

EVALUACIÓN DE DENDRÍMEROS A BASE DE PORFIRINA EN LA INACTIVACIÓN FOTODINÁMICA DE AGENTES PATÓGENOS EN AGUA

Data de aceite: 03/07/2023

Raquel E. Hernández-Ramírez

Tecnológico Nacional de México-
Tecnológico de Estudios Superiores de
Coacalco
Coacalco Estado de México

Jazmín N. Castillo-Cervantes

Instituto Mexicano del Petróleo,
Laboratorio de análisis ambientales
Ciudad de México

Diana Rosa Gómora Herrera

Instituto Mexicano del Petróleo,
Laboratorio de análisis ambientales
Ciudad de México

Octavio Trejo-Chávero

Tecnológico Nacional de México-
Tecnológico de Estudios Superiores de
Coacalco
Coacalco Estado de México

Lilia A. Ríos Alducin

Tecnológico Nacional de México-
Tecnológico de Estudios Superiores de
Coacalco
Coacalco Estado de México

Susana Lezama Álvarez

Tecnológico Nacional de México-
Tecnológico de Estudios Superiores de
Coacalco
Coacalco Estado de México

RESUMEN: Las propiedades fotofísicas de las porfirinas tetrafenil mesosustituidas con ramas PAMAM y un derivado modificado periféricamente con grupos tiazol se estudiaron en solución DMF. Los estados singulete de los compuestos se caracterizaron por medio de espectroscopias de absorción y fluorescencia. La cinética de desintegración del estado del triplete y los espectros de absorción del triplete-triplete se determinaron mediante fotólisis flash láser. Los espectros de estado de triplete mostraron una absorbancia intensa con un máximo de alrededor de 450 nm y otras bandas en la región s de 300-400 y 500-800 nm, para todos los compuestos. El rendimiento cuántico del triplete s (ϕ_T) y el rendimiento cuántico singulete s (ϕ_Δ) se estimaron en ca. 0.50 y aprox. 0.45, respectivamente. De los resultados actuales se infiere que el estado triplete s de estas moléculas permite una transferencia eficiente de energía al oxígeno molecular, lo que las hace adecuadas para la PDI. Se estudió el Pf-D PAMAM C9 de segunda generación, en caldo nutritivo inoculado con *E. coli* para evaluar la cinética de crecimiento bacteriano utilizando UV-vis a 600nm. Para activar el compuesto se utilizaron dos ambientes, uno sin luz y otro con luz LED.

En presencia de luz y con una concentración de 25 ppm, se obtuvo un decrecimiento del 5.8% en la concentración de bacterias. Esto debido a la generación de ROS por parte del centro de porfirina. Se concluye que el Pf-D estudiado, es apto para su aplicación en PDI para eliminar patógenos presentes en el agua.

PALABRAS CLAVE: Porphirina, dendrímeros PAMAM, inactivación fotodinámica, oxígeno singulete.

1 | INTRODUCCIÓN

El estudio de los procesos de enfriamiento/sensibilización entre dendrímeros y colorantes ha cobrado cada vez más relevancia debido a múltiples aplicaciones como quimiodetección, imagenología, polimerización fotoinducida e inactivación fotodinámica (PDI), entre otras. Mediante la correcta funcionalización y dimensionamiento de los dendrímeros, se pueden favorecer y mejorar varios procesos como la unión huésped/huésped, la transferencia de electrones/energía y la modulación de energía. Esto ha llevado a explorar las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de diferentes combinaciones de dendrímero/sonda, mediante varias técnicas espectroscópicas.

Muchos colorantes y sondas de fluorescencia experimentan cambios espectroscópicos cuando se unen o encapsulan en dendrímeros, donde en procesos como la relajación, la modulación de energía y la transferencia de electrones pueden verse considerablemente favorecidos por el cambio en la polaridad del microambiente, los efectos de confinamiento y la capacidad de donación de electrones del dendrímero.

Los dendrímeros a base de porfirina (Pf-D) son compuestos de interés, porque fusionan las propiedades ópticas reconocidas de las porfirinas con la versatilidad de la arquitectura dendrítica en una clase única de macromoléculas. Tales características hacen que estas moléculas sean especialmente adecuadas para la recolección de luz PDI, que son temas de particular importancia [1-5]. Muchas de estas moléculas han sido desarrolladas con el fin de imitar los mecanismos y el rendimiento de los sistemas naturales [1]. Varios Pf-D fueron probados como antenas en procesos de recolección de luz, en un intento de lograr las altas eficiencias para la conversión de energía solar de los sistemas fotosintéticos [6, 7].

Sin embargo, los estudios sobre la base de las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de Pf-D son escasos. Algunos autores han caracterizado brevemente los estados terrestres y singulete-excitados de Pf-D por absorción en estado estacionario y espectroscopias de fluorescencia [9, 10-13]. Las mediciones de anisotropía y fluorescencia resueltas en el tiempo también se han utilizado para estudiar la dinámica del proceso de transferencia de energía o la formación agregada de sensibilizadores [6, 7, 8, 14].

Es importante mencionar que actualmente no se tiene documentación o registro alguno de este tema, es algo a denotar debido a la importancia que supone esto para el desarrollo de la investigación de la caracterización y la dinámica de los estados triplete-excitados de Pf-D.

Este tema es relevante ya que, la generación de oxígeno singulete está mediada por la transferencia de energía de los estados excitados por tripletes de la mayoría de los sensibilizadores.

Recientemente, Hernández Ramírez [15-18] y colaboradores han sintetizado una serie de Pf-D basadas en porfirinas tetrafenil mesosustituidas con ramas PAMAM, y un derivado modificado periféricamente con grupos tiazoles [15-18]. Estas moléculas demostraron propiedades de unión a metales, por lo que podrían encontrar aplicación en la remediación del medio ambiente, particularmente en agua. En este trabajo se presta especial interés en evaluar las capacidades de PDI de dichos Pf-D, a partir de la caracterización fotofísica y fotoquímica in vitro, considerando que las porfirinas son cromóforos que producen tripletes con alto rendimiento y esta es la razón principal de su eficacia como sensibilizadores de PDI.

La principal aplicación del presente estudio es en la potabilización del agua ya que, se busca, en cierta forma, sustituir al cloro el cual, puede provocar afectaciones al ecosistema marino y a la salud del personal quien lo maneja en las plantas potabilizadoras y de agua residual. Utilizar estos compuestos para eliminar patógenos presentes en el agua, disminuye el impacto ambiental negativo que causa la producción del cloro usado para el mismo fin. Si los Pf-D son utilizados en el tren de tratamiento del agua potable, específicamente en el proceso de desinfección, solamente se requerirá un sistema de filtrado para recuperarlos. Cabe mencionar que la prueba de estos sistemas esta fuera del alcance del objetivo del presente escrito.

La presente investigación denota un estudio de la cinética de crecimiento bacteriana en medio acuoso, utilizando *Escherichia coli* para evaluar la eficiencia de tres nuevos dendrímeros PAMAM con núcleo de porfirina con respecto a la PDI.

2 | METODOLOGÍA

Caracterización fotofísica y fotoquímica de dendrímeros PAMAM con centro de porfirina

Los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro de matriz de diodos Hewlett Packard 6453E. Las mediciones de fluorescencia se realizaron mediante un espectrofluorómetro Horiba Jobin Yvon FluoroMax-4. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia se determinaron utilizando ZnTPP en tolueno como estándar ($\Phi = 0.033$, [17]), y haciendo coincidir la muestra y las absorbancias de referencia con <0.1 a 419 nm. La dimetilformamida (DMF) y el tolueno eran de Sintorgan (grado HPLC) y se usaban según lo recibido. Las determinaciones de la vida útil de la fluorescencia se llevaron a cabo utilizando pulsos altamente atenuados de 355 nm (FWHM 8 ns) de un láser Quantel Brilliant R Nd-YAG. Las muestras equilibradas con aire se excitaron en ángulo recto. La fluorescencia, recogida por un sistema de tubos monochromator-PM, se transfirió a

través de un endoscopio digital a un ordenador. La vida útil se extrae de las curvas de desintegración por deconvolución utilizando el software Origin. El error estimado de las mediciones fue de ± 0.5 ns.

Las mediciones de absorción transitoria se determinaron mediante fotólisis flash láser. Un láser Spectron SL400 Nd:YAG que genera pulsos láser de 532 nm (20 mJ por pulso, aprox. 18 ns FWHM) fue la fuente de excitación. Los experimentos se realizaron con celdas rectangulares de cuarzo con geometría de ángulo recto. El rayo láser se desenfocó para cubrir toda la longitud del camino (10 mm) del haz de análisis de una lámpara Xe de 150 W. El sistema de detección comprendía un monocromador PTI acoplado a un tubo Hamamatsu R666 PM. Las señales fueron adquiridas y promediadas por un osciloscopio digital (Hewlett-Packard 54504) y luego transferidas a una computadora. Todas las determinaciones de fotólisis se realizaron a 25 ± 1 °C y las soluciones se desoxigenaron burbujeando con argón de alta pureza saturado con disolvente.

La fotosensibilización del oxígeno singulete se llevó a cabo midiendo su señal de desintegración por fosforescencia mediante un método de detección de resolución temporal (TRPD). La fuente de excitación fue el mencionado láser Nd:YAG que operaba a 532 nm, y la radiación de emisión (principalmente 1270 nm) se detectó en ángulo recto con un detector de germanio amplificado Judson J16/8Sp, después de pasar por los filtros apropiados. La salida del detector se acopló a un osciloscopio digital. Por lo general, se necesitaban alrededor de diez disparos para promediar los tiempos de descomposición, con el fin de obtener una buena relación señal-ruido. No hay cambios en los espectros de absorción de las muestras observadas después de estos experimentos, lo que indica que no hay fotodegradación significativa de los fotosensibilizadores.

Evaluación de la inactivación fotodinámica

Se preparó caldo nutritivo como medio de cultivo. Se esterilizó el material a 121°C en autoclave por 15 min. Posteriormente se verificó la ausencia de contaminación en los matraces que contenían el medio de cultivo. Los Pf-D (Figura 1) se prepararon a diferentes concentraciones, las cuales se observan en la Tabla 1.

Nombre	Concentración (ppm)		
	2.5	12.5	25
Pf	X	X	X
C5	X	X	X
C9	X	X	X
C10-A	X	X	X

Tabla 1 Concentración de las muestras preparadas.

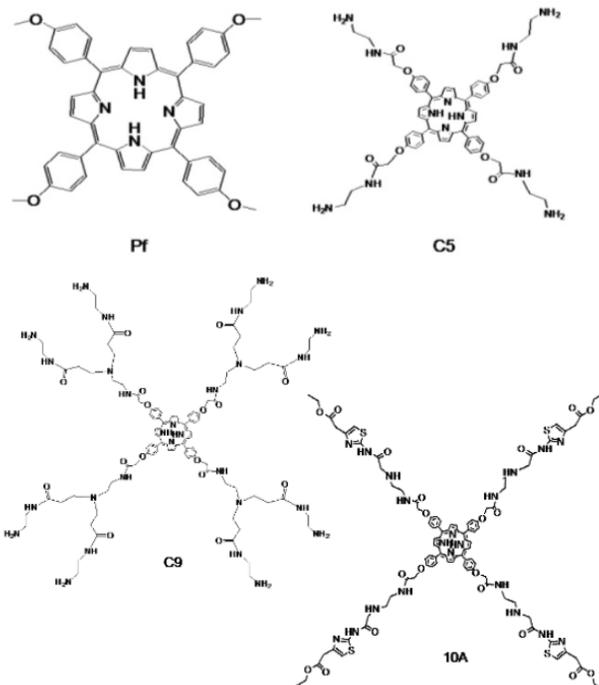


Figura 1 Estructuras moleculares de los Pf-D

Se inocularon los matraces que contenían caldo nutritivo con 1ml de *E. coli*. Todo lo anterior con estrictas medidas de asepsia, para evitar cualquier contaminación. Se realizaron dos ensayos, el primero se llevó a cabo a una concentración de C9 de 12.5 ppm, dejando en agitación por 10 minutos antes de los barridos. El segundo ensayo, se realizó con C9 a 25 ppm, sin embargo, a diferencia con el anterior, la inoculación se dejó en reposo por 24 h para favorecer el crecimiento bacteriano. Posteriormente, en ambos ensayos, a su respectivo tiempo (Tabla 2), se adicionó 1ml de C9 a su respectiva concentración, generando tres réplicas para el Blanco y tres para el compuesto.

Ensayo	Pf-D analizado	Concentración (ppm)	Ambientes
1	C9	12.5	Sin luz Con luz
2	C9	25	Sin luz Con luz

Tabla 2 Características de los ensayos realizados

Para activar los dendrímeros utilizados como FS, se utilizaron dos ambientes, uno sin luz y otro con luz. La fuente utilizada fue luz LED.

El blanco utilizado en ambos ambientes fue caldo nutritivo inoculado con la bacteria *E. coli*, sin la presencia de algún Pf-D.

El contenido de cada matraz fue analizado en el espectrofotómetro UV-vis marca Varían Caray, a una longitud de onda de 600nm. Se realizaron cinco corridas con un tiempo promedio entre ellas de 20 min. Los matraces se mantuvieron en agitación constante durante 20 segundos antes de ser sometidos al espectro UV-vis.

Se interceptaron las gráficas y se utilizó la Fórmula (1) de interpolación para obtener la absorbancia a 600nm.

$$y = y_0 + \frac{y_1 - y_0}{x_1 - x_0} (x - x_0) \quad (1)$$

donde y_0 es el valor más bajo de absorbancia, y_1 es la absorbancia superior a la de interés (y), x es la distancia en centímetros a la intersección del eje, x_0 es el valor más bajo de la longitud de onda y x_1 es la distancia en centímetros que corresponde a la absorbancia superior (y_1).

Por último, se promediaron las absorbancias obtenidas, permitiendo así calcular las densidades ópticas. Se graficaron las curvas de cinética bacteriana de ambas concentraciones en el software Origin, para comparar y analizar resultados.

3 | DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Estado singulete

Las propiedades foto físicas de los dendrímeros de porfirina-PAMAM de las generaciones 1 (C5) y 2.5 (C9), y de un derivado del tiazol (10A) se estudiaron mediante espectroscopios de absorción y fluorescencia (Gráfico 1). También se analizó para la comparación la base libre de tetra-(p-metoxi)fenil porfirina (Pf) correspondiente al núcleo de dendrímeros.

En el Gráfico 1. se muestran los espectros de absorción y fluorescencia corregidos de las moléculas en soluciones DMF. Los principales parámetros espectroscópicos se recogen en la Tabla 3.

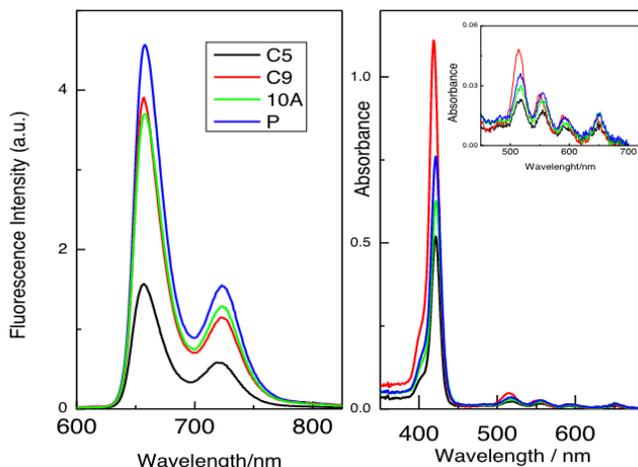


Gráfico 1 Espectros de fluorescencia y absorción de C5 (negro), C9 (rojo), 10C (rosa) y Pf (azul) en soluciones DMF. Recuadro: zoom en la región de bandas Q.

Los espectros del Gráfico 1 se asemejan a los de las porfirinas de base libre meso sustituidas, y fueron de acuerdo con los datos reportados para tales compuestos ([20-22] y referencias en ellos). En todos los casos, los espectros de absorción mostraron la banda de Soret intensa distintiva de las porfirinas en torno a los 420 nm, y una serie de cuatro bandas de intensidad moderada (bandas Q) en la región de 500-700 nm. Los espectros de fluorescencia aparecen divididos en dos bandas que alcanzan un máximo de aproximadamente 660 y 720 nm, de acuerdo con los reportados para Pf en solución de benceno [17, 1]. Se registraron características espectrales similares con el compuesto original de Pf llamado TPP (porfirina tetrafenil de base libre) en varios disolventes [17, 30,31] y otras porfirinas de base libre meso sustituidas en soluciones de DMF [29]. Quimby et al. han atribuido estas bandas a las transiciones del primer estado excitado singulete (S1) a los niveles vibratorios uno (banda de longitud de onda larga) y cero (banda de longitud de onda corta) del estado fundamental [17].

También se registró la cinética de estado singulete de las muestras en soluciones DMF, y se obtuvieron tiempos de vidas de fluorescencia (τ_f) calculadas con Fórmula (2), del orden de 10 ns a partir de las desintegraciones monoexponenciales correspondientes. Los valores Φ_f y τ_f se resumen en la Tabla 3.



Compuesto	Absorción					Fluorescencia		
	$\lambda_{\text{máx.}} / \text{nm}$ (Soret by)	$\lambda_{\text{máx.}} / \text{nm}$ (Banda Q s)				$\lambda_{\text{máx.}} / \text{nm}$	ϕ_{FI}	$\tau_{\text{f}} / \text{ns}$
Pf	422	518	556	593	650	658	0.101	10.1
C5	419	518	556	592	650	657	0.036	10.1
C9	422	515	551	590	648	657	0.080	11.8
10A	422	518	556	594	650	658	0.083	12.2

Tabla 3 Propiedades espectroscópicas de compuestos en soluciones DMF.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ_{f}) se determinaron por el método de actinometría relativa, de acuerdo con la Fórmula (3):

$$\phi_{\text{f}} = \left(\frac{A_{\text{ref}} F_{\text{sample}} \eta^2}{A_{\text{sample}} F_{\text{ref}} \eta_0^2} \right) \phi_{\text{ref}} \quad (3)$$

donde A es la absorbancia en la longitud de onda de excitación, F es el área de la banda de emisión integrada y η , η_0 es el índice de refracción del disolvente que contiene la muestra y la referencia, respectivamente. En Fórmula (3) se utilizó como referencia la tetrafenil-porfirina de zinc (ZnTPP) en solución de tolueno ($\phi_{\text{f}} = 0.033$, [25]).

En particular, se ha demostrado que el valor ϕ_{f} para Pf es 0.12-0.13 en solución de benceno [17,30]. El mismo valor se informó desde el principio para el TPP en soluciones de benceno, tolueno y metanol, en los trabajos pioneros sobre la fotofísica de las porfirinas [17, 30, 32, 46].

3.2 Estado del triplete

Con el objetivo de evaluar el papel potencial de los dendrímeros de porfirina-PAMAM en aplicaciones sensibilizantes, se llevó a cabo la caracterización de los estados de triplete mediante experimentos de fotólisis con flash láser. Después de la irradiación láser se registraron señales de desintegración, que produjeron vidas trillizas que oscilaron en el orden de unos pocos cientos de microsegundos. Se registraron espectros transitorios cualitativamente análogos para los cuatro compuestos analizados en soluciones DMF, con un máximo aparente alrededor de 450 nm, ya que no se considera la presencia de desplazamientos relevantes (Gráfico 2); y en la banda Soret que aparece parcialmente agotada y distorsionada por la superposición correspondiente al blanqueamiento del estado fundamental. El gráfico 2 también muestra una banda adicional de menor intensidad en la región de 300-400 nm, y otra aún menos intensa alrededor de 500-800 nm.

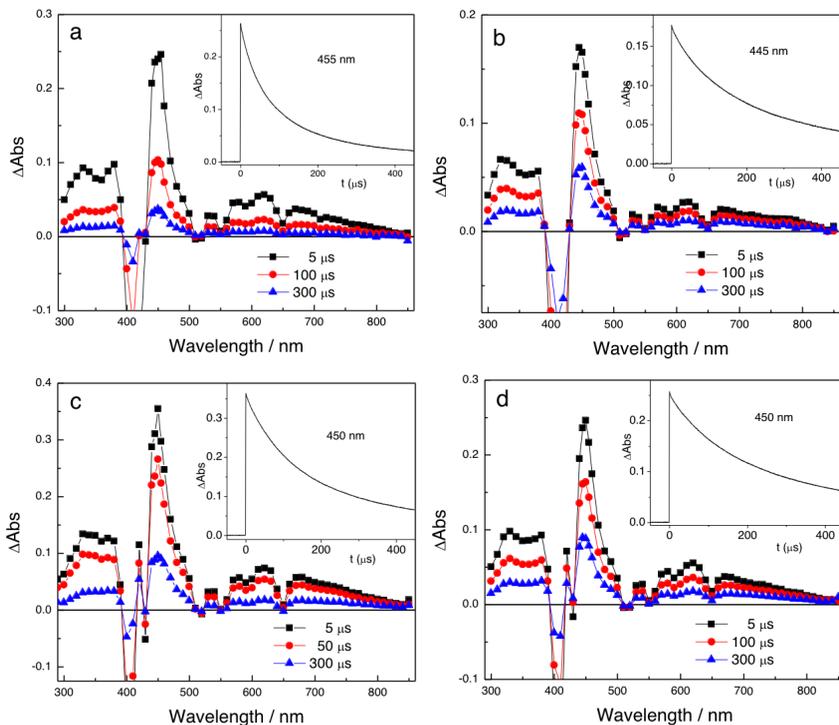


Gráfico 2 Espectros de absorción transitoria de a) Pf, b) C5, c) C9 y d) 10A en diferentes momentos después del disparo láser.

Los rendimientos cuánticos del triplete (ϕ_T) se determinaron mediante actinometría relativa, para evaluar la eficiencia del cruce intersistema al estado del triplete [26]. En este método, el producto de ϕ_T y el coeficiente de absorción molar (ϵ_T) del estado del triplete en una longitud de onda de análisis de trabajo, se determinó mediante fotólisis de flash láser de acuerdo con Fórmula (4):

$$(\phi_T \epsilon_T)_S = \frac{\text{pendiente}_S}{\text{pendiente}_{Ref}} (\phi_T \epsilon_T)_{Ref} \quad (4)$$

donde pendiente_S y pendiente_{Ref} se refieren a las pendientes iniciales de las parcelas de absorción de tripletes versus energía láser para las muestras y una referencia, respectivamente. La actinometría se realizó con ZnTPP en solución de tolueno como referencia, para valores de $\epsilon_T=7$. Se utilizaron $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 470 nm y $\phi_T=0,83$ basado en lo reportado por Carmichael y colaboradores [37]. El cambio de absorbancia inicial extrapolado en tiempo cero se midió a 470 nm para el triplete ZnTPP y al λ_{max} aparente (aprox. 450 nm) para el triplete de muestras, con soluciones de absorbancia emparejadas a 532 nm.

Para obtener ϕ_T a partir de Fórmula (4), se realizaron mediciones independientes de ε_T mediante el método de transferencia de energía [27]. Según este método, una molécula en su estado de triplete excitado actúa como donante de energía a otra molécula en su estado fundamental, sensibilizando así la formación del estado triplete de esta última. Para garantizar la fiabilidad de los experimentos se deben cumplir las siguientes condiciones críticas: el sensibilizador debe excitarse selectivamente con un pulso láser y la concentración del aceptor (quencher) debe ser lo suficientemente grande como para apagar más del 90% de los tripletes sensibilizadores. Dado que las propiedades foto físicas de los dendrímeros de porfirina-PAMAM demostraron depender completamente del núcleo Pf, se estimó la energía triplete de las muestras como la de TPP ($ET \sim 140$ kJ / mol, [27]). Por lo tanto, se utilizaron las muestras de porfirina-PAMAM como sensibilizantes y Zn phtalocianina (ZnPc) como calmante ($ET=109$ kJ/mol, [28]), irradiando a 532 nm donde ZnPc no absorbe. Para asegurar una eficiencia de enfriamiento superior al 90% se calculó la fracción de los tripletes interceptados (f_T) mediante Fórmula (5):

$$f_T = \frac{{}^3k_q[ZnPc]}{{}^3k_0 + {}^3k_q[ZnPc]} \quad (5)$$

donde $3k_0$ y $3k_q$ son las constantes de velocidad de enfriamiento triplete de las muestras en ausencia y presencia de ZnPc, respectivamente. Para utilizar Fórmula (5) se determinaron previamente los $3k_q$ de cada muestra con ZnPc según Fórmula (6):

$$3\tau^{-1} = \tau_0^{-1} + 3k_q [ZnPc] \quad (6)$$

donde τ_0^{-1} y 3τ son el triplete de vidas en ausencia y presencia de quencher, respectivamente. Los datos se ajustaron bien a las líneas rectas y los valores de $3k_q$ se obtuvieron de sus pendientes, según Fórmula (5).

Los ε_T fueron calculados según Fórmula (7), mediante el control de las absorbancias iniciales (ΔAbs) de los tripletes a 450 nm para las muestras, y a 490 nm para ZnPc:

$$\varepsilon_T^S = \varepsilon_T^{Ref} \frac{\Delta Abs_S}{\Delta Abs_{Ref}} f^{-1} \quad (7)$$

En esta ecuación S y Ref representan muestras y ZnPc, respectivamente; y f_T se calcula con Eq. 4. Se utilizó un valor de referencia de $\varepsilon_T=32500$ M⁻¹ cm⁻¹ en DMA:agua (7:3) a 490 nm para ZnPc [37]. Se ha informado que el espectro triplete-triplete de ZnPc se caracteriza por una amplia banda de absorción con $\lambda_{m\acute{a}x}= 490$ nm, en un largo rango de polaridades de disolventes (benceno, etanol, acetonitrilo). Por lo tanto, se consideró razonable suponer el valor de ε_T en DMF como el informado en DMA: solución de agua. En la Tabla 4 se resumen todos los parámetros de estado del triplete determinados.

Los espectros de absorción de tripletes-tripletes mostrados en el Gráfico 2 son muy similares a los reportados en los primeros trabajos sobre la fotofísica del TPP en soluciones de tolueno o benceno [33, 34], y de una serie de hidroxil-TPP en soluciones de metanol [46].

	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	τ_0 (μs)	ϵT ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	ϕT	$\phi \Delta$
Pf	455	97	65100	0.52	0.57
C5	445	129	73200	0.52	0.41
C9	450	203	60000	0.50	0.46
10A	450	320	69100	0.39	0.41

Tabla 4 Parámetros de tripletes obtenidos para Pf, C5, C9 y 10A por fotólisis flash láser en solución DMF: vidas útiles (τ_0), constantes de velocidad de enfriamiento por ZNPC (3kq), coeficientes de absorción molar a 450 nm (ϵt), rendimientos cuánticos (ϕT) y rendimientos cuánticos de oxígeno singlete ($\phi \Delta$).

Los resultados de estado singlete concuerdan con los reportados por Matos et al. para una serie de dendrímeros TPP sustituidos por arylether en soluciones de THF y DMF [25].

En la Tabla 4 se puede observar que el compuesto C9 presenta mayor rendimiento cuántico del oxígeno singlete ($\phi \Delta$) siendo de 0.46 valor cercano al presentado por Pf (0.57), por ello, el estudio del presente trabajo se enfocó en el C9 a dos concentraciones, 12.5 y 25 ppm.

3.3 Aireación de oxígeno singlete

Los datos ϕT obtenidos sugieren que los dendrímeros de porfirina-PAMAM pueden sensibilizar a las especies reactivas adecuadas para la PDI, al apagarse con oxígeno molecular. Por lo tanto, se realizaron experimentos resueltos en el tiempo para evaluar la formación de oxígeno singlete (1O_2), mediante la detección de la luminiscencia de esta especie a 1270 nm en soluciones DMF. La eficacia de dicho proceso de sensibilización se evaluó en términos del rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete ($\phi \Delta$) de los dendrímeros de porfirina-PAMAM y este se determinó comparando la emisión fosforescente del 1O_2 generado a partir de las muestras y un compuesto de referencia, bajo idéntica configuración experimental y absorbancias coincidentes en longitud de onda de irradiación Fórmula (8).

$$\Phi_{\Delta}^S = \Phi_{\Delta}^R \frac{I_{\Delta}^S}{I_{\Delta}^R} \quad (8)$$

donde I_{Δ} se refiere a la intensidad de emisión de 1O_2 , y S y R representan las muestras y la referencia, respectivamente. Las parcelas de la intensidad de fosforescencia (extrapolado a $t = 0$) en función de la energía láser ajustada a una línea rectas, y el

parámetro $I\Delta$ s fueron obtenido de las respectivas pendientes. Se utilizó como referencia una solución DMF de ZnTPP ($\phi\Delta = 0.74$). Este valor de $\phi\Delta$ fue análogo al reportado en solución de benceno ($\phi\Delta = 0.73$, [28]), y se obtuvo mediante la introducción de una corrección de disolvente en Fórmula (8) [35]. En la Tabla 4 se muestran los parámetros para la determinación ϕ de Δ según Fórmula (8).

3.4 Cinética de crecimiento bacteriano

De acuerdo con los resultados anteriores sobre el rendimiento cuántico del oxígeno singulete (Tabla 3) en donde se puede observar que el valor más alto fue el dendrímero C9 con $\phi\Delta = 0.46$, se analizó este compuesto a las dos concentraciones a las que fue preparado (12.5 y 25 ppm). En el análisis a 12.5 ppm se notó una casi nula diferencia en la presencia de bacterias E. coli. por lo cual se decide realizar un segundo análisis con el mismo compuesto a 25 ppm.

Se utilizaron dos ambientes para comparar la inactividad fotodinámica por parte de los dendrímeros con centro de porfirina y los resultados obtenidos se muestran en el Grafico 3 para un ambiente completamente sin presencia de luz y con presencia de luz LED blanca en el Gráfico 4.

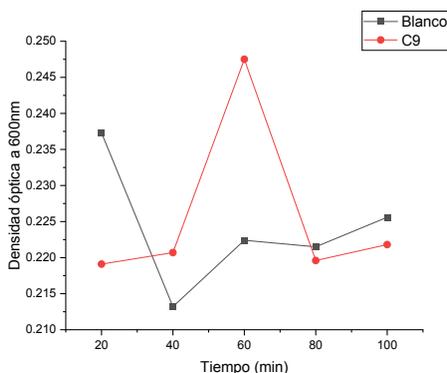


Gráfico 3 Curva de cinética bacteriana en un ambiente sin luz.

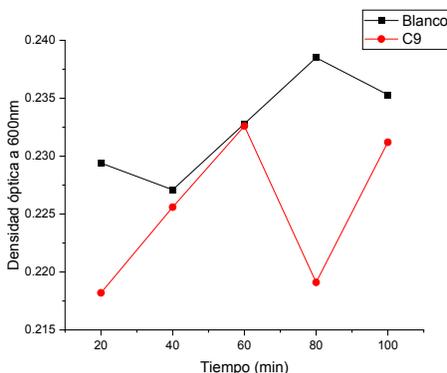


Gráfico 4 Curva de cinética bacteriana en ambiente con luz led.

En el Gráfico 4 se puede observar que, en el análisis con C9 la concentración de bacterias muestra un descenso del 5% al minuto 20, en comparación con el blanco que no contiene FS. A partir el minuto 60 al 80 se observa una disminución de bacterias al 5.8%.

Con base a lo anterior, la concentración de bacterias se mantuvo baja en presencia del FS activado con luz LED. En el Gráfico 3, donde se presentan los valores obtenidos con nula presencia de luz, se observa que en los minutos 20 y 60, existe un aumento de la densidad óptica, esto puede ser causado por dos razones:

- El Pf-D es aprovechado como sustrato por parte de las bacterias y posteriormente se presenta un nivel de toxicidad el cual genera un decaimiento, llegando a un nivel similar con el que comenzaron.
- El C9 se encontraba sedimentado, por lo cual las bacterias comenzaron a crecer, posteriormente por la agitación generada, el dendrímero generó una cierta toxicidad y por ello su crecimiento se ve afectado.

Se concluye que el punto 2 (dendrímero sedimentado) es el más acertado, pues de lo contrario, el blanco presentaría valores similares.

Los resultados de las densidades ópticas se muestran en la Tabla 5.

Barrido	Tiempo (min)	Sin luz		Con luz	
		Blanco	C9	Blanco	C9
1	20	0.2373	0.2191	0.2294	0.2182
2	40	0.2432	0.2207	0.2271	0.2256
3	60	0.2224	0.2475	0.2328	0.2326
4	80	0.2213	0.2196	0.2385	0.2191
5	100	0.2256	0.2218	0.2353	0.2312

Tabla 5 Densidad óptica de los barridos UV-vis en ambos ambientes.

Se presentan los cinco barridos con una duración promedio entre ellos de 20 minutos. En los dos ambientes trabajados (sin luz y con luz) se utilizaron tres réplicas del blanco y tres del C9, se promediaron los resultados que se pueden observar en la Tabla 5. Las densidades ópticas resultantes del blanco (sin bacterias) y con el compuesto C9, en el ambiente sin luz, se mantuvieron constantes, en cambio, los valores resultantes del ambiente con luz, el blanco presentó un aumento con el transcurso del tiempo y, con C9, se observan valores menores, lo cual indica que los Pf-D cumplieron con la PDI.

Cabe destacar que la última réplica del C9 que se expuso a luz LED, se le adicionó menor volumen del dendrímero (aprox. 0.5 ml), debido a la falta de este. Esta aclaración puede ser la razón por la cual el último valor (0.2312) es alto a comparación de los primeros minutos.

4 | CONCLUSIONES

En el Gráfico 1 se puede observar que tanto los espectros de absorción como de emisión de C5, C9 y 10A fueron cualitativamente análogos a los de Pf, y no mostraron ninguna dependencia de las ramas PAMAM. Los resultados del Gráfico 1 se asemejaron a los datos reportados [19-21]. Se obtuvo una banda distintiva de las porfirinas en torno a 420 nm y una serie de cuatro bandas de intensidad moderada (bandas Q) en la región de 500-700 nm, lo cual se les atribuye a las transiciones del primer estado excitado singulete (S1) a los niveles vibratorios uno (banda de longitud de onda larga) y cero (banda de longitud de onda corta). [30]

Se obtuvieron espectros de emisión idénticos excitando las muestras en Soret o cualquiera de las bandas Q, lo que denota que los electrones excitados al estado S2 experimentan una rápida conversión interna a S1.

Como se puede ver en los datos de la Tabla 4 ϕ_f y τ_f se encuentran en el orden de 0.10 y 10.0 ns, respectivamente, que son valores razonables para este tipo de compuestos. Se informó que la vida útil de fluorescencia de TPP en soluciones de tolueno y metanol era de 11-14 ns [31, 32]. También se informaron valores de $\phi_f=0.10\pm 0.01$ y $\tau_f=11,4\pm 0.1$ para TPP en solución DMF [24]. Ormond et al. encontraron valores de ϕ_f en el orden de 0.1-0.2 y τ_f alrededor de 7-13 ns para una serie de derivados de p - y m-fenil TPP en soluciones DMF [21]. En otra investigación reciente Ghosh et al. evaluó la fotofísica de TPP y su metalo-derivado ZnTPP en varios solventes [31]. Los autores encontraron valores ϕ_f de f y τ_f para TPP análogos a los reportados anteriormente y mostraron que ambos parámetros son casi independientes de la polaridad del disolvente. Los resultados de estado singulete también concuerdan con los reportados por Matos et al. para una serie de dendrímeros TPP sustituidos por arylether en soluciones de THF y DMF [26]. Se obtuvieron propiedades fotofísicas (espectros de absorción y fluorescencia, ϕ_f y τ_f) muy similares a las del TPP, y concluyeron que los dendrones ejercen poca influencia en los procesos de desactivación no radiativa y radiativa del núcleo de porfirina.

Contrariamente a lo esperado, las vidas aparentes de los tripletes mostraron un aumento en el orden Pf<C5<C9 que se correlaciona con la ramificación de las moléculas (Tabla 5). Se sabe que los dendrímeros PAMAM apagan los estados tripletes de los colorantes mediante la reacción de transferencia de electrones S [50, 51]. Sin embargo, sus datos actuales sugieren que las ramas dendríticas estabilizan los estados de triplete formados protegiendo el núcleo de porfirina de su entorno. Los valores de ϕ_T alrededor de 0,5 para los tres dendrímeros de porfirina fueron del orden de la mayoría de los datos relativos al TPP y su análogo sustituido [23, 24]. Además, $\phi_T\Delta$ alrededor de 0.40-0.45 estuvieron de acuerdo con los valores 0.40-0.65 reportados en esta familia de moléculas [31, 32, 46].

Se han presentado las propiedades fotofísicas de tres dendrímeros a base de porfirina sintetizados por Hernández-Ramírez et al, en soluciones DMF. El estado singulete-excitado se caracterizó por medio de los respectivos espectros de fluorescencia, vidas útiles y rendimientos cuánticos. En general, los resultados actuales están en excelente acuerdo con los datos reportados sobre los compuestos de porfirina, y sugieren que las propiedades espectroscópicas del dendrímero de porfirina-PAMAM se rigen por el núcleo de Pf. Los espectros transitorios también se registraron por medio de la fotólisis del flash láser, y se atribuyeron al estado triplete de los compuestos. Se midieron las largas vidas de los tripletes y la transferencia eficiente de energía desde los tripletes al oxígeno molecular. Los resultados obtenidos sugieren que los dendrímeros a base de porfirina podrían encontrar aplicaciones en varios procesos de sensibilización (como la transferencia de electrones y energía, PDT y PDI). En especial, el Pf-D C9, el cual a diferencia de los demás, presentó un rendimiento cuántico cercano a Pf (0.56) de oxígeno singulete que fue de 0.46 (Tabla 5), por lo que el estudio de la curva de cinética bacteriana se realizó únicamente con este compuesto.

En el Gráfico 4 se demuestra que el dendrímero de segunda generación Pf-D C9 FS utilizado a 25 ppm, es apto para uso en PDI, específicamente para la eliminación de bacterias Gram negativas como lo es la E. coli [27]. Esto debido a que se produce oxígeno singulete gracias a la presencia de alguna fuente de luz, activando el centro de porfirina que contiene el dendrímero.

Lo anterior da pauta para utilizar Pf-D en la desinfección de aguas, dando una opción más sustentable al proceso. Dicho sistema debe someterse a una fuente de luz durante la adición del dendrímero propiciando su activación. El estudio de la eficiencia de este está fuera del alcance de los objetivos del presente trabajo, sin embargo, los resultados presentados, aportan información valiosa para continuar con el análisis de la aplicación de Pf-D en la desinfección de agua para consumo humano.

Por otro lado, las ramificaciones de los dendrímeros PAMAM además de brindar protección al centro, pueden generar ciertos atrapamientos de otros contaminantes, como los metales, esto gracias a las características de los grupos funcionales que contenga la periferia del Pf-D.

Con base a lo anterior, es necesario llevar a cabo más estudios para complementar el presente trabajo y comenzar a implementar el uso de Pf-D ofreciendo alternativas aplicadas a la desinfección de agua potable.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Tecnológico Nacional de México por el financiamiento de los proyectos 642.18-PD y 8487.20-PD. Un agradecimiento especial a COMECYT por la beca otorgada “Estudios de posgrado” durante la etapa de estudios para lograr culminar con la investigación.

REFERENCIAS

- [1] Jiang D-L, Aida T. Diseño molecular bioinspirado de dendrímeros funcionales. Avances en la ciencia de polímeros. 2005;30(3):403-22.
- [2] Larsen J, Brüggemann B, Sly J, Crossley MJ, Sundström V, Åkesson E. Control inducido por disolventes de la transferencia de energía dentro de los dendrímeros de Zn(II)-porfirina. Chem Phys Lett. 2006;433(1):159-64.
- [3] Klajnert B, Rozanek M, Bryszewska M. Dendrimers en terapia fotodinámica. Química medicinal actual. 2012;19(29):4903-12.
- [4] Flávio F, Patrícia MRP, Sandrina S, José ASC, Joao PCT. Porphirinas y ftalocianinas decoradas con dendrímeros: síntesis y aplicaciones biomédicas. Síntesis orgánica actual. 2014;11(1):110-26.
- [5] Nagatani H, Sakae H, Torikai T, Sagara T, Imura H. Transferencia de electrones fotoinducida de PAMAM Dendrimer–Zinc(II) Porphyrin Associates at Polarized Liquid Interfaces líquidas. Langmuir : el diario ACS de superficies y coloides. 2015;31(22):6237-44.
- [6] Choi M-S, Aida T, Yamazaki T, Yamazaki I. Dendritic Multiporphyrin Arrays as Light-Harvesting Antennae: Effects of Generation Number and Morphology on Intramolecular Energy Transfer. Chemistry – A European Journal. 2002;8(12):2667-78.
- [7] Larsen J, Andersson J, Polívka T, Sly J, Crossley MJ, Sundström V, et al. Transferencia de energía y dinámica conformacional en dendrímeros de Zn-porfirina. Chem Phys Lett. 2005;403(1):205-10.
- [8] Li Y, Jang W-D, Nishiyama N, Kishimura A, Kawauchi S, Morimoto Y, et al. Dendrimer Generation Effects on Photodynamic Efficacy of Dendrimer Porphyrins and Dendrimer-Loaded Supramolecular Nanocarriers. Chem Mater. 2007;19(23):5557-62.
- [9] Zhang G-D, Harada A, Nishiyama N, Jiang D-L, Koyama H, Aida T, et al. Micelas del complejo de pollión atrapando porfirina dendrímero catiónico: fotosensibilizador eficaz para la terapia fotodinámica del cáncer. J Liberación controlada. 2003;93(2):141-50.
- [10] Dai X-H, Yang W-H, Yan W-L, Hu J-M, Dai Y-R, Pan J-M, et al. Dendrímeros con núcleo de porfirina que consisten en nuevos brazos similares a dendrones de siloxano-poli (amido amina): síntesis, caracterización y propiedades fotofísicas. Coloides y Superficies A: Aspectos Físicoquímicos y de Ingeniería. 2017;520:222-30.
- [11] Jiang D-L, Aida T. Eventos fotoquímicos dependientes de la morfología en porfirinas de dendrímero de éter arilo: cooperación de subunidades de dendron para la transducción de energía singlete. J Am Chem Soc. 1998;120(42):10895-901.
- [12] Kubát P, Lang K, Zelinger Z. Interacción de las porfirinas con los dendrímeros PAMAM en solución acuosa. J Mol Liq. 2007;131:200-5.
- [13] Krieger A, Fuenzalida Werner JP, Mariani G, Gröhn F. Ensamblajes funcionales de porfirina-dendrímero supramolecular para la recolección de luz y la fotocatalisis. Macromoléculas. 2017;50(9):3464-75.

- [14] Ghiggino KP, Reek JNH, Crossley MJ, Bosman AW, Schenning APHJ, Meijer EW. La dinámica de la transferencia electrónica de energía en nuevos dendrímeros funcionalizados de multiporfirina: un estudio de anisotropía de fluorescencia resuelta en el tiempo. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2000;104(12):2596-606.
- [15] Hernandez Ramirez , R. E., V. Lijanova, I., V. Likhanova, N., Olivares Xometl, O., Hernandez Herrera, A., Chavez Alcala , J., & Trejo Chavero, O. (2017). Synthesis of PAMAM dendrimers with porphyrin core and functionalized periphery as templates of metal composite materials and their toxicity evaluation. *Arabian Journal of Chemistry*.
- [16] Hernandez-Ramirez, R. E., Victorovona Lijanova, I., Victorovona Likhanova, N., Olivares- Xometl, O., & Lartundo-Rojas, L. (31 de March de 2016). Synthesis of porphyrins as precursors to PAMAM dendrimers and their metal chelating properties. *European Journal of Chemistry*, 49-55.
- [17] Hernández Ramírez RE, Lijanova IV, Likhanova NV, Xometl OO. Dendrímeros PAMAM con núcleo de porfirina: síntesis y comportamiento metal-quelante. *Revista de Fenómenos de Inclusión y Química Macrocíclica*. 2016;84(1):49-60.
- [18] Hernández Ramírez RE, Lijanova IV, Likhanova NV, Olivares Xometl O, Hernández Herrera A, Federico Chávez Alcalá J, et al. Síntesis de dendrímeros PAMAM con núcleo de porfirina y periferia funcionalizada como plantillas de materiales compuestos metálicos y su evaluación de toxicidad. *Revista Árabe de Química*. 2017.
- [19] Jiménez-Hernández E. (2010). Desinfección de aguas mediante oxígeno singlete. Laboratorio de Fotoquímica Aplicada, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- [20] Arredondo, E. (2014). Síntesis de porfirinas y metaloporfirinas no simétricas funcionalizadas con L-Glutamato y evaluación de sus propiedades fotodinámicas y anticancerígenas. Tesis para obtener grado de Doctor en Ciencias. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Químicas. Nuevo León, México.
- [21] Afonso, Susana Graciela. (1992). Acción fotodinámica y no fotodinámica de las porfirinas sobre enzimas de las biosíntesis del hemo y de otros caminos metabólicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- [22] Ulaszewska, M. M., Hernando, M. D., Uclés, A., Rosal, R., Rodríguez, A., Garcia-Calvo, E., & Fernández-Alba , A. (2012). Chemical and Ecotoxicological Assesment of Dendrimers in the Acuatic Enviroment. Elsevier B.V.
- [23] Carrasco Sanchez, V. (Septiembre de 2012). Síntesis de nanoparticulas dendronizadas dendrímeros) con capacidad de transporte y liberación de drogas. Talca.
- [24] Fernández Freire, P., Peropadre, A., Rosal, R., Pérez Martín, J., & Hazen , M. J. (2015). Toxicological assessment of third generation (G3) poly (amidoamine) dendrimers using the Allium cepa. Elsevier.
- [25] Quimby DJ, Longo FR. Estudios de luminiscencia sobre varias tetraarilporfinas y sus derivados de zinc. *J Am Chem Soc*. 1975;97(18):5111-7.
- [26] Broglia MF, Gómez ML, Bertolotti SG, Montejano HA, Previtali CM. Propiedades fotofísicas de la safranina y la fenosafranina. *J Photochem Photobiol A: Chem*. 2005;173(2):115-20.

[27] Carmichael I, Hug GL. Espectros de absorción de tripletes-tripletes de moléculas orgánicas en fases condensadas. *J Phys Chem Ref Datos*. 1986;15(1):1-250.

[28] Murov SL, Carmichael I, Hug GL. *Handbook of Photochemistry, Second Edition*: Taylor & Francis, 1993.

[29] Mathai S, Smith TA, Ghiggino KP. Rendimientos cuánticos de oxígeno singlete de posibles fotosensibilizadores basados en porfirina para la terapia fotodinámica. *Ciencias Fotoquímicas y Fotobiológicas*. 2007;6(9):995-1002.

[30] Seybold PG, Gouterman M. Porphyrins. *Espectros J Mol*. 1969;31(1):1-13.

[31] Ghosh M, Mora AK, Nath S, Chandra AK, Hajra A, Sinha S. Fotofísica de la tetrafenilporfirina de base libre excitada por Soret y su análogo de zinc en solución. *Spectrochimica Acta Parte A: Espectroscopía Molecular y Biomolecular*. 2013;116:466-72.

[32] Harriman A, Porter G, Searle N. Fotooxidación reversible de tetrafenilporfirina de zinc por benzo-1,4-quinona. *Revista de la Sociedad Química, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*. 1979;75(0):1515-21.

[33] Bonnett R, McGarvey DJ, Harriman A, Land EJ, Truscott tg, winfield uj. Propiedades fotofísicas de la meso-tetrafenilporfirina y algunas meso-tetra(hidroxifenil)porfirinas. *Photochem photobiol*. 1988;48(3):271-6.

[34] Pekkarinen L, Linschitz H. Estudios sobre estados metaestables de porfirinas. II. Espectros y cinética de desintegración de tetrafenilporfirina, tetrafenilporfirina de zinc y bacterioclorofila1. *J Am Chem Soc*. 1960;82(10):2407-11.

[35] Redmond RW, Gamlin JN. Una compilación de los rendimientos de oxígeno singlete de moléculas biológicamente relevantes. *Fotoquímica Fotobiol*. 1999;70(4):391-475.