm sin tratar).

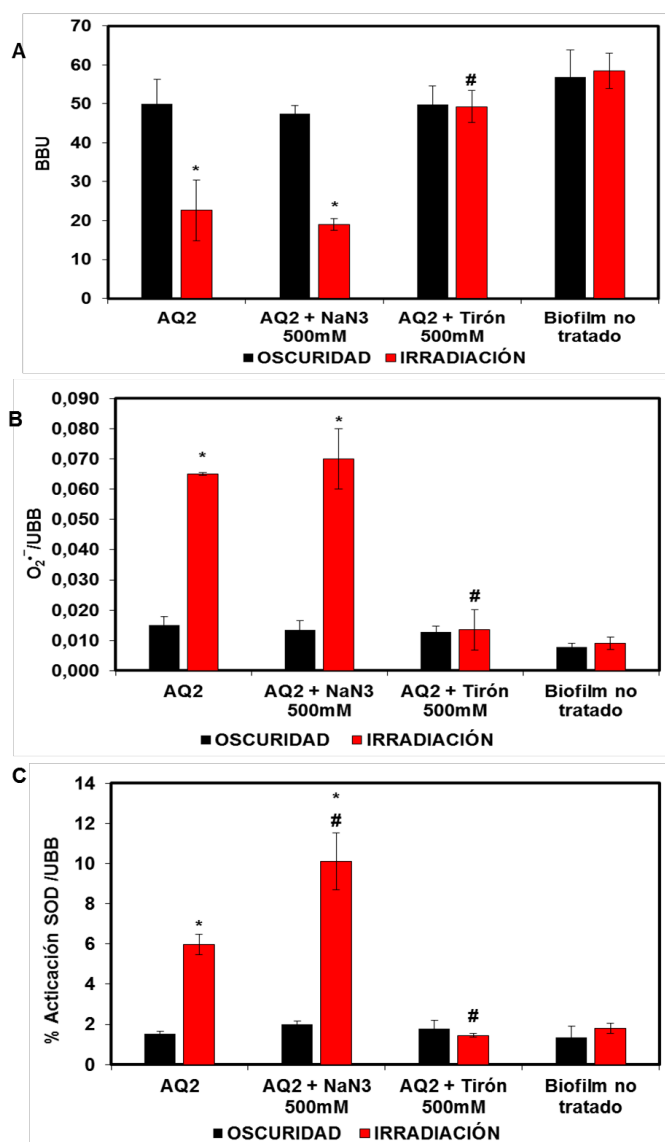
Por lo tanto, se estimó que la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y activación de la enzima SOD estarían en un equilibrio que sería el responsable del efecto similar observado para ambas AQs en presencia de irradiación (Fig. 4.30 C, 4.31 C).

Figura 4.30 (A) Fotoinactivación del biofilm de *C. tropicalis* NCPF 3111 por acción de rubiadina (**AQ1**) (56 μ M), en presencia de secuestrante de $O_2^{\bullet-}$ (Tiron) y desactivante de 1O_2 (azida sódica). **(B)** Producción de $O_2^{\bullet-}$ en biofilms de *C. tropicalis* por acción de las AQs y en presencia de los secuestrante/desactivante. **(C)** Activación de la enzima SOD en biofilms de *C. tropicalis* tratados con **AQ1** y en presencia de secuestrante/desactivante.



* $p < 0.05$ respecto al biofilm # $p < 0.05$ AQs vs. secuestrante.

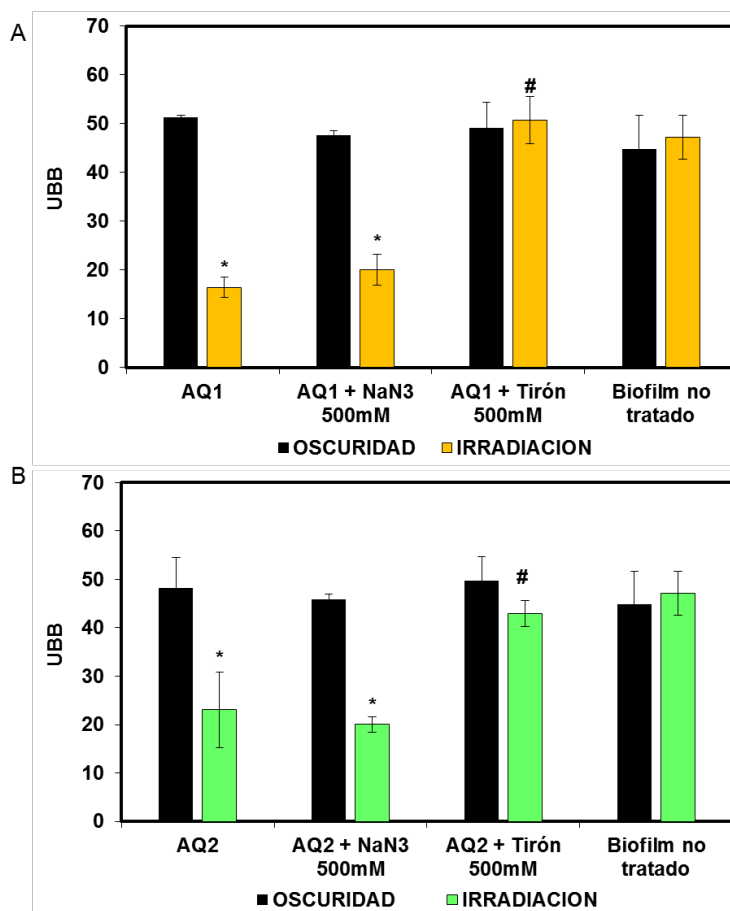
Figura 4.31 (A) Fotoinactivación del biofilm de *C. tropicalis* NCPF 3111 por acción de 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) (56 μM), en presencia de secuestrante de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Tiron) y desactivante de $^1\text{O}_2$ (azida sódica). **(B)** Producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en biofilms de *C. tropicalis* por acción de las AQs y en presencia de los secuestrante/desactivante. **(C)** Activación de la enzima SOD en biofilms de *C. tropicalis* tratados con **AQ2** y en presencia de secuestrante/desactivante.



* $p < 0.05$ respecto al biofilm # $p < 0.05$ AQs vs. secuestrante.

Este experimento de fotoinactivación del biofilm de *C. tropicalis*, en presencia de secuestrante de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Tiron) y desactivante de $^1\text{O}_2$ (azida sódica), se llevó a cabo también a las concentraciones más activas de ambas AQs: 1,96 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para **AQ1** (SupraCIMf) y 15,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para **AQ2** (CIMf) (Fig. 4.32), obteniéndose similares resultados.

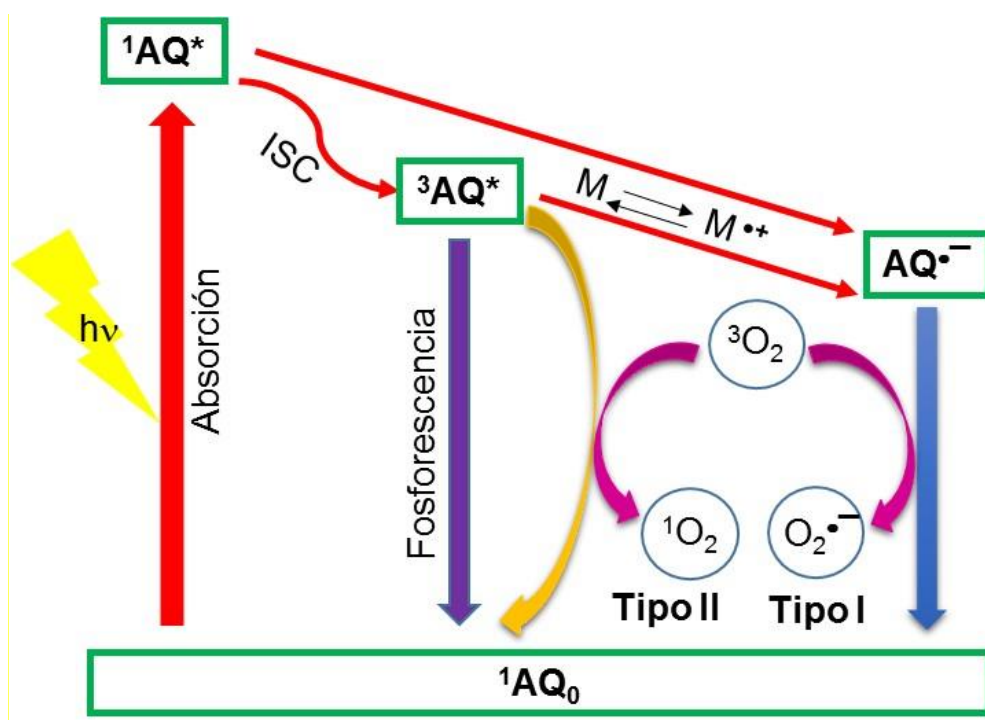
Figura 4.32 (A) Fotoinactivación del biofilm de *C. tropicalis* NCPF 3111 por acción de rubiadina (**AQ1**) a 1,96 µg/mL y **(B)** 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) a 15,6 µg/mL, en presencia de secuestrante de $O_2^{\bullet-}$ (Tirón) y desactivante de 1O_2 (azida sódica)



* $p < 0.05$ respecto al biofilm # $p < 0.05$ AQs vs. secuestrante.

Al estudiar los estados transitorios de ambas AQs, especialmente $AQ^{\bullet-}$ y $^3AQ^*$, se observó mediante los experimentos de absorción transitoria que sólo **AQ2** produce cantidades detectables de estas especies transitorias. Teniendo en cuenta que la acumulación en el biofilm también es más favorable para **AQ2**, se puede anticipar que el $O_2^{\bullet-}$ formado por el quenching de oxígeno de $AQ^{\bullet-}$, se forma preferiblemente para **AQ2**. Aunque no fue posible detectar la absorción del estado de triplete para ninguna de las AQs en los biofilms, la observación de la fosforescencia de 1O_2 indicaría que esta especie se forma realmente. Una vez más, **AQ2** mostró una eficiencia superior a **AQ1** para generar esta ERO, en concordancia con la determinada mediante SOSG.

En función estos resultados obtenidos, en la Fig. 4.33 se postulan los posibles procesos foto físicos y fotoquímicos que presentarían las AQs.

Figura 4.33 Procesos fotofísicos y fotoquímicos de las antraquinonas (AQ).

Teniendo en cuenta que la producción de $O_2^{\cdot-}$ implica la formación del radical catión del FS, en este caso la formación de éstos transitorios para este tipo de AQ no estaría favorecida, aunque se ha descrito su formación sobre matrices poliméricas (Ahmed & Khan, 1995; Fujita *et al.*, 1996; Del Giacco *et al.*, 2003).

Sin embargo, la contribución de 1O_2 en la fotoinactivación de los biofilms parece ser insignificante, ya que la azida de sodio (un quencher específico de 1O_2) no fue capaz de contrarrestar el efecto antibiofilm. La observación de que Tiron es un scavenger más eficaz en la fotoinactivación de biofilms de *C. tropicalis* por acción de estas AQs, sugiere que el $O_2^{\cdot-}$ formado por transferencia de electrones de los estados excitados de las AQs, es el mecanismo fotosensibilizante principal implicado en la fotoinactivación.

Los últimos resultados indican que estas AQs naturales reducen la formación de biofilms de *C. tropicalis* bajo la acción de la luz, sobre todo por medio de un mecanismo fotodinámico Tipo I (generación de $O_2^{\cdot-}$). A pesar que observó la producción de 1O_2 en biofilms incubado con PBS-d, su participación en la fotoinactivación del biofilm no sería significativa.

Por otra parte, los espectros de absorción revelaron la presencia de agregados de AQs en PBS, levaduras en estado planctónico y formando biofilms, como se indicó por la ampliación de las bandas y los cambios en su intensidad relativa, en comparación con $CHCl_3$. Sin embargo, el efecto observado en biofilms sugiere un

comportamiento intermedio en el que la desagregación parcial se produce tras la acumulación de las Aqs en el biofilm.

Los resultados obtenidos coinciden con lo que ya se ha demostrado para otros FS, como hipericina y azul de dimetil metileno, en donde el mecanismo de fotoinactivación depende no solamente del FS utilizado, sino también de la especie de *Candida* sobre la que se ensayaron y la acumulación intracelular de los FS (López Chicón *et al.*, 2012; Paz-Cristobal *et al.*, 2013).

IV.8- OTRAS ESTRATEGIAS ANTIMICROBIANAS PARA OPTIMIZAR LA ACTIVIDAD ANTIBIOFILM DE ANTRAQUINONAS DE *H. pustulata*

Los resultados mostraron que las dos AQs ensayadas fueron más activas sobre los biofilms de la cepa clínica de *C. tropicalis* CRF6 que sobre los de la cepa de referencia NCPF 3111, logrando una reducción de alrededor del 80 % (%R). Así, para las AQs se pudo estimar la CIMS-80 sobre los biofilms de cepa clínica y solo la CIMS-50 sobre los biofilms de la cepa de referencia.

Para tratar de mejorar la actividad antifúngica fotoactivada de **AQ1** y **AQ2**, específicamente sobre biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111, se probaron dos estrategias principales:

1) Aumentar la frecuencia de irradiación durante el período de incubación del biofilm tratado con estas AQs fotosensibilizantes.

2) Combinar estas AQs entre sí y con un antifúngico habitualmente usado en la clínica como AMB, incluso evaluando el aumento de la frecuencia de irradiación sobre estas combinaciones.

IV.8.1- Aumento en la frecuencia de irradiación sobre la actividad antibiofilm de las AQs: Efecto sobre estrés oxidativo y nitrosativo del biofilm y respuesta de los mecanismos antioxidantes

En la Tabla 4.21 se muestran los %R obtenidos a las concentraciones activas de cada AQ, sobre el biofilm de *C. tropicalis* NCPF 3111, con un único período de irradiación (15 min) previo a la incubación ($t = 0$).

Tabla 4.21 Actividad antibiofilm *in vitro* de las AQs sobre *C. tropicalis* NCPF 3111, porcentajes de reducción obtenidos bajo oscuridad y una única irradiación antes de la incubación ($t = 0$).

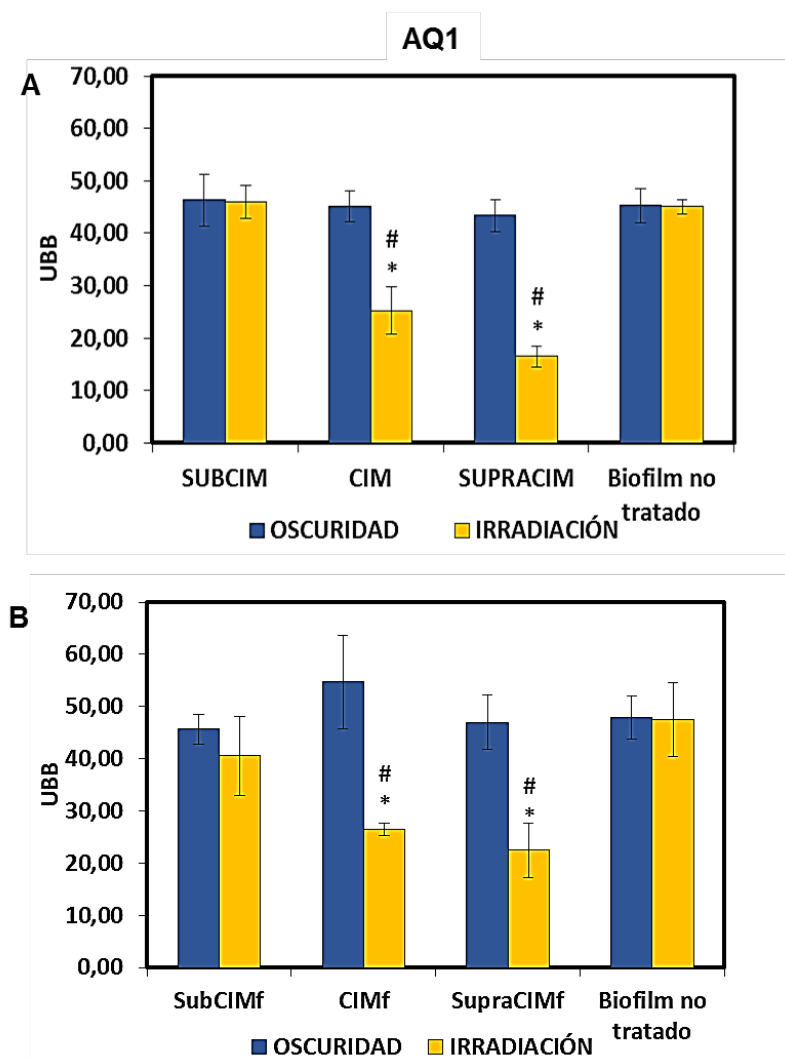
AQ	Concentración	Porcentaje de reducción (%R)	
		Oscuridad	Irradiación
AQ1	SubCIMf	0	0
	CIMf	0	44 ± 10
	SupraCIMf	0	63,5 ± 4,5
AQ2	SubCIMf	0	0
	CIMf	0	47 ± 10
	SupraCIMf	0	0

AQ1: rubiadina; AQ2: 1-metil éter de rubiadina; CIMf: Concentración inhibitoria mínima fotoactiva; Sub-CIMf: CIMf/2; Supra-CIMf: CIMfx2

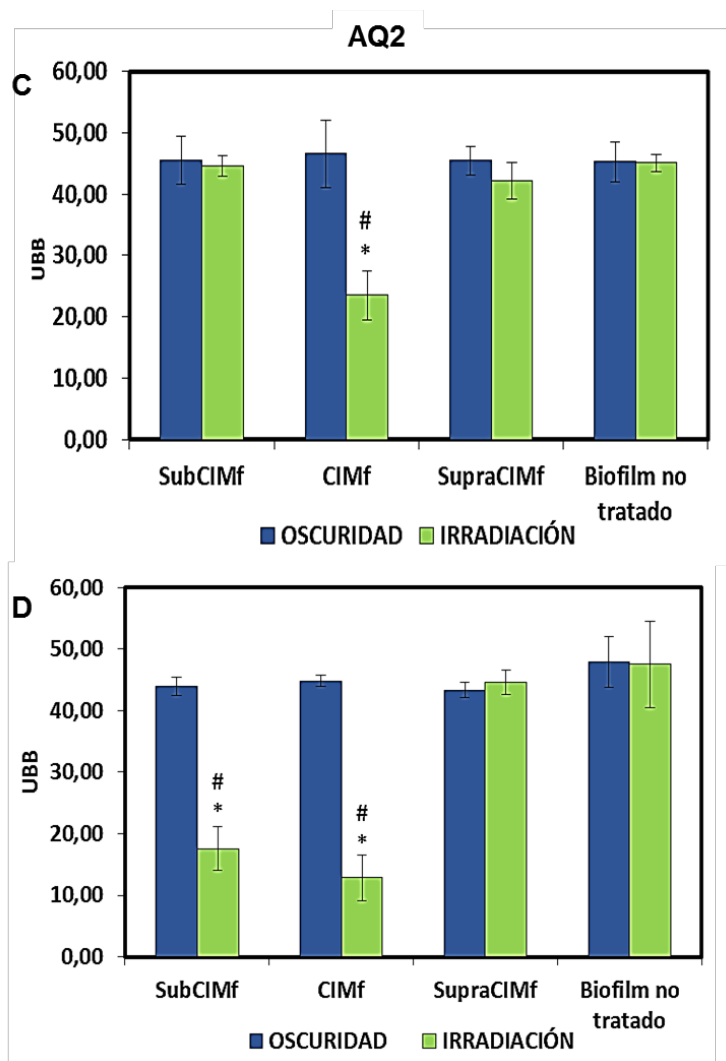
En la Fig. 4.34 se puede observar la reducción en las UBB producida por cada AQ cuando el biofilm tratado se irradió una sola vez antes de la incubación ($t = 0$) (Fig. 4.34 A y B), en comparación cuando se realizaron sucesivas irradiaciones durante la incubación: $t = 0, 3, 6, 24, 27$ y 30 h (Fig. 4.34 C y D). Al aumentar la frecuencia de irradiación, ambas AQs produjeron mayores %R a concentraciones menores. **AQ1** alcanzó un $52,7 \pm 10,1$ %R a la CIMf y **AQ2** logró un $62,9 \pm 7,4$ %R a la SubCIMf.

A pesar que para **AQ1** no se logró mejorar su %R, se disminuyó la CIMS-50 a la mitad ($0,98 \mu\text{g/mL}$). Para **AQ2**, este aumento en la frecuencia de irradiación fue más beneficioso porque no sólo aumentó el %R sino que también disminuyó la concentración más activa.

Figura 4.34 Actividad antibiofilm de las AQs en *C. tropicalis* NCPF 3111, irradiadas antes de la incubación ($t = 0$ h) (A y C) y con un tratamiento de irradiación a $t = 0, 3, 6, 24, 27, 30$ h durante incubación (B y D).



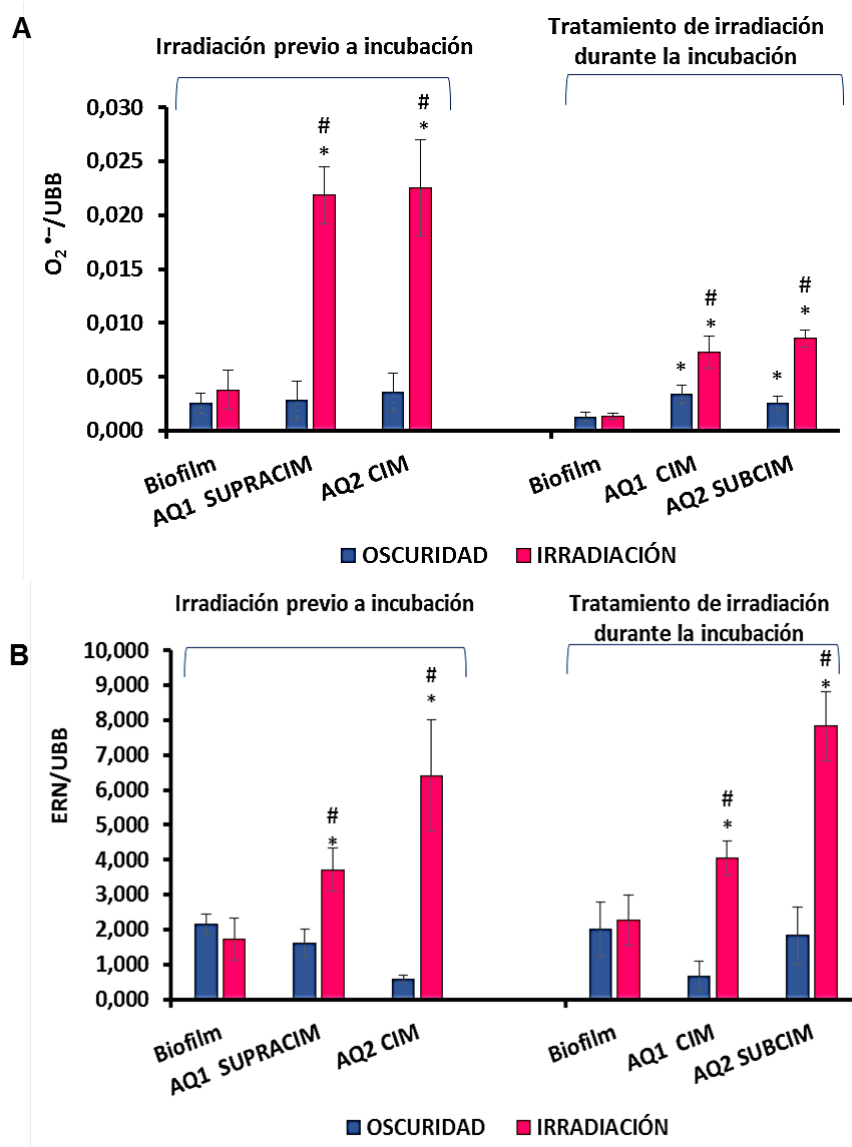
Resultados y Discusión



AQ1: rubiadina y **AQ2:** 1-metil éter de rubiadina
^{*}*p*<0.05 respecto al biofilm, [#]*p*<0.05 Oscuridad vs. Irradiación.

Cuando se estudió el desbalance oxidativo y nitrosativo para las concentraciones que resultaron activas bajo el tratamiento con irradiación, se observó un incremento en los niveles de $O_2^{\bullet-}$ respecto a el biofilm no tratado y respecto a oscuridad (Fig. 4.35 A). Sin embargo, estos niveles de $O_2^{\bullet-}$ fueron menores comparado con la irradiación a $t = 0$. Respecto al incremento observado en las ERN bajo irradiación, éste fue comparable en ambos tratamientos con luz (Fig. 4.35 B).

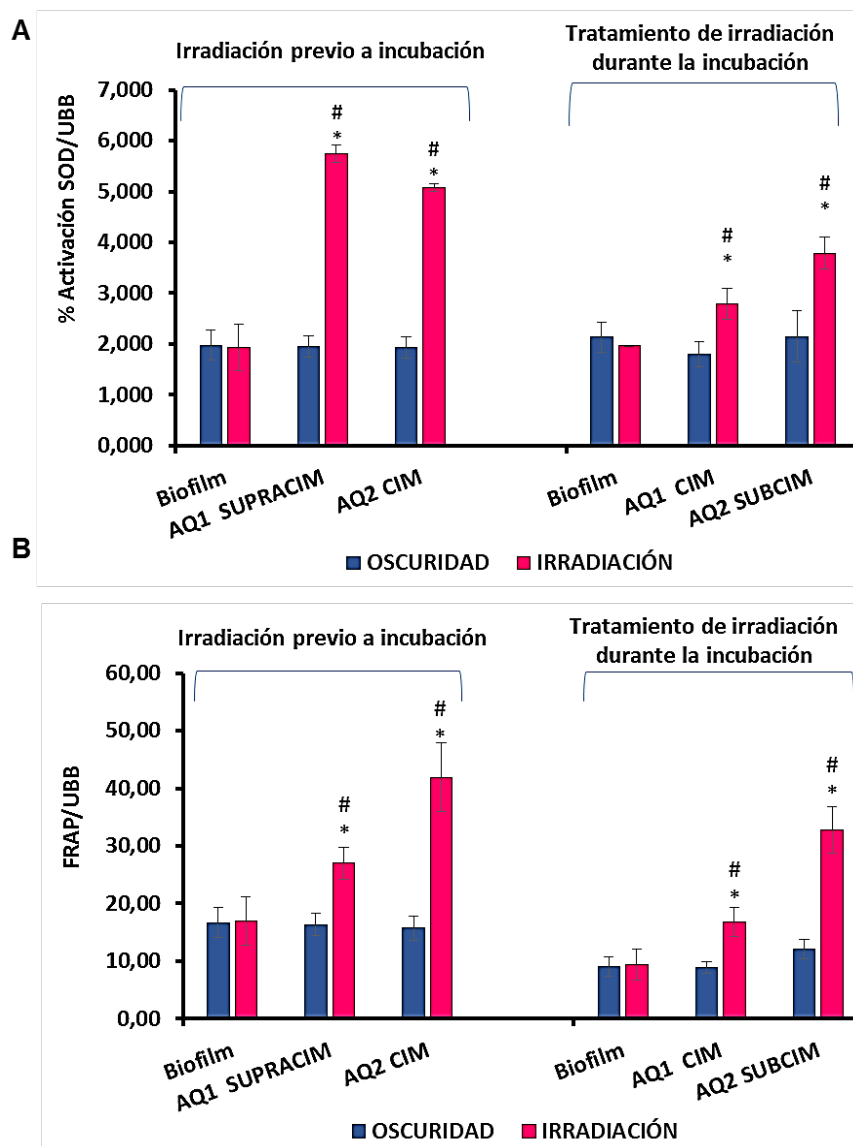
Figura 4.35 Desbalance redox generado por rubiadina (AQ1) y 1-metil éter de rubiadina (AQ2) a las concentraciones más activas, con irradiación antes de la incubación (t = 0h) y con el tratamiento de luz (t = 0, 3, 6, 24, 27, 30 h) durante la incubación. (A) Producción de $O_2^{\bullet-}$. (B) Generación de ERN.



* $p < 0.05$ respecto al biofilm, # $p < 0.05$ Oscuridad vs. Irradiación.

Además, se observó que tanto la enzima SOD como la capacidad antioxidante total fueron estimuladas a las concentraciones activas con este nuevo tratamiento de irradiación, aunque a menores niveles respecto a la irradiación a t = 0 (Fig. 4.36 A y B).

Figura 4.36 Desbalance redox generado por rubiadina (AQ1) y 1-metil éter de rubiadina (AQ2) a las concentraciones más activas, con irradiación antes de la incubación (t = 0h) y con el tratamiento de luz (t = 0, 3, 6, 24, 27, 30 h) durante la incubación. (A) Activación de la enzima SOD. (B) Capacidad antioxidante total.



* $p < 0.05$ respecto al biofilm, # $p < 0.05$ Oscuridad vs. Irradiación.

Con el tratamiento de irradiación, se observó un predominio del estrés nitrosativo sobre el oxidativo. Seguramente como una respuesta al alto nivel de $O_2^{\bullet-}$, en donde se estimuló la generación de NO^{\bullet} que actuaría como secuestrante de esta ERO (Astuti *et al.*, 2016, Powers *et al.*, 2011). Se debe tener en cuenta que estas mediciones, se realizaron al finalizar la incubación del biofilm (48 h), y es probable que el $O_2^{\bullet-}$ generado haya sido contrarrestado con la producción de NO^{\bullet} y la activación de la SOD y el sistema antioxidante total del biofilm (FRAP). Además, el mayor %R

obtenido por **AQ2**, estaría relacionado con la mayor producción de ERN en relación a **AQ1** bajo el tratamiento de irradiación.

IV.8.2- Ensayo de combinación con irradiación

A- Efecto antibiofilm de las combinaciones de antraquinonas entre sí y con AMB

Se estudió el efecto de las combinaciones de cada AQ con AMB y de la combinación de ambas AQs entre sí sobre biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111. Se ensayaron las combinaciones posibles que se pueden obtener con las tres concentraciones de cada compuesto ensayadas previamente: SubCIMf, CIMf y SupraCIMf. Esta evaluación se realizó en oscuridad y bajo dos condiciones de irradiación: **1**) antes de la incubación (t = 0) y **2**) con tratamiento de irradiación durante la incubación del biofilm (t = 0, 3, 6, 24, 27, 30 h).

En oscuridad (Tabla 4.22), se observó que el efecto de las combinaciones fue menor o comparable al de AMB sola a su CIMS (61,1 ± 4,1 %R). Esto podría explicarse por el hecho que las AQs por sí mismas no fueron activas en ausencia de luz a las concentraciones ensayadas, por lo cual sólo estaríamos observando el efecto de AMB.

Tabla 4.22 Actividad antibiofilm *in vitro* de las combinaciones de AQs con AMB en oscuridad: (A) rubiadina (**AQ1**) + AMB y (B) 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) + AMB, expresada como porcentajes de reducción (%R).

A		Concentración en la combinación (µg/mL)			% R
CIMS AQ1 (µg/mL)	CIMS AMB (µg/mL)	AQ1	AMB		
nd	0,5	0,49	0,25	16,1 ± 1,4	
			0,5	49,7 ± 1,7	
			1	71,8 ± 9,1	
		0,98	0,25	15,9 ± 0,2	
			0,5	61,5 ± 8,6	
			1	65,4 ± 10,1	
		1,96	0,25	65,1 ± 5,3	
			0,5	79,0 ± 10,0	
			1	70,4 ± 11,2	

B		Concentración en la combinación (µg/mL)			% R
CIMS AQ2 (µg/mL)	CIMS AMB (µg/mL)	AQ2	AMB		
nd	0,5	7,81	0,25	28,2 ± 10,7	
			0,5	42,9 ± 1,2	
			1	68,2 ± 7,8	
		15,6	0,25	59,4 ± 8,4	
			0,5	55,4 ± 9,4	
			1	52,8 ± 8,9	
		31,3	0,25	53,5 ± 11,7	
			0,5	60,1 ± 10,0	
			1	47,2 ± 10,4	

CIMS: Concentración inhibitoria mínima sobre células sésiles. nd: no detectada

En la Fig. 4.37 se muestra el efecto de las combinaciones de cada AQ con AMB y de la combinación de las dos Aqs, cuando fueron irradiadas antes de la incubación ($t = 0$). Se puede observar que todas las combinaciones de cada AQ con AMB disminuyen la biomasa del biofilm significativamente respecto al efecto de cada compuesto en forma individual (Fig. 4.37 A y B). Para la combinación de las dos Aqs, sólo se observó una reducción de la biomasa cuando las Aqs se combinaron a sus SubCIMf (Fig. 4.37 C).

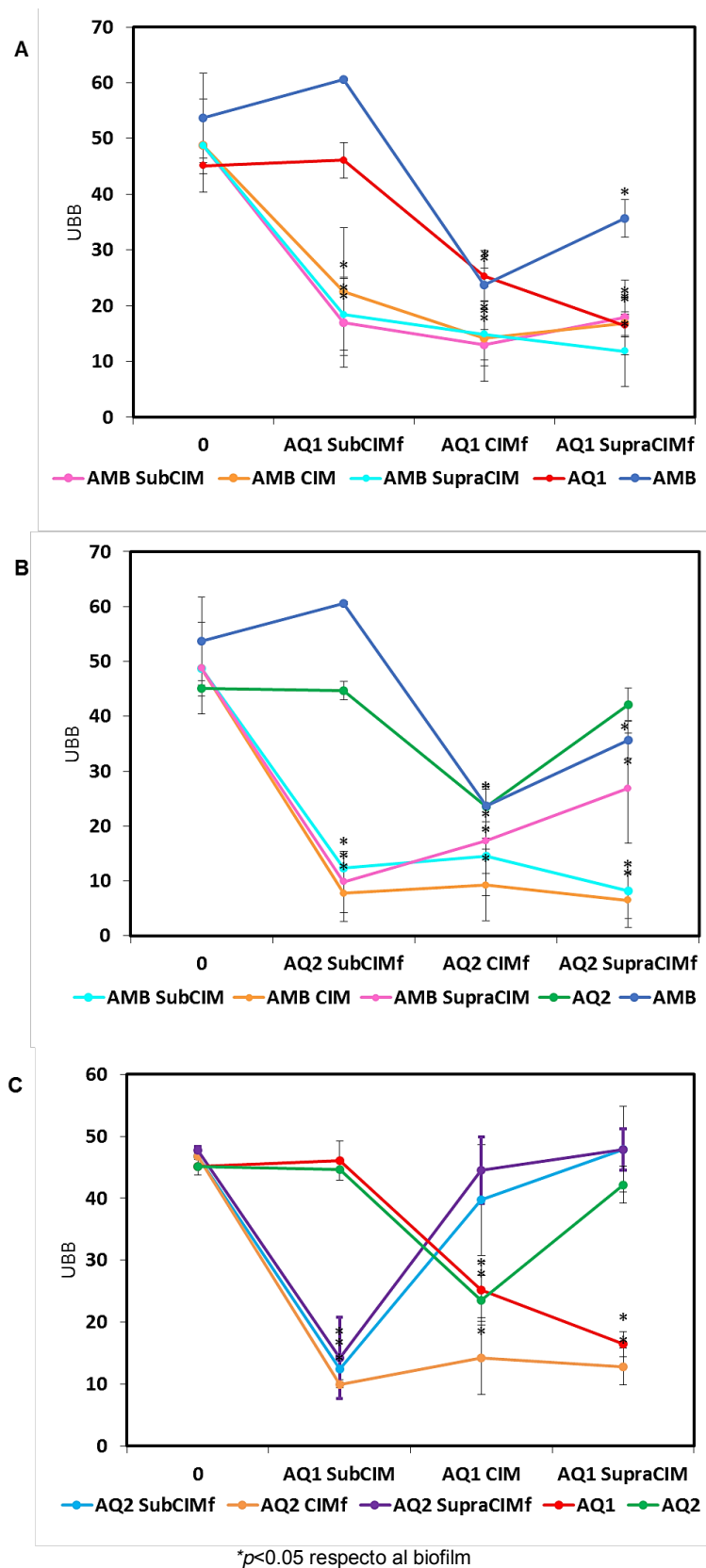
Cuando **AQ1** + AMB se combinaron a sus respectivas SubCIMf se redujo la biomasa a $16,9 \pm 8,1$ UBB, lo cual en comparación al control ($48,8 \pm 8,4$ UBB) corresponde a una reducción del $65,4 \pm 1,6$ %. En este caso, no se mejoró la reducción en la biomasa alcanzada por ambos compuestos a la concentración más activa (**AQ1** a la SupraCIMf y AMB a la CIM), pero se logró bajar la concentración activa de ambos compuestos a la SubCIM (Fig. 4.37 A).

La disminución de las UBB para la combinación **AQ2** + AMB ($12,3 \pm 2,2$ UBB) fue mayor que para la combinación anterior, mejorando el %R logrado ($74,8 \pm 2,2$ %). A su vez, la actividad alcanzada en la combinación se incrementó respecto a cada compuesto en forma individual (47 % para **AQ2** a su CIMf y 61,1 % para AMB a su CIM), incluso se disminuyó la concentración activa a la SubCIM tanto para **AQ2** como para AMB (Fig. 4.37 B). La combinación de estos dos compuestos no fue dependiente de la concentración. Ambos compuestos combinados a la SupraCIM tuvieron un efecto comparable al obtenido en forma individual ($p > 0,05$), lo cual podría deberse a un efecto de agregación de la AQ como quedó demostrado en la Fig. 4.22 correspondiente a los espectros de absorción (Eisfeld & Briggs, 2006; Gouloumis *et al.*, 2006).

La combinación de ambas Aqs produjo una disminución en las UBB similar a la combinación **AQ2** + AMB ($12,4 \pm 1,7$, $73,6 \pm 2,6$ %R), reduciendo también las concentraciones activas a las SubCIMf (Fig. 4.37 C). Para la combinación de ambas Aqs a la SupraCIMf se observó un menor efecto reductor sobre el biofilm, similar al observado para la combinación de **AQ2** + AMB a la SupraCIM, debido también a la agregación de ambas Aqs.

Resultados y Discusión

Figura 4.37 Efecto de las combinaciones: **(A)** rubiadina (**AQ1**) con anfotericina B (**AMB**), **(B)** 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) con AMB y **(C)** **AQ1** con **AQ2**, bajo irradiación antes de la incubación (t = 0).



Resultados y Discusión

Con el fin de establecer si existe sinergismo, adición o indiferencia entre los compuestos, los resultados obtenidos para cada combinación fueron expresadas como FICI. Así, se estableció sinergismo para valores de $FICI \leq 0,5$, sinergismo parcial cuando $FICI > 0,5$ y < 1 , adición para $FICI = 1$, indiferencia cuando $FICI > 1$ y < 4 y antagonismo para valores de $FICI > 4$ (Dastgheyb *et al.*, 2013).

Los valores de Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (FICI) de las AQs combinadas con AMB y entre sí, sobre biofilms de *C. tropicalis* bajo irradiación ($t = 0$), se muestran en la Tabla 4.23.

Tabla 4.23 Valores de Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (FICI) de las AQs combinadas con AMB y entre sí, sobre biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 bajo irradiación a $t = 0$. **(A) AQ1 + AMB**, **(B) AQ2 + AMB** y **(C) AQ1 + AQ2**.

A		Concentración en la combinación		FICI	%R
		CIMSf AQ1 ($\mu\text{g/mL}$)	CIMS AMB ($\mu\text{g/mL}$)		
1,96	0,5	0,49	0,25	0,75	65,4 \pm 1,6
			0,5	1,25	73,4 \pm 5,6
			1	2,25	63,3 \pm 1,4
		0,98	0,25	1,00	53,8 \pm 8,8
			0,5	1,50	70,8 \pm 10,4
			1	2,50	65,5 \pm 4,5
		1,96	0,25	1,50	62,2 \pm 6,5
			0,5	2,00	69,4 \pm 9,7
			1	3,00	75,2 \pm 7,1

B		Concentración en la combinación		FICI	%R
		CIMSf AQ2 ($\mu\text{g/mL}$)	CIMS AMB ($\mu\text{g/mL}$)		
15,6	0,5	7,81	0,25	1,00	74,8 \pm 2,2
			0,5	1,50	67,3 \pm 6,6
			1	2,50	71,3 \pm 3,3
		15,6	0,25	1,50	81,2 \pm 6,5
			0,5	2,00	70,1 \pm 3,4
			1	3,00	83,7 \pm 6,9
		31,3	0,25	2,51	76,8 \pm 6,3
			0,5	3,01	53 \pm 11
			1	4,01	45 \pm 10

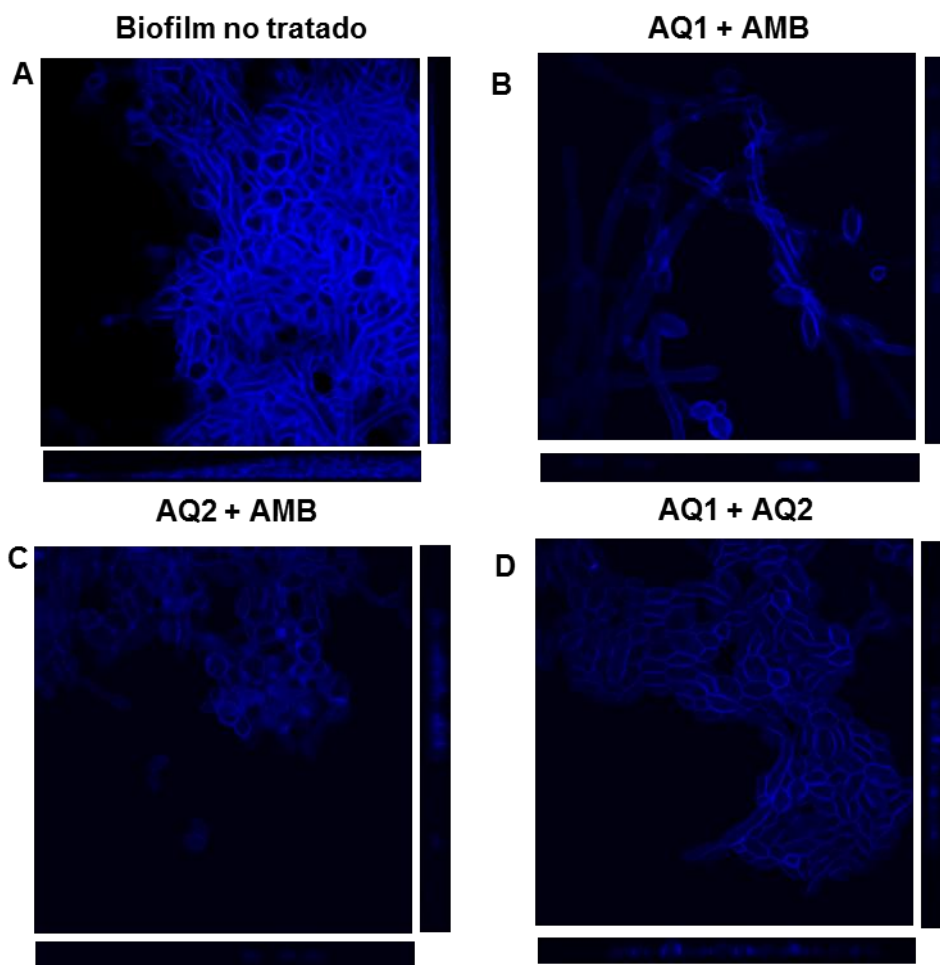
C		Concentración en la combinación		FICI	%R
		CIMSf AQ1 ($\mu\text{g/mL}$)	CIMS AQ2 ($\mu\text{g/mL}$)		
1,96	15,6	0,49	7,81	0,75	73,6 \pm 2,6
			15,6	1,25	2,3 \pm 9,9
			31,3	2,26	nd
			7,81	1,00	78 \pm 1
			15,6	1,50	65 \pm 10
			31,3	2,51	72 \pm 6
		0,98	7,81	1,50	69 \pm 10
			15,6	2,00	5 \pm 11
			31,3	3,01	nd

AQ1: rubiadina; AQ2: 1-metil éter de rubiadina; AMB: anfotericina B; CIMS/f: Concentración inhibitoria mínima sobre células sésiles/ fotoactiva, nd: no detectada

Cuando las AQs se combinaron con AMB, bajo la acción de la luz, se demostró sinergismo parcial (FICI = 0,75) para la combinación de **AQ1** SubCIMf y AMB SubCIM; adición (FICI = 1) para las combinaciones de **AQ2** SubCIMf con AMB SubCIM (Tabla 4.23). Las combinaciones de ambas AQs sólo fueron activas bajo irradiación, alcanzándose sinergismo parcial cuando se combinaron a la SubCIMf (FICI = 0,75).

La actividad antibiofilm de las combinaciones se corroboró por MCEL (Fig. 4.38, Tabla 4.24), mediante la cuantificación del espesor del biofilm de *C. tropicalis* NCPF 3111 tratado con las combinaciones respecto al biofilm no tratado. Para lo cual, las células sésiles del biofilms se tiñeron con Calcofluor-White (azul).

Figura 4.38 Imágenes de MCEL de biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 tratados con las combinaciones de: (A) rubiadina (**AQ1**) con anfotericina B (AMB), (B) 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) con AMB y (C) **AQ1** con **AQ2**, bajo irradiación antes de la incubación (t = 0).



El canal azul muestra la tinción de la pared de células sésiles con Calcofluor-White. Magnificación 60x y escala 10 μm . Representativa de 20 campos.

Se observó que el espesor del biofilm se redujo un 64 ± 6 % por acción de **AQ1** + AMB (Fig. 4.38 B), un 70 ± 4 % por efecto de **AQ2** + AMB (Fig. 4.38 C), y un 71 ± 5 % por la combinación de **AQ1** + **AQ2** (Fig. 4.38 D), en comparación con el control (Fig. 4.38 A, Tabla 4.24). Todas las combinaciones tuvieron mayor actividad antibiofilm cuando se utilizaron concentraciones SubCIM de las AQs y AMB. Estos valores fueron similares a los obtenidos por tinción con CV, expresados como reducción de UBB, en donde **AQ1** + AMB generó un $65,4 \pm 1,6$ %, **AQ2** + AMB un $74,8 \pm 2,2$ % y **AQ1** + **AQ2** un $73,6 \pm 2,6$ % de reducción (Fig. 4.37).

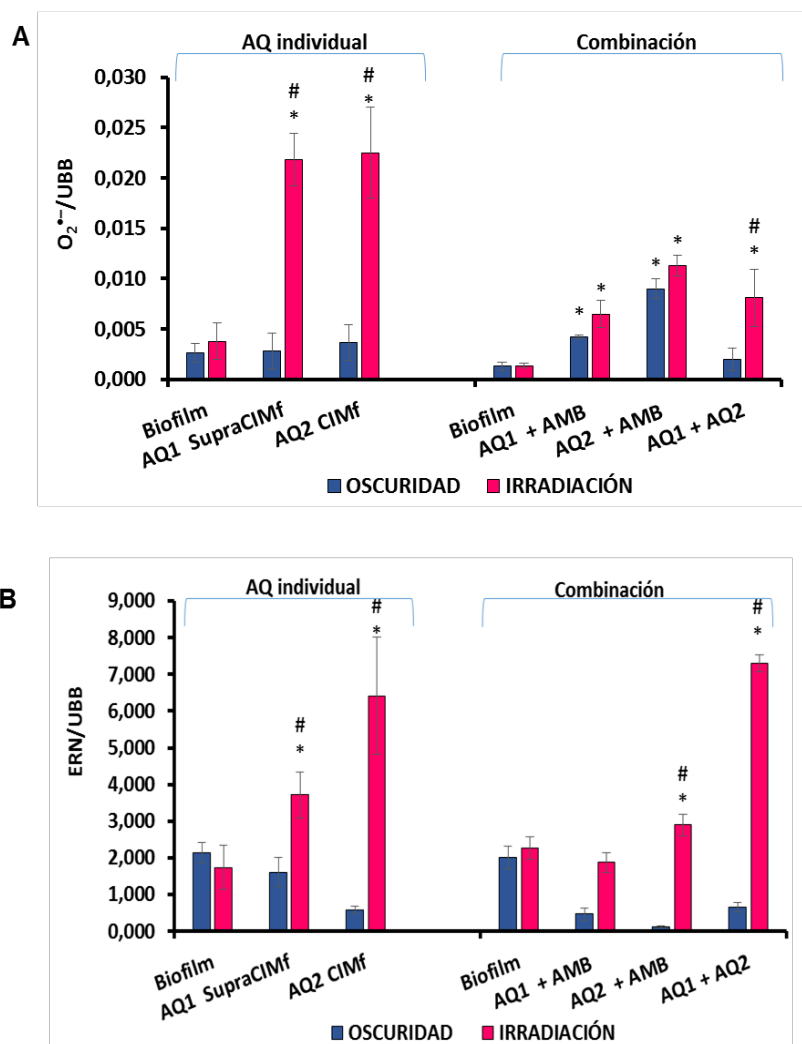
Tabla 4.24 Análisis COMSTAT de biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 tratados con las combinaciones de: (A) rubiadina (**AQ1**) con anfotericina B (AMB), (B) 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) con AMB y (C) **AQ1** con **AQ2**, bajo irradiación antes de la incubación ($t = 0$).

	AQ1 + AMB	AQ2 + AMB	AQ1 +AQ2	Biofilm no tratado
Biomasa ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)	$5,78 \pm 0,06$	$4,72 \pm 0,17$	$4,55 \pm 0,18$	$15,9 \pm 0,3$
Coefficiente de rugosidad	$0,94 \pm 0,02$	$1,0 \pm 0,10$	$1,0 \pm 0,10$	$1,0 \pm 0,1$
Distribución del espesor (μm)	$5,09 \pm 0,80$	$4,2 \pm 0,50$	$4,6 \pm 0,33$	$13,9 \pm 0,2$

B- Efecto de las combinaciones en el estrés oxidativo y nitrosativo del biofilm y respuesta de los mecanismos antioxidantes

Las combinaciones más activas de cada AQ con AMB y de **AQ1** con **AQ2** produjeron incrementos significativos en los niveles de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (expresados como ERO) y de las ERN respecto de oscuridad, destacándose la combinación **AQ1** + **AQ2** (Fig. 4.39 A y B). En todas las combinaciones (AQ + AMB y AQs entre sí) se observó un predominio de las ERN sobre las ERO; y a su vez estos valores de ERO fueron menores en comparación con los generados por las AQs en forma individual. Los valores de AMB no se graficaron porque no generan aumento de ERO ni ERN, e incluso la activación de SOD y del sistema antioxidante total (FRAP) no fue significativa (Fig. 4.40 A y B).

Figura 4.39 Desbalance redox en las combinaciones (AQ + AMB; AQ + AQ) a las concentraciones más activas, bajo irradiación y oscuridad, en comparación con las concentraciones más activas de las Aqs en forma individual. **(A)** Producción de $O_2^{\bullet-}$. **(B)** Generación de ERN.



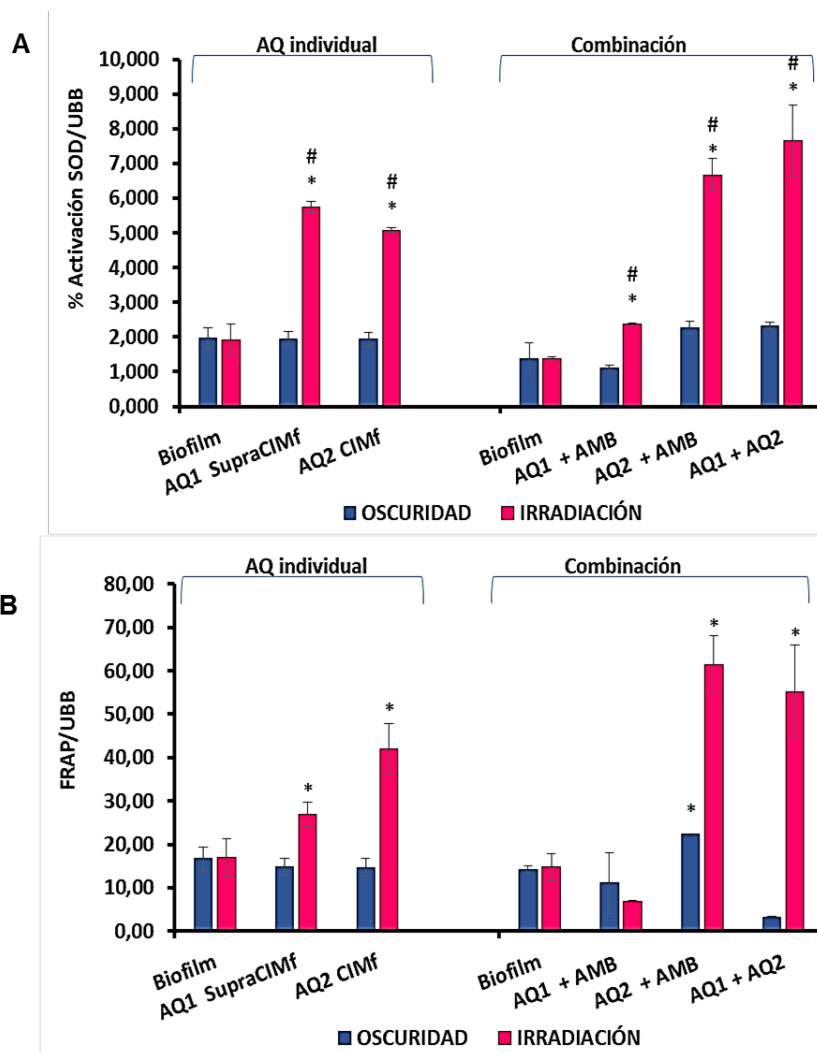
AQ1: rubiadina, AQ2: 1-metil éter de rubiadina; AMB: anfotericina B
^{*}*p*<0.05 respecto al biofilm, [#]*p*<0.05 Oscuridad vs. Irradiación.

Especialmente, para las combinaciones **AQ2 + AMB** y **AQ1 + AQ2** se observa la consecuente activación de los sistemas antioxidantes enzimáticos (SOD) y no enzimáticos (FRAP) (Fig. 4.40 A y B). Esta activación fue mayor que la promovida por las Aqs de forma individual.

Para la combinación de **AQ1 + AMB**, además de un importante incremento en ERN, que a su vez no fue significativo respecto de las otras combinaciones, sólo se observó un incremento en la activación de la SOD que podría ser suficiente para

contrarrestar la moderada producción de $O_2^{\bullet-}$ (Fig. 4.39, Fig. 4.40). Esto explicaría el menor %R alcanzado por esta combinación respecto de las otras.

Figura 4.40 Desbalance redox en las combinaciones (AQ + AMB; AQ + AQ) a las concentraciones más activas, bajo irradiación y oscuridad, en comparación con las concentraciones más activas de las Aqs en forma individual. **(A)** Activación de la enzima SOD. **(B)** Capacidad antioxidante total.

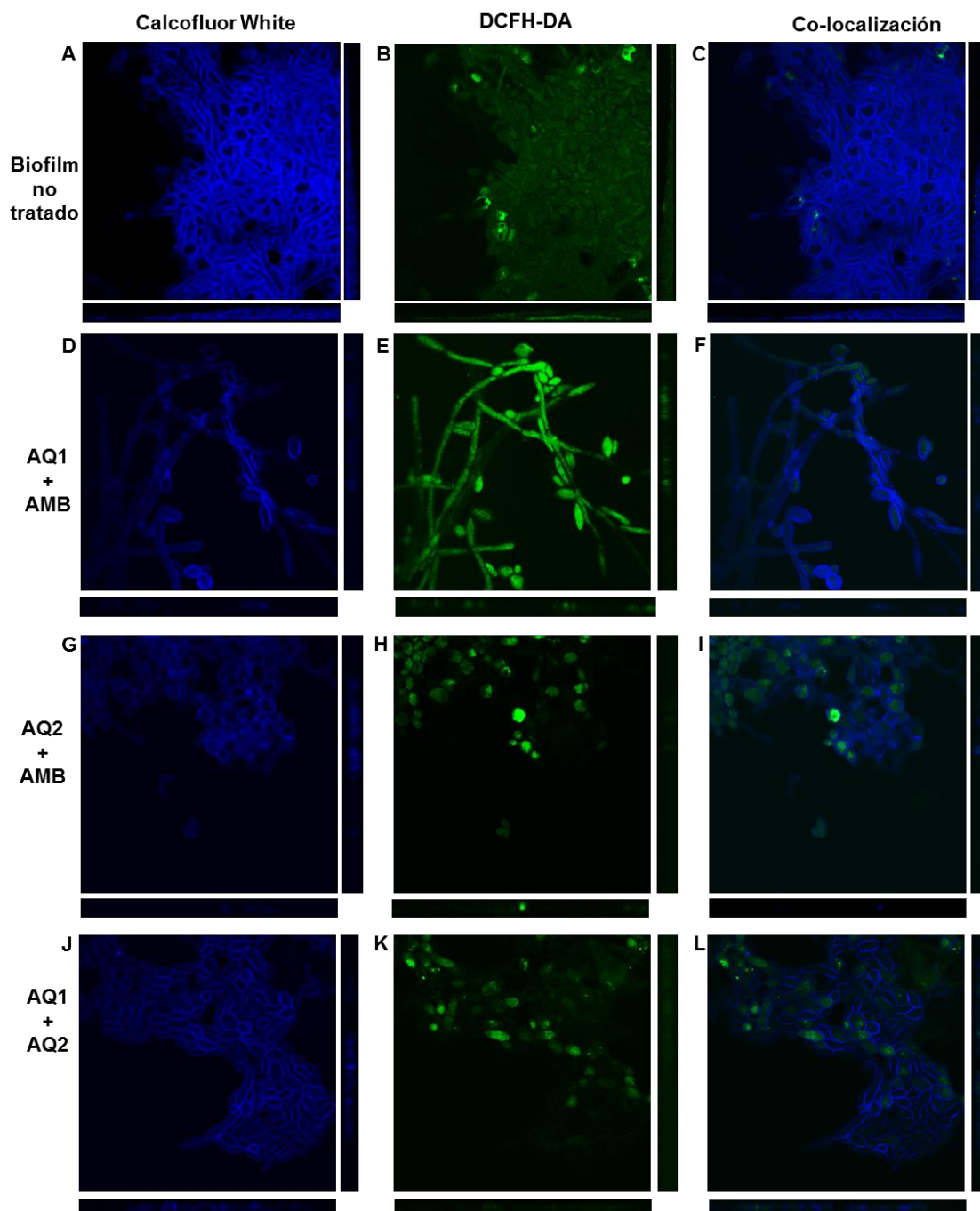


AQ1: rubiadina, AQ2: 1-metil éter de rubiadina; AMB: anfotericina B
^{*}*p*<0.05 respecto al biofilm, [#]*p*<0.05 Oscuridad vs. Irradiación.

Paralelamente, con el ensayo de MCEL se observó la producción de ERO intracelular en los biofilms tratados con las combinaciones, en comparación con las células sésiles no tratadas (Fig. 4.41). La producción de ERO se observó dentro de las células sésiles, resultando en una alta intensidad de fluorescencia del DCF en los biofilms tratados con las combinaciones de las Aqs con AMB y combinadas entre sí

bajo irradiación (Fig. 4.41 E, H y K, respectivamente), en comparación con el biofilm no tratado (Fig. 4.41 B). En las Fig. 4.41 C, F, I y L, se observa la superposición de los dos canales, la tinción de la pared de células sésiles con Calcofluor-White (A, D, G y J) y la oxidación de la sonda DCFH como un indicador de la producción de ERO dentro del biofilm (B, E, H y K), cuando las imágenes se fusionaron en una sola imagen de dos colores.

Figura 4.41 Imágenes de MCEL de biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 tratados con las combinaciones de: **(A)** rubiadina (**AQ1**) con anfotericina B (AMB), **(B)** 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) con AMB y **(C)** **AQ1** con **AQ2**, bajo irradiación antes de la incubación ($t = 0$), incluyendo la visualización de ERO intracelular.



El canal azul muestra la tinción de la pared de células sésiles con Calcofluor-White (**A, D y G**); el canal verde muestra la oxidación de la sonda DCFH como un indicador de la producción de ERO dentro del biofilm (**B, E y H**). Co-localización de los dos canales (**C, F e I**). Magnificación 60x y escala 10 μm . Representativa de 20 campos.

Midiendo las intensidades de fluorescencia de DCF (verde), en función de las células sésiles, se cuantificó la generación de ERO. Este análisis cuantitativo, muestra que las combinaciones AQs incrementaron las ERO dentro de las células, bajo la

acción de la luz. Se estableció que la generación de ERO para la combinación de **AQ1** + AMB fue 2,6 veces mayor respecto al control; 3,6 veces para **AQ2** + AMB y 3,4 veces para la combinación de las AQs (Tabla 4.25)

Tabla 4.25: Cuantificación de las ERO intracelular en biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 tratados con las combinaciones de: (A) rubiadina (**AQ1**) con anfotericina B (AMB), (B) 1-metil éter de rubiadina (**AQ2**) con AMB y (C) **AQ1** con **AQ2**, bajo irradiación antes de la incubación ($t = 0$), expresado en intensidad relativa de fluorescencia.

Condición	Oscuridad	Luz
Biofilm no tratado	0,3 ± 0,1	0,28 ± 0,13
AQ1 + AMB	0,35 ± 0,04	0,73 ± 0,11*#
AQ2 + AMB	0,38 ± 0,04	1,08 ± 0,11*#
AQ1 + AQ2	0,38 ± 0,07	0,96 ± 0,11*#

* $p < 0.005$ vs biofilm no tratado; # $p < 0.005$ irradiación vs. oscuridad.

C- Aumento en la tasa de irradiación sobre el efecto antibiofilm de las combinaciones de antraquinonas entre sí y con AMB

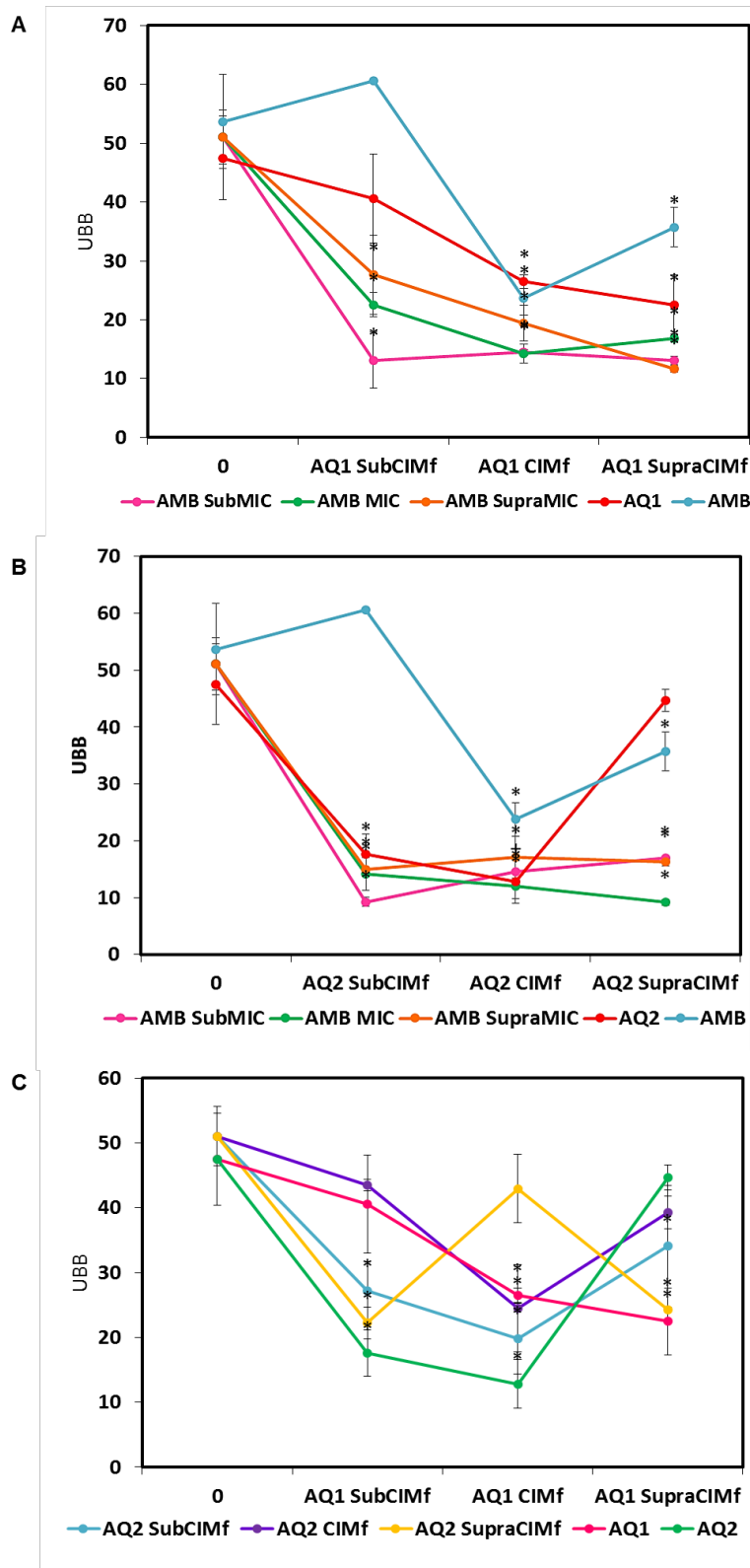
Con el tratamiento de irradiación durante la incubación, se observó una significativa potenciación del efecto para las combinaciones de cada AQ con AMB (Fig. 4.42 A y B).

La combinación de **AQ1**+AMB alcanzó un 74 ± 9 %R a la SubCIM de ambos compuestos (Fig. 4.42 A). La combinación de **AQ2** + AMB también a la SubCIM de ambas sustancias produjo una mayor disminución de las UBB, logrando un 82 ± 2 %R (Fig. 4.42 B). Sin embargo, para las combinaciones de las dos AQs, sólo se alcanzó un 50 %R a la SubCIM de ambas AQs (Fig. 4.42 C). Es importante destacar que con el tratamiento de irradiación se logra un mayor %R que al irradiar una sola vez antes de la incubación, específicamente para las combinaciones de cada AQ con AMB. Además, para la combinación de **AQ2** + AMB, ambas a la SupraCIM, no se observa el efecto de agregación manteniendo el %R alrededor del 80 %.

Figura 4.42 Efecto de las combinaciones de las AQs con AMB y entre sí sobre biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 con el tratamiento de irradiación ($t = 0, 3, 6, 24, 27, 30$ h).

Resultados y Discusión

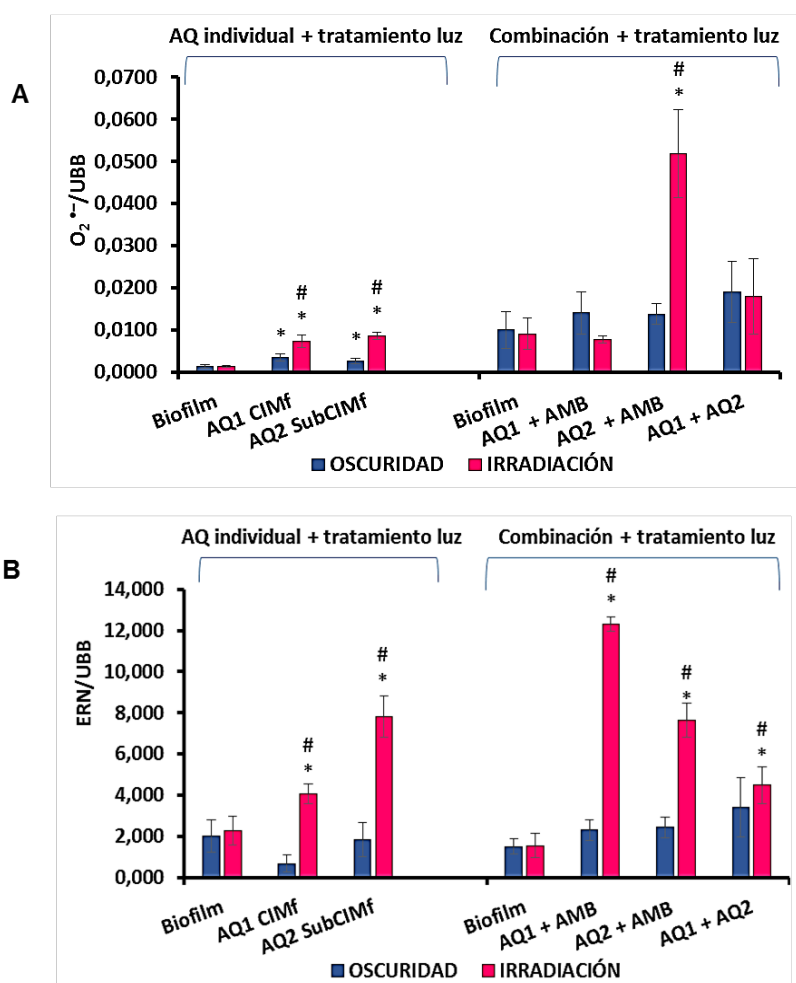
(A) rubiadina (AQ1) + AMB, (B) 1-metil éter de rubiadina (AQ2) + AMB y (C) AQ1 + AQ2.



D- Efecto de las combinaciones con tratamiento de irradiación en el estrés oxidativo y nitrosativo del biofilm y respuesta de los mecanismos antioxidantes

Cuando se analizó la producción de $O_2^{\bullet-}$, se observó que para la concentración más activa de **AQ2 + AMB** se incrementó notablemente los niveles de esta ERO, incluso en mayor proporción respecto al observado para **AQ2** sobre el biofilm cuando recibió el tratamiento de irradiación a t = 0, 3, 6, 24, 27, 30 h (Fig. 4.43 A). Por otro lado, las combinaciones de **AQ1 + AMB** y de **AQ1 + AQ2** no produjeron incremento de $O_2^{\bullet-}$.

Figura 4.43 Desbalance redox de las combinaciones a las concentraciones más activas con tratamiento de irradiación y en oscuridad (combinación + tratamiento de irradiación), en comparación con las concentraciones más activas de las Aqs en forma individual (Aqs individual + tratamiento de irradiación). (A) Producción de $O_2^{\bullet-}$. (B) Generación de ERN.

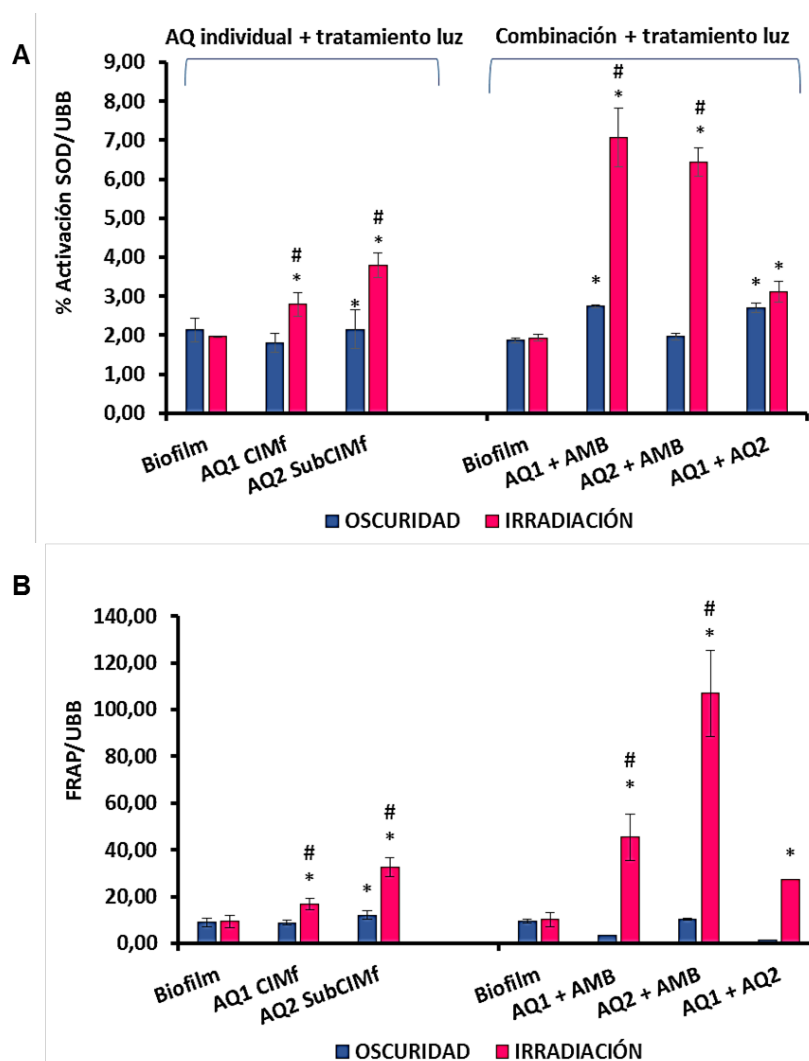


AQ1: rubiadina, AQ2: 1-metil éter de rubiadina; AMB: anfotericina B
 * $p < 0.05$ respecto al biofilm, # $p < 0.05$ Oscuridad vs. Irradiación.

Todas las combinaciones más activas aumentaron las ERN con el tratamiento de irradiación, siendo mayores los niveles para **AQ1 + AMB**, seguida por la combinación **AQ2 + AMB**, y finalmente **AQ1 + AQ2** (Fig. 4.43 B).

Además, se observó activación de la enzima SOD para todas estas combinaciones, resultando mayor su activación para las combinaciones de las AQs con AMB (Fig. 4.44 A). Los niveles de FRAP también se incrementaron con el tratamiento de irradiación; la mayor activación se observó para la combinación de **AQ2 + AMB** (Fig. 4.44 B).

Figura 4.44 Desbalance redox de las combinaciones a las concentraciones más activas con tratamiento de irradiación y en oscuridad (combinación + tratamiento de irradiación), en comparación con las concentraciones más activas de las AQs en forma individual (AQs individual + tratamiento de irradiación). **(A)** Activación de la enzima SOD. **(B)** Capacidad antioxidante total.



AQ1: rubiadina, AQ2: 1-metil éter de rubiadina; AMB: anfotericina B
^{*}p<0.05 respecto al biofilm, [#]p<0.05 Oscuridad vs. Irradiación.

Estos resultados explicarían el mayor %R obtenido para la combinación **AQ2** + AMB, debido a la elevada producción de $O_2^{\bullet-}$ que es acompañada por el importante incremento en las ERN. Aunque se genera una importante activación de los sistemas antioxidantes del biofilm, no sería suficiente para impedir el desbalance oxidativo y nitrosativo. En cambio, para la combinación **AQ1** + AMB, sólo se observa un significativo desbalance nitrosativo, ya que no hay incremento en la producción de $O_2^{\bullet-}$; el cual estaría equilibrado por la significativa activación de la SOD. La actividad de la combinación de **AQ1** + **AQ2** exhibió un comportamiento similar al de **AQ1** + AMB, donde sólo se observó un desbalance nitrosativo y un leve incremento de las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas que resultarían suficientes para contrarrestar el desbalance en el estrés generado.

Dado que sobre el biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111, ambas AQs mostraron un efecto antibiofilm fotoestimulado moderado, se propuso aumentar el %R mediante un incremento en la irradiación. Teniendo en cuenta las condiciones óptimas de irradiación establecidas, se decidió mantener el mismo intervalo de tiempo (15 min), pero repitiendo esta irradiación a distintos tiempos durante la incubación. En conclusión, este aumento en la frecuencia de irradiación del biofilm tratado con cada AQ individualmente, permitió reducir la concentración activa a la mitad. Para **AQ2** no sólo permitió el uso de concentraciones SubCIMf, si no que potenció notablemente la fotoactivación de biofilms de *C. tropicalis* (62,9 %R) en comparación a cuando se irradió antes de la incubación (t = 0, 47 %R). Por lo tanto, la capacidad de acumulación de esta AQ en el biofilm, aumentaría notablemente el efecto antifúngico, pudiendo tener un importante impacto clínico. Para curcumina, un FS natural, se demostró que la mayor inactivación del biofilms de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. dubliniensis* se produjo con irradiación a los 20 min, tiempo necesario para que el FS se acumule en el biofilm (Andrade *et al.*, 2012).

Otra estrategia para mejorar el efecto antibiofilm de estas AQs fue combinarlas con AMB. Los resultados obtenidos sugieren que cada AQ fotoactivada podría utilizarse hasta en concentraciones SubCIMf para potenciar la actividad de AMB sobre biofilms de *C. tropicalis*, como así también combinadas entre sí. De la misma manera, cuando se sumaron los efectos del tratamiento de irradiación con la combinación de cada AQ con AMB, se potenció aún más el efecto antibiofilm de las combinaciones.

Hay varios mecanismos propuestos para la sinergia de compuestos antifúngicos. La potenciación del efecto de las combinaciones podría explicarse por una lado, por el aumento de la penetración de las AQs en las células fúngicas, ya que AMB actúa generando poros en la membrana celular (Ghannoum & Rice, 1999), lo

cual le permitiría a las Aqs mayor acceso al interior de las células ejerciendo allí su acción. A su vez, el efecto de las combinaciones podría explicarse también por el diferente mecanismo de acción que presenta cada compuesto de manera individual (Johnson *et al.*, 2004). Así podría estar desarrollándose una inhibición simultánea de diferentes dianas de las células fúngicas, dado que AMB actúa a nivel de la membrana celular y la actividad antibiofilm de las Aqs está mediada por el mecanismo fotosensibilizante Tipo I, el cual se traduce en un estrés oxidativo acompañado por estrés nitrosativo generalizado (Ghannoum & Rice, 1999; Marioni *et al.*, 2016b). También se ha demostrado que la actividad de AMB parece correlacionarse con la acumulación de ERO en la célula fúngica (Delattin *et al.*, 2014). Por lo tanto, el desbalance del sistema de defensa frente al estrés oxidativo de células fúngicas por la combinación de AMB con las Aqs, incrementaría la cantidad de ERO que se acumulan, y consecuentemente mejora la actividad fungicida en el biofilm.

Es importante destacar que otro compuesto natural, la curcumina, también ha demostrado efectos sinérgicos en *C. albicans* cuando fue combinada con AMB y fluconazol. A su vez, esta sinergia estuvo relacionada con la generación de ERO (Sharma *et al.*, 2010). También se ha descrito efectos aditivos y sinérgicos al combinar TFDa, utilizando como FS una porfirina catiónica, con tobramicina o cloranfenicol sobre cepas de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Dastgheyb *et al.*, 2013).

V. CONCLUSIONES

Conclusiones

De este trabajo de tesis doctoral se puede concluir que, rubiadina y 1-metil éter de rubiadina, dos AQs naturales purificadas a partir de *H. pustulata*, con propiedades fotosensibilizantes (Núñez Montoya et al., 2005), mostraron un importante efecto antibiofilm en *C. tropicalis* bajo la acción de la luz. Este efecto estuvo regulado principalmente por el mecanismo fotosensibilizante Tipo I, generando consecuentemente un desbalance redox.

Es importante destacar que en esta tesis se ha desarrollado un modelo de biofilm de *Candida* que permite evaluar la actividad de compuestos FS y que además se podría aplicar en otras especies de *Candida*, incluso especies que son débiles productoras de biofilms.

A pesar del significativo efecto reductor de estas AQs sobre el biofilm, ninguna logró su erradicación completa. Esto podría deberse a la alta capacidad de formación de biofilms que presentaron las cepas seleccionadas, siendo esta biomasa necesaria para los estudios de los metabolitos reactivos del oxígeno y del nitrógeno. Además, como ya se mencionó, la resistencia de los biofilms es compleja ya que involucra variados mecanismos.

Por otro lado, se determinó que **AQ1** es más activa que **AQ2**, tanto en células Vero como en levaduras en forma planctónica y formando biofilms. Esto podría explicarse por la diferencia estructural, la presencia del grupo metoxi (-OCH₃) en **AQ2** le conferiría menor citotoxicidad. A su vez, **AQ2** es menos polar que **AQ1** (Comini et al., 2006). Esto favorece la capacidad de **AQ2** para atravesar membranas biológicas, así como su incorporación en el biofilm. Por lo tanto, esto explicaría el hecho de que su actividad antibiofilm se incremente cuando se aumenta la frecuencia de irradiación.

Otra estrategia aplicada para mejorar la actividad de las AQs fue la combinación con AMB, que potenció el efecto antibiofilm bajo irradiación y redujo las concentraciones activas tanto de las AQs como de AMB, respecto al tratamiento realizado con cada compuesto sólo.

Finalmente, los resultados presentados muestran que **AQ1** y **AQ2** bajo la acción de la luz actínica, producen ERO, generando un efecto fototóxico sobre biofilms de *C. tropicalis*, en concentraciones no tóxicas para células de mamífero (Vero). Por ello, se podría establecer el uso de estas AQs como potenciales fotosensibilizadores biológicos, solas o en combinación con AMB, para el tratamiento de infecciones causadas por biofilms de *C. tropicalis*.

VI. PROYECCIONES

A partir de los resultados obtenidos, se propone expandir el estudio de estos compuestos.

En una primera instancia, para complementar los estudios realizados sobre el desbalance redox (oxidativo y nitrosativo) en el biofilm, sería interesante cuantificar los niveles de otras ERO involucradas tales como H_2O_2 , $HO\cdot$; así como otras ERN como $ONOO\cdot$. Asimismo, se propone evaluar la actividad de otras enzimas que intervienen en la capacidad antioxidante, como CAT y GSH. Para complementar los estudios llevados a cabo, sería de interés el estudio del efecto de las ERO y ERN generadas sobre las principales biomoléculas (ADN, proteínas y lípidos) del biofilm. A su vez, resulta de interés estudiar como el sistema inmune responde frente al tratamiento propuesto con estas AQs.

Por otro lado, debido a la presencia de otros derivados antraquinónicos en el extracto bioactivo de *H. pustulata* (Ben), los cuales han sido caracterizados por sus propiedades fotosensibilizantes, se propone evaluar la actividad de estas otras AQs en su capacidad para inactivar fotodinámicamente biofilms de *Candida* spp.

Otras estrategias que se podrían evaluar con el fin de de mejorar la actividad de las AQs ensayadas en esta tesis (**AQ1** y **AQ2**), serían por un lado, su combinación con otros antifúngicos utilizados actualmente en los tratamientos terapéuticos. Y por el otro lado, probar su vehiculización en diferentes sistemas macro- y supermoleculares biocompatibles, de dimensiones nanométricas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abramoff, M.D., Magalhaes, P.J., Ram, S.J. (2004) "Image Processing with ImageJ". *Biophotonics International*, 11(7), 36-42.
- Administración Nacional de Alimentos y Tecnología Médica, ANMAT. Disponible en: <http://www.anmat.gov.ar/>. Último acceso septiembre 2016.
- Ahmed, M., & Khan, Z. H. (1995). Molecular Orbital Studies on Electronic Spectra of Some Substituted Anthraquinone Cation Radicals. *Acta Physica Polonica-Series A General Physics*, 87(6), 939-952.
- Al-Fattani, M. A., & Douglas, L. J. (2006). Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of medical microbiology*, 55(8), 999-1008.
- Andrade, M. C., Ribeiro, A. P. D., Dovigo, L. N., Brunetti, I. L., Giampaolo, E. T., Bagnato, V. S., & Pavarina, A. C. (2013). Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. *Archives of oral biology*, 58(2), 200-210.
- Angel Villegas, N., Baronetti, J., Albesa, I., Polifroni, R., Parma, A., Etcheverría, A., Becerra, M. C., Padola, N. & Paraje, M. G. (2013). Relevance of biofilms in the pathogenesis of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection. *The Scientific World Journal*, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/607258>.
- Angel Villegas, N., Baronetti, J.L., Albesa, I., Etcheverría, A., Becerra, M.C., Padola, N.L., Paraje, M.G. (2015). Effect of antibiotics on cellular stress generated in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 and non-O157 biofilms. *Toxicology In Vitro*, 29 (7), 1692-700.
- Arce Miranda, J. E., Sotomayor, C. E., Albesa, I., & Paraje, M. G. (2011). Oxidative and nitrosative stress in *Staphylococcus aureus* biofilm. *FEMS microbiology letters*, 315(1), 23-29.
- Astuti, R. I., Nasuno, R., & Takagi, H. (2016). Nitric oxide signaling in yeast. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(22), 9483-9497.
- Bacigalupo NM Rubiaceae. En: Cabrera AL (ed.), Flora de la Provincia de Jujuy. *Colección Científica INTA* 1993; INTA, Buenos Aires; tomo XIII, parte IX, 375-80.
- Baltazar, L. M., Ray, A., Santos, D. A., Cisalpino, P. S., Friedman, A. J., & Nosanchuk, J. D. (2015). Antimicrobial photodynamic therapy: An effective alternative approach to control fungal infections. *Frontiers in Microbiology*, 6, 202. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00202>.
- Baronetti, J. L., Villegas, N. A., Aiassa, V., Paraje, M. G., & Albesa, I. (2013). Hemolysin from *Escherichia coli* induces oxidative stress in blood. *Toxicon*, 70, 15-20.
- Baronetti, J. L., Villegas, N. A., Paraje, M. G., & Albesa, I. (2011). Nitric oxide-mediated apoptosis in rat macrophages subjected to Shiga toxin 2 from *Escherichia coli*. *Microbiology and immunology*, 55(4), 231-238.
- Barraud, N., Schleheck, D., Klebensberger, J., Webb, J. S., Hassett, D. J., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2009). Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *Journal of bacteriology*, 191(23), 7333-7342.
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1), 276-287.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.

- Bergamo, V. Z., Balbuena, E. A., Hatwig, C., Pippi, B., Dalla Lana, D. F., Donato, R. K., & Fuentefria, A. M. (2015). 1-n-Hexadecyl-3-methylimidazolium methanesulfonate and chloride salts with effective activities against *Candida tropicalis* biofilms. *Letters in applied microbiology*, *61*(5), 504-510.
- Bink, A., Kucharíková, S., Neirinck, B., Vleugels, J., Van Dijck, P., Cammue, B. P., & Thevissen, K. (2012). The nonsteroidal antiinflammatory drug diclofenac potentiates the in vivo activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Journal of Infectious Diseases*, *206*(11), 1790-1797.
- Bizerra, F. C., Nakamura, C. V., De Poersch, C., Svidzinski, T. I. E., Quesada, R. M. B., Goldenberg, S., Krieger, M. A., & Yamada-Ogatta, S. F. (2008). Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res*, *8*, 442–450.
- Bonnett, R. (2000). Chemical aspects of photodynamic therapy (Advanced chemistry texts; v1). Netherlands, British Library Cataloguing in Publication Data.
- Boots, A. W., Haenen, G. R., & Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European journal of pharmacology*, *585*(2), 325-337.
- Boren Freund E., Puerner J.A. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, *24*, 119-124.
- Brown, A. J., Haynes, K., & Quinn, J. (2009). Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. *Current opinion in microbiology*, *12*(4), 384-391.
- Calzavara-Pinton, P., Rossi, M. T., Sala, R., & Venturini, M. (2012). Photodynamic antifungal chemotherapy. *Photochemistry and photobiology*, *88*(3), 512-522. <http://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01107.x>
- Cao, Y. Y., Cao, Y. B., Xu, Z., Ying, K., Li, Y., Xie, Y., Zhu, Z. Y., Chen, W. S., Jiang, Y. Y. (2005). cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(2), 584–589.
- Choi, J. R., Jeoung, S. C., & Cho, D. W. (2004). Two-photon-induced excited-state intramolecular proton transfer process in 1-hydroxyanthraquinone. *Chemical physics letters*, *385*(5), 384-388.
- Cholewa, M., Legge, G. J. F., Weigold, H., Holan, G., & Birch, C. J. (1994). The use of a scanning proton microprobe to observe anti-HIV drugs within cells. *Life sciences*, *54*(21), 1607-1612.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Second Edition. CLSI document M27-A2 (ISBN1-56238-469-4). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2002.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Third Edition. CLSI Document M27-A3 (ISBN 1-56238-666-2). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2008.
- Colombo, A. L., Tobón, A., Restrepo, A., Queiroz-Telles, F., & Nucci, M. (2011). Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Medical mycology*, *49*(8), 785-798.
- Comini, L. R., Montoya, S. C. N., Sarmiento, M., Cabrera, J. L., & Argüello, G. A. (2007). Characterizing some photophysical, photochemical and photobiological

- properties of photosensitizing anthraquinones. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 188(2), 185-191.
- Comini, L. R., Núñez Montoya, S. C., Argüello Gustavo, A., & Cabrera, J. L. (2006). Determinación del coeficiente de partición (log P) para derivados antraquinónicos aislados de *Heterophyllaea pustulata* Hook. f.(Rubiáceas). *Acta Farmacéut. Bonaerense*, 25(2), 252-255.
- Comini, L.R., Fernandez, I.M., Rumie Vittar, N.B., Núñez Montoya, S.C., Cabrera, J.L., Rivarola, V.A. (2011). Photodynamic activity of anthraquinones isolated from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (*Rubiaceae*) on MCF-7c3 breast cancer cells. *Phytomedicine*, 18 (12), 1093-1095.
- COMSTAT. Technical University of Denmark, Kongens Lyngby, Dinamarca. Disponible en: <http://www.comstat.dk>. Último acceso marzo 2016.
- Cornistein, W., Mora, A., Orellana, N., & Caparelli, F. J., & del Castillo, M. (2013). *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no *albicans*. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(6), 380–384. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.09.011>.
- Cuéllar-Cruz, M., López-Romero, E., Ruiz-Baca, E., & Zazueta-Sandoval, R. (2014). Differential response of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to oxidative and nitrosative stresses. *Current microbiology*, 69(5), 733-739.
- Dai, T., Fuchs, B. B., Coleman, J. J., Prates, R. A., Astrakas, C., Denis, T. G. S., Ribeiro, M. S., Mylonakis, E., Hamblin, M. R., & Tegos, G. P. (2012). Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Frontiers in Microbiology*, 3(April), 1–16. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00120>.
- Dastgheyb, S. S., Eckmann, D. M., Composto, R. J., & Hickok, N. J. (2013). Photo-activated porphyrin in combination with antibiotics: Therapies against *Staphylococci*. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 129, 27–35. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.09.006>.
- De Melo, W. C., Avci, P., de Oliveria, M. N., Gupta, A., Vecchio, D., Sadasivam, M., Hamblin, M. R., & Tegos, G. P. (2013). Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 11(7), 669–693. <http://doi.org/10.1038/nature13314>.
- Del Giacco, T., Latterini, L., & Elisei, F. (2003). Photophysical and photochemical properties of 1, 2, 4-trihydroxy-9, 10-anthraquinone adsorbed on inorganic oxides. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2(6), 681-687.
- Delattin, N., Cammue, B. P. a, & Thevissen, K. (2014). Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. *Future Medicinal Chemistry*, 6(1), 77–90. <http://doi.org/10.4155/fmc.13.189>.
- Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. (2011). Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers in Surgery and Medicine*, 43(9), 927–934.
- Eisfeld, A., & Briggs, J. S. (2006). The J-and H-bands of organic dye aggregates. *Chemical Physics*, 324(2), 376-384.
- Falagas, M. E., Roussos, N., & Vardakas, K. Z. (2010). Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(11), e954-e966.

- Fanning, S., & Mitchell, A.P. (2012). Fungal Biofilms. *PLoS Pathog*, 8(4):e1002585. doi:10.1371/journal.ppat.1002585
- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. *Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18515-18517.
- Frohner, I. E., Bourgeois, C., Yatsyk, K., Majer, O., & Kuchler, K. (2009). *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Molecular microbiology*, 71(1), 240-252.
- Fujita, M., Ishida, A., Majima, T., & Takamuku, S. (1996). Lifetimes of radical anions of dicyanoanthracene, phenazine, and anthraquinone in the excited state from the selective electron-transfer quenching. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(13), 5382-5387.
- Gad, F., Zahra, T., Francis, K. P., Hasan, T., & Hamblin, M. R. (2004). Targeted photodynamic therapy of established soft-tissue infections in mice. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3(5), 451-458.
- Gambino, M., & Cappitelli, F. (2016) Mini-review: Biofilm responses to oxidative stress, *Biofouling*, 32(2), 167-178, DOI: 10.1080/08927014.2015.1134515.
- García-Vidal, C., & Carratalà, J. (2012). Patogenia de la infecció fúngica invasora. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(3), 151–158. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.011>.
- Gasparetto, A., Lapinski, T. F., Zamuner, S. R., Khouri, S., Alves, L. P., Munin, E., & Salvador, M. J. (2010). Extracts from *Alternanthera maritima* as natural photosensitizers in photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 99(1), 15-20.
- Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 501-517.
- Goldani, L. Z., & Mário, P. S. S. (2003). *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. *Journal of Infection*, 46(3), 155–160. <http://doi.org/10.1053/jinf.2002.1067>.
- Gonzales, F. P., & Maisch, T. (2012). Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. *Fungal biology*, 116(1), 1-10.
- Gouloumis, A., González-Rodríguez, D., Vázquez, P., Torres, T., Liu, S., Echegoyen, L., & Guldi, D. M. (2006). Control over charge separation in phthalocyanine-anthraquinone conjugates as a function of the aggregation status. *Journal of the American Chemical Society*, 128(39), 12674-12684.
- Graham, A. R. (1983). Fungal autofluorescence with ultraviolet illumination. *American journal of clinical pathology*, 79(2), 231-234.
- Hamblin, M. R. (2016). Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 33, 67–73. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2016.06.008>.
- Hansen EW, Martiarena CA. Contribución al estudio de la toxicidad de *Heterophyllaea pustulata* Hook “cegadera” en el ganado. Rev Inv Agropecuarias (INTA) 1967; serie 4: Patología Animal, 4, 81-113.
- He, D., Chen, B., Tian, Q., & Yao, S. (2009). Simultaneous determination of five anthraquinones in medicinal plants and pharmaceutical preparations by HPLC with fluorescence detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 49(4), 1123-1127.

- Horwitz, W. (1982). Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemistry*, 54(1), 67A-76A.
- Hughes, M. N. (2008). Chapter One-Chemistry of Nitric Oxide and Related Species. *Methods in enzymology*, 436, 3-19.
- Hurtado Bredda, F., Vaeza, N. N., & Amonini, H. R. (2005). Estrés oxidativo y nitrosativo en la sepsis. *Medicina intensiva*, 29(3), 159-165.
- International Conference on Harmonization (2005). ICH Q2A: Text on validation of analytical procedures. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073381.pdf>. Último acceso agosto 2015
- International Conference on Harmonization (2005). ICH Q2B: Validation of analytical procedures: methodology. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073384.pdf>. Último acceso agosto 2015.
- Jiménez-Banzo, A., Ragas, X., Kapusta, P., & Nonell, S. (2008). Time-resolved methods in biophysics. 7. Photon counting vs. analog time-resolved singlet oxygen phosphorescence detection. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 7(9), 1003-1010.
- Johnson, M. D., MacDougall, C., Ostrosky-Zeichner, L., Perfect, J. R., & Rex, J. H. (2004). Combination antifungal therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(3), 693-715. <http://doi.org/10.1128/AAC.48.3.693>.
- Jori, G., Fabris, C., Soncin, M., Ferro, S., Coppellotti, O., Dei, D., Fantetti, L., Chiti, G., & Roncucci, G. (2006). Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers in surgery and medicine*, 38(5), 468-481.
- Kasim, N. A., Whitehouse, M., Ramachandran, C., Bermejo, M., Lennernäs, H., Hussain, A. S., & Amidon, G. L. (2004). Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Molecular pharmaceutics*, 1(1), 85-96.
- Kojic, E. M., & Darouiche, R. O. (2004). *Candida* infections of medical devices. *Clinical microbiology reviews*, 17(2), 255-267.
- Konigheim, B. S., Beranek, M., Comini, L. R., Aguilar, J. J., Marioni, J., Cabrera, J. L., Contigiani, M.S. & Montoya, S. C. (2012a). In vitro antiviral activity of *Heterophyllaea pustulata* extracts. *Natural product communications*, 7(8), 1025-1028.
- Konigheim, B. S., Comini, L. R., Grasso, S., Aguilar, J. J., Marioni, J., Cabrera, J. L., Contigiani, M. S., & Núñez Montoya, S.C. (2012b). Determination of non-toxic and subtoxic concentration of potential antiviral natural anthraquinones. *Latin American Journal of Pharmacy*, 31(8), 51-56.
- Kothavade, R. J., Kura, M. M., Valand, A. G., & Panthaki, M. H. (2010). *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of Medical Microbiology*, 59(8), 873-880. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.013227-0>.
- Laustriat, G. (1986). Molecular mechanisms of photosensitization. *Biochimie*, 68, 771-778.
- Levine, I. N., 1996. Físicoquímica. 5ª edición. McGraw-Hill. Madrid, España

- Liu A-L, Shu S-H, Qin H-L, Lee SMY, Wang Y-T, Du G-H. (2009). In vitro anti-influenza viral activities of constituents from *Caesalpinia sappan*. *Planta Medica*, 75, 337–339.
- López-Chicón, P., Paz-Cristobal, M. P., Rezusta, A., Aspiroz, C., Royo-Cañas, M., Andres-Ciriano, E., Gilaberte, Y., Agut, M., & Nonell, S. (2012). On the mechanism of *Candida* spp. photoinactivation by hypericin. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11(6), 1099-1107.
- Luque, A. G., Biasoli, M. S., Tosello, M. E., Binolfi, A., Lupo, S., & Magaró, H. M. (2009). Oral yeast carriage in HIV-infected and non-infected populations in Rosario, Argentina. *Mycoses*, 52(1), 53-59.
- Mamone, L., Sáenz, D., Vallecorsa, P., Batlle, A., Casas, A., & Di Venosa, G. (2014). Photoprotective Effect of the Plant *Collaea argentina* against Adverse Effects Induced by Photodynamic Therapy. *International Journal of Photoenergy*, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/436463>.
- Marchesi, E., Rota, C., Fann, Y. C., Chignell, C. F., & Mason, R. P. (1999). Photoreduction of the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein: a spin trapping and direct electron spin resonance study with implications for oxidative stress measurements. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1), 148-161.
- Marioni, J., Arce, J. E., Cabrera, J. L., Paraje, M. G., & Núñez Montoya, S. C. (2016a). Reduction of *Candida tropicalis* biofilm by photoactivation of a *Heterophyllaea pustulata* extract. *Pharmaceutical biology*, 54(12):2791-2801.
- Marioni, J., da Silva, M. A., Cabrera, J. L., Montoya, S. C. N., & Paraje, M. G. (2016b). The anthraquinones rubiadin and its 1-methyl ether isolated from *Heterophyllaea pustulata* reduces *Candida tropicalis* biofilms formation. *Phytomedicine*, 23(12), 1321-1328.
- Martí, C., Jürgens, O., Cuenca, O., Casals, M., & Nonell, S. (1996). Aromatic ketones as standards for singlet molecular oxygen O₂ (1Δg) photosensitization. Time-resolved photoacoustic and near-IR emission studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 97(1), 11-18.
- Mattila, H., Khorobrykh, S., Havurinne, V., & Tyystjärvi, E. (2015). Reactive oxygen species: reactions and detection from photosynthetic tissues. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 152, 176–214. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.10.001>
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119-128.
- Meerovich, I., Muthukrishnan, N., Johnson, G. A., Erazo-Oliveras, A., & Pellois, J. P. (2014). Photodamage of lipid bilayers by irradiation of a fluorescently labeled cell-penetrating peptide. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(1), 507-515.
- Mishra, N., Prasad, T., Sharma, N., Payasi, A., Prasad, R., Gupta, D., & Singh, R. (2007). Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 54(3), 201-235.
- Missall, T. A., Lodge, J. K., & McEwen, J. E. (2004). Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryotic cell*, 3(4), 835-846.
- Morace, G., Perdoni, F., & Borghi, E. (2014). Antifungal drug resistance in *Candida* species. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2(4), 254-259.

- Mukherjee, P. K., Zhou, G., Munyon, R., & Ghannoum, M. A. (2005). *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. *Medical mycology*, 43(3), 191-208.
- Nagy, E.M., Via, L.D., Ronconi, L., Fregona, D. (2010). Recent advances in PUVA photochemotherapy and PDT for the treatment of cancer 1863–1876. *Current pharmaceutical design*, 16(16), 1863-1876.
- Nett, J. E., & Andes, D. (2015). Fungal Biofilms: In vivo models for discovery of anti-biofilm drugs. *Microbiology Spectrum*, 3(3), 1–25. <http://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0008-2014>.
- Nithyanand, P., Shafreen, R. M. B., Muthamil, S., & Pandian, S. K. (2015). Usnic acid, a lichen secondary metabolite inhibits Group A *Streptococcus* biofilms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(1), 263-272.
- Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Tobón, A. M., Restrepo, A., & Colombo, A. L. (2010). Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*, 51(5), 561–570. <http://doi.org/10.1086/655683>.
- Núñez Montoya, S. C., Agnese, A. M., & Cabrera, J. L. (2006). Anthraquinone Derivatives from *Heterophyllaea pustulata*. *Journal of natural products*, 69(5), 801-803.
- Núñez Montoya, S. C., Comini, L. R., Sarmiento, M., Becerra, C., Albesa, I., Argüello, G. A., Cabrera, J.L. (2005). Natural anthraquinones probed as Type I and Type II photosensitizers: singlet oxygen and superoxide anion production. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 78, 77–83. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2004.09.009>.
- Núñez Montoya, S.C. (2002). Metabolitos secundarios en *Heterophyllaea pustulata* Hook.f. (Rubiáceas). [Tesis Doctoral]. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Núñez Montoya, S.C., Agnese, A.M., Pérez, C., Tiraboschi, I.N., & Cabrera, J.L. (2003). Pharmacological and toxicological activity of *Heterophyllaea pustulata* anthraquinone extracts. *Phytomedicine*, 10, 569-574.
- Núñez Montoya, S.C., Comini, L.R., Rumie Vittar, B., Fernández, I.M., Rivarola, V.A., Cabrera, J.L. (2008). Phototoxic effects of *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). *Toxicon*, 51, 1409–1415.
- O’Riordan, K., Akilov, O. E., & Hasan, T. (2005). The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(4), 247-262.
- Ochsner, M. (1997). Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 39(1), 1-18.
- Ogilby, P. R., & Foote, C. S. (1982). Chemistry of singlet oxygen. 36. Singlet molecular oxygen ($^1\Delta_g$) luminescence in solution following pulsed laser excitation. Solvent deuterium isotope effects on the lifetime of singlet oxygen. *Journal of the American Chemical Society*, 104(7), 2069-2070.
- Ooi, L. S., Wang, H., Luk, C. W., & Ooi, V. E. (2004). Anticancer and antiviral activities of *Youngia japonica* (L.) DC (*Asteraceae*, *Compositae*). *Journal of ethnopharmacology*, 94(1), 117-122.
- O’Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular microbiology*, 28(3), 449-461.

- Palit, D. K., Pal, H., Mukherjee, T., & Mittal, J. P. (1990). Photodynamics of the S1 state of some hydroxy-and amino-substituted naphthoquinones and anthraquinones. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, *86*(23), 3861-3869.
- Panichayupakaranant, P., Sakunpak, A., & Sakunphueak, A. (2009). Quantitative HPLC determination and extraction of anthraquinones in *Senna alata* leaves. *Journal of chromatographic science*, *47*(3), 197-200.
- Paraje, M.G., Correa, Albesa, I., Sotomayor, C.E. (2009). Lipase of *Candida albicans* induces activation of NADPH oxidase and L-arginine pathways on resting and activated macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *390*(2), 263-268. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.09.104.
- Paraje, M.G., Correa, S.G., Theumer, M., Renna, M.S., Sotomayor, C.E. (2008). *Candida albicans* lipase: potential role in virulence and fungal pathogenesis. *Canadian Journal of Microbiology*, *54*(8), 647-659.
- Paz-Cristobal, M.P., Gilaberte, Y., Alejandre, C., Pardo, J., Revillo, M.J., Rezusta, A. (2014). In vitro fungicidal photodynamic effect of hypericin on *Trichophyton* spp. *Mycopathologia*, *178*(3-4), 221-225.
- Paz-Cristobal, M.P., Royo, D., Rezusta, A., Andres-Ciriano, E., Alejandre, M.C., Meis, J.F., Revillo, M.J., Aspiroz, C., Nonell S., Gilaberte Y. (2013). Photodynamic fungicidal efficacy of hypericin and dimethyl methylene blue against azole-resistant *Candida albicans* strains. *Mycoses*, *57*(1), 35-42. doi:10.1111/myc.12099.
- Peralta, M. A., da Silva, M. A., Ortega, M. G., Cabrera, J. L., & Paraje, M. G. (2016). Usnic Acid Activity on Oxidative and Nitrosative Stress of Azole-Resistant *Candida albicans* Biofilm. *Planta Medica*. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0042-116442>.
- Peralta, M.A., da Silva, M.A., Ortega, M.G., Cabrera, J.L., Paraje, M.G. (2015). Antifungal activity of a prenylated flavonoid from *Dalea elegans* against *Candida albicans* biofilms. *Phytomedicine*, *22* (11), 975-80.
- Permán, J., & Salavert, M. (2012). Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *30*(2), 90-98.
- Permana, D., Abas, F., Ahmad, R., & Takayama, H. (2003). Antioxidative Constituents of *Hedyotis diffusa* Willd. *Natural Product Sciences*, *9*(1), 7-9.
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, *20*(1), 133-163. <http://doi.org/10.1128/CMR.00029-06>.
- Pfaller, M. A., Castanheira, M., Messer, S. A., Moet, G. J., & Jones R. N. (2010). Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *68*(3): 278-283.
- Pianalto, K. M., & Alspaugh, J. A. (2016). New Horizons in antifungal therapy. *Journal of Fungi*, *2*(4), 26.
- Pierce, C. G., Uppuluri, P., Tristan, A. R., Wormley, F. L., Mowat, E., Ramage, G., & Lopez-Ribot, J. L. (2008). A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature protocols*, *3*(9), 1494-1500.
- Powers, S. K., Ji, L. L., Kavazis, A. N., & Jackson, M. J. (2011). Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Comprehensive Physiology*, *1*(2):941-69. doi: 10.1002/cphy.c100054.

- Quattrocchi, O.A., de Andrizzi, S.I.A., & Laba, R.F. (1992). Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro S.A., Buenos Aires, Argentina. pp 301-328.
- Ragàs, X., Agut, M., & Nonell, S. (2010). Singlet oxygen in *Escherichia coli*: new insights for antimicrobial photodynamic therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(5), 770-776.
- Rajendran, M. (2016). Quinones as photosensitizer for photodynamic therapy: ROS generation, mechanism and detection methods. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 13, 175-187.
- Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., & Williams, C. (2012). Fungal biofilm resistance. *International Journal of Microbiology*, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/528521>.
- Rezusta, A., Lopez-Chicon, P., Paz-Cristobal, M.P., Alemany-Ribes, M., Royo-Diez, D., Agut, M., Semino, C., Nonell, S., Revillo, M.J., Aspiroz, C., Gilaberte, Y. (2012). *In vitro* fungicidal photodynamic effect of hypericin on *Candida* species. *Photochemistry and Photobiology*. 88(3), 613–619.
- Ridnour, L.A. , Thomas, D.D. , Mancardi, D. , Espey, M.G. , Miranda, K.M. , Paolucci, N. , Feelisch, M. , Fukuto, J. , Wink, D.A.. (2004). The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biological Chemistry*, 385(1), 1–10.
- Román, E., Prieto, D., Martín, R., Correia, I., Mesa Arango, A. C., Alonso-Monge, R., Zaragoza, O., & Pla, J. (2016). Role of catalase overproduction in drug resistance and virulence in *Candida albicans*. *Future Microbiology*, 11(10), 1279-1297.
- Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Giannini, M. M. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of medical microbiology*, 62(1), 10-24. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>
- Schmidt, R., Tanielian, C., Dunsbach, R., & Wolff, C. (1994). Phenalenone, a universal reference compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen O₂ (1Δg) sensitization. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 79(1), 11-17.
- Scorzoni, L., Sangalli-Leite, F., de Lacorte Singulani, J., Costa-Orlandi, C. B., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2016). Searching new antifungals: The use of *in vitro* and *in vivo* methods for evaluation of natural compounds. *Journal of microbiological methods*, 123, 68-78. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.02.005>.
- Shida T., (1988). Electronic absorption spectra of radical ions. (Vol 34). Elsevier Science Ltd.
- Sifuentes-osornio, J., Corzo-león, D. E., & Ponce-de-león, L. A. (2012). Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. *Curr Fungal Infect Rep*, 6(1): 23–34. <http://doi.org/10.1007/s12281-011-0081-7>.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS microbiology reviews*, 36(2), 288-305.
- Silva, Z. S., Bussadori, S. K., Fernandes, K. P. S., Huang, Y. Y., & Hamblin, M. (2015). Animal models for photodynamic therapy (PDT). *Bioscience reports*, 35(6). pii: e00265. doi: 10.1042/BSR20150188.

- Skoog, D. A., Holler F. J., Nieman, T. A., 2008. Principios de análisis instrumental. 6^o edición. Cengage Learning Editores. D.F., México.
- Smulevich, G., Foggi, P., Feis, A., & Marzocchi, M. P. (1987). Fluorescence excitation and emission spectra of 1, 8-dihydroxyanthraquinone-d0 and-d2 in n-octane at 10 K. *The Journal of chemical physics*, 87(10), 5664-5669.
- Snyder, J. W., Skovsen, E., Lambert, J. D., Poulsen, L., & Ogilby, P. R. (2006). Optical detection of singlet oxygen from single cells. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8(37), 4280-4293.
- Spampinato, C., & Leonardi, D. (2013). *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed research international*, 2013. <http://doi.org/10.1155/2013/204237>.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I., et al. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), 891e899. http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.
- Tillmann, A., Gow, N. A., & Brown, A. J. (2011). Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in yeast. *Biochemical Society Transactions*, 39(1), 219-223.
- Tobudic, S., Kratzer, C., Lassnigg, A., & Presterl, E. (2012). Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses*, 55(3), 199-204.
- Tsikis, D. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*, 851(1), 51-70.
- Valentín, A., Cantón, E., Pemán, J., Fernandez-Rivero, M. E., Tormo-Mas, M. A., & Martínez, J. P. (2016). In vitro activity of anidulafungin in combination with amphotericin B or voriconazole against biofilms of five *Candida* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(12):3449-3452.
- Vandeputte, P., Ferrari, S., & Coste, A. T. (2012). Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International Journal of Microbiology*, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/713687>.
- Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, M. 1984, Plant Drug Analysis. 2^o edición Springer Verlag. Berlin, Alemania.
- Wainwright, M., Maisch, T., Nonell, S., Plaetzer, K., Almeida, A., Tegos, G. P., & Hamblin, M. R. (2017). Photoantimicrobials—are we afraid of the light?. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(2):e49-e55. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30268-7.
- Wei S-Y, Yao W-X, Ji W-Y, Wei J-Q, Peng S-Q. (2013). Qualitative and quantitative analysis of anthraquinones in rhubarbs by high performance liquid chromatography with diode array detector and mass spectrometry. *Food Chemistry*, 141, 1710–1715.
- Wei, G. X., Xu, X., & Wu, C. D. (2011). In vitro synergism between berberine and miconazole against planktonic and biofilm *Candida* cultures. *archives of oral biology*, 56(6), 565-572.
- Yoon, I., Li, J. Z., & Shim, Y. K. (2013). Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clinical endoscopy*. 46(1), 7-23.
- Zhang, Y., Zhu, Y., Chen, J., Wang, Y., Sherwood, M. E., Murray, C. K., Vrahas, M. S., Hooper, D. C., Hamblin, M. R. & Dai, T. (2016). Antimicrobial blue light inactivation of *Candida albicans*: in vitro and in vivo studies, *Virulence*, 3;7(5):536-45. DOI: 10.1080/21505594.2016.1155015

Bibliografía

Zhou, Y., Wang, G., Li, Y., Liu, Y., Song, Y., Zheng, W., Zhang, N., Hu, X., Yan, S. & Jia, J. (2012). *In vitro* interactions between aspirin and amphotericin B against planktonic cells and biofilm cells of *Candida albicans* and *C. parapsilosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(6), 3250-3260.

Los resultados presentados en esta tesis dieron lugar a los siguientes trabajos:

Artículos científicos publicados

- BS Konigheim, LR Comini, S Grasso, JJ Aguilar, J Marioni, MS Contigiani, SC Núñez Montoya. (2012). Determination of non-toxic and subtoxic concentrations of potential antiviral natural anthraquinones. *Latin American Journal of Pharmacy*, 31(1), 51-56.
- BS Konigheim, M Beranek, LR Comini, JJ Aguilar, J Marioni, MS Contigiani, SC Núñez Montoya, (2012). *In vitro* antiviral activity of *Heterophyllaea pustulata* extracts. *Natural Product Communications*, 7(8), 1025-1028.
- Juliana Marioni, Julio E. Arce, José L. Cabrera, María G. Paraje, Susana C. Núñez Montoya, (2016). Reduction of *Candida tropicalis* biofilm by photoactivation of a *Heterophyllaea pustulata* extract. *Pharmaceutical Biology*, 54(12), 2791-2801. <http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2016.1183683>.
- Juliana Marioni, María Angel da Silva, José L. Cabrera, Susana C. Núñez Montoya, María G. Paraje, (2016). The anthraquinones rubiadin and its 1-methyl ether isolated from *Heterophyllaea pustulata* reduce *Candida tropicalis* biofilms formation. *Phytomedicine*, 23(15), 1321-1328. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2016.07.008>.

Presentaciones a congresos

1 Nacionales

- * XII CONGRESO ARGENTINO DE MICOLOGÍA. Posadas, 15-17/06/2011. Misiones, Argentina.
 - 1) Actividad antifúngica "in vitro" de extractos de *Heterophyllaea pustulata* sobre biofilms de *Candida*. Marioni J, Arce Miranda JE, Botiglieri M, Núñez Montoya SC, Paraje MG.
- * IX CONGRESO DE MICROBIOLOGÍA GENERAL. SOCIEDAD ARGENTINA DE MICOLOGÍA, SAMIGE. UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO, UNR. Rosario, 05-07/08/2013. Rosario, Argentina.
 - 2) Mode of action of extracts from a phototoxic plant on fungal biofilms. Juliana, Marioni; Julio E. Arce Miranda, Laura R. Comini; José L. Cabrera; Susana C. Núñez Montoya; María G. Paraje.
- * II REUNIÓN DE FOTOBIOLOGOS MOLECULARES. GRUPO ARGENTINO DE FOTOBIOLOGÍA, GRAFOB. UNC. Córdoba, 25-28/10/2013. Córdoba, Argentina.
 - 3) *In vitro* antifungal activity of extracts from a phototoxic plant species on *Candida no albicans* biofilms. Juliana, Marioni; Julio E. Arce Miranda, Laura R. Comini; José L. Cabrera; María G. Paraje; Susana C. Núñez Montoya.

*XI CONGRESO DE MICROBIOLOGÍA GENERAL. SAMIGE. Córdoba, 05-07/08/2015. Argentina.

4) Photodynamic action of 1-methyl ether rubiadin, a natural anthraquinone over *Candida tropicalis* biofilms. Marioni J, Cabrera JL, Núñez Montoya SC, Paraje MG.

* III REUNIÓN DE FOTOBIOLOGOS MOLECULARES. GRUPO ARGENTINO DE FOTOBIOLOGÍA, GRAFOB. UNC. Córdoba, 28-31/08/2016. Córdoba, Argentina.

5) Efecto de la frecuencia de irradiación de antraquinonas en la fotoinactivación de *Candida tropicalis* biofilms. Juliana, Marioni; Laura R. Comini; José L. Cabrera; María G. Paraje; Susana C. Núñez Montoya.

6) Producción de oxígeno singlete de productos naturales bioactivos de *Heterophyllaea pustulata*. Juliana, Marioni; Leandro Mamone, Adriana Casas, Susana C. Núñez Montoya.

2 Internacionales

*X SIMPOSIO ARGENTINO Y XIII SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE FARMACOBOTANICA. Córdoba, 24-26/11/2010. Argentina.

1) Estudio químico comparativo de diferentes órganos de *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). Chemical study of different organs from *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). Marioni J, Fernández I, Rivarola V, Cabrera JL, Núñez Montoya SC.

* XXII SIMPOSIO DE PLANTAS MEDICINALES DE BRASIL. Bento Gonçalves (RS), 18-21/09/2012. Bento Gonçalves, Brasil.

2) Actividad antifúngica *in vitro* de una antraquinona natural sobre biofilms de *Candida tropicalis*. J. Marioni, J.E. Arce Miranda, L.R. Comini, J.L. Cabrera, M.G. Paraje, S. C. Núñez Montoya.

*XI ENCUENTRO LATINOAMERICANO DE FOTOQUÍMICA Y FOTOBIOLOGÍA, ELAFOT. Córdoba, 01-05/10/12. Córdoba, Argentina.

3) Singlet oxygen generation of a natural anthraquinone. Comini, Laura R.; Marioni, Juliana; Núñez Montoya, Susana C.; Fernández, Ivana; Rivarola, Viviana; Garagiola, Betania; Borsarelli Claudio D.; Cabrera José L.

* 16th INTERNATIONAL CONGRESS ON PHOTOBIOLOGY. Córdoba, 08-12/09/14. Córdoba, Argentina.

4) Rubiadin: A natural photosensitizing anthraquinone with antifungal activity in vitro. J. Marioni, J.E. Arce Miranda, M. L. Mugas, J.L. Cabrera, M.G. Paraje, S. C. Núñez Montoya

*XXII JORNADAS JÓVENES INVESTIGADORES. Asociación de Universidades del Grupo Montevideo, AUGM. Valparaíso, Chile. Septiembre 29, 30 y 1^o de octubre de 2014.

5) "Actividad antifúngica de una antraquinona sobre biofilms de *Candida no albicans*". Cabrera José L; Marioni Juliana; Núñez Montoya Susana C; Paraje María G.

*XII ENCUESTRO LATINOAMERICANO DE FOTOQUÍMICA Y FOTOBIOLOGÍA, ELAFOT. Maresias, 26-30/04/15. Maresias, Brazil.

- 6) Reduction of *Candida tropicalis* biofilms by the photodynamic action of Rubiadin a natural anthraquinone. J. Marioni, L.R. Comini, J.L. Cabrera, M. G. Paraje, S.C. Núñez Montoya.

*25th INTER-AMERICAN PHOTOCHEMICAL SOCIETY MEETING, I-APS. Santiago de Chile, 24-27/05/16. Santiago de Chile, Chile.

- 7) Photo-inactivation mechanism over *Candida* biofilms by natural anthraquinones. Juliana Marioni, Bresolí- Obach Roger, Paraje María G, Nonell Santi, Susana C. Núñez Montoya.

*XXIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA y XIV CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGIA, ALAM-CAM 2016. IV CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA DE MEDICAMENTOS Y COSMETICOS- CLAMME. REUNION DE LA SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE TUBERCULOSIS Y OTRAS MICOBACTERIOSIS (SLAMTB). Rosario, 26-30/09/16. Santa Fe, Argentina.

- 8) Combinación de antifúngicos y terapia fotodinámica antimicrobiana sobre biofilms de *Candida tropicalis*. J Marioni, JL Cabrera, SC Núñez Montoya, MG Paraje.

3 Avances de presentaciones a Congresos (Proceedings)

1) Marioni J, Arce Miranda JE, Comini LR, Paraje MG, Núñez Montoya SC. Actividad *in vitro* de extractos de *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) sobre biofilms de *Candida no albicans*. Libro de Resúmenes – SAFE (2011), p. 49.

2) Marioni J, Arce Miranda JE, Comini LR, Núñez Montoya SC, Paraje MG. Actividad *in vitro* de extractos de *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) sobre biofilms de *Candida no albicans*. Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (2012), 69 (2), 169-170.

3) Marioni J, Mugas M., Comini L., Cabrera J., Núñez Montoya S., Paraje M. Rubiadin 1-methyl ether: A natural photosensitizing anthraquinone with antifungal activity *in vitro*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, IJPSR (2014).

4) Juliana Marioni, José L. Cabrera, Maria G. Paraje, Susana C. Núñez Montoya. Effect of irradiation frequency in photodynamic inactivation of *Candida tropicalis* biofilms by natural anthraquinones in combination with antifungals. *MEDICINA* (2016), 76(1), 279-280.

ANEXO I: Preparación de soluciones

Agar Sabouraud Glucosado (Britania)

Componentes:

Pluripeptona.....	10,0 g
Glucosa.....	40,0 g
Cloranfenicol.....	0,05 g
Agar.....	15,0 g
Agua destilada (H ₂ O-D).....	c.s.p 1000 mL
pH: 5,6 ± 0,2	

Preparación: Suspender 65 g del polvo formado por pluripeptona, glucosa y cloranfenicol en H₂O-D. Reposar 5 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 min para la disolución total. Completar con H₂O-D hasta volumen final de 1 L. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min. Mantener en lugar fresco (2- 8 °C).

Buffer Fosfato Salino (PBS)

Componentes:

NaCl	8,0 g
KCl.....	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
H ₂ O-deuterada	c.s.p 1000 mL
pH: 7,2 ± 0,2	

Preparación: Se pesan las sales y se solubilizan.

Caldo Sabouraud Glucosado (Britania)

Componentes:

Tripteína	5,0 g
Peptona de carne.....	5,0 g
Glucosa	20,00 g
H ₂ O-D. c.s.p.....	1000 mL

Preparación: Suspender 30 g del polvo en H₂O-D. Reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición para la disolución total. Completar con H₂O-D hasta volumen final de 1 L. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min. Mantener en lugar fresco (2- 8 °C).

CRISTAL VIOLETA

Solución A:

Cristal violeta.....	1 g.
Etanol (95%).....	20 mL.

Solución B:

Oxalato de amonio.....	0,8 g.
H ₂ O-D.....	80 mL.

Preparación: Mezclar cada uno de los solutos en su disolvente respectivo. Dejar la solución de oxalato de amonio en reposo durante una noche o calentar ligeramente hasta que se solubilice. Mezclar las dos soluciones y filtrar. Mantener a temperatura ambiente protegido de la luz.

Medio de Crecimiento

Componentes:

Medio Mínimo Esencial (MEM).....	9,6 g
L- glutamina.....	0,3 g
Bicarbonato sódico.....	2,2 g
SFB.....	10 %
Gentamicina.....	50 µg/mL
H ₂ O-D.....	c.s.p 1000 mL

Preparación: Disolver las cantidades indicadas en 900 mL de H₂O-D agitando hasta su completa disolución. Completar a volumen final de 1000 mL con H₂O-D. Ajustar el pH a 7,4 utilizando bicarbonato. Filtrar estérilmente. Mantener en lugar fresco (2- 8 °C).

Medio de Mantenimiento

Contiene los mismos nutrientes que el medio de crecimiento, pero lleva sólo 2% de SFB.

RPMI

Componentes:

RPMI 1640.....	10,40 g
Tampón MOPS.....	34,53 g
H ₂ O-D.....	1000 mL

Preparación: Disolver en 900 mL de H₂O-D las cantidades indicadas, agitando hasta su completa disolución. Ajustar el pH a 6,9- 7,1, utilizando NaOH 1N o 10N. Completar a volumen final de 1000 mL con H₂O-D. Filtrar estérilmente. Mantener refrigerado hasta su uso (4-8 °C, máximo 6 meses).