



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

Departamento de Química Orgánica y Físicoquímica

Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE GENERACIÓN DE OXÍGENO
MOLECULAR SINGULETE POR UN SENSIBILIZADOR DERIVADO
DE FENALENONA EN MEDIO HOMOGÉNEO Y
MICROHETEROGÉNEO**

Memoria para optar al título de Químico

MATÍAS ALEJANDRO CARRASCO BOZO

Patrocinante

Germán Günther Sapunar

Directores

Germán Günther Sapunar

Javier E. Morales Valenzuela

Santiago – Chile

2022

A Anita y a mi Lela, quienes no
pudieron compartir y disfrutar de este
logro como tanto les hubiese gustado.

Agradecimientos

Sinceramente hay tanto que decir y no creo tener la suficiente capacidad para expresar aquello.

Partiré agradeciendo al profesor Germán Günther por aceptarme como tesista y darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio, es más, por aceptarme también para una segunda parte. Mencionar su siempre buena disposición para ayudar y enseñarme al empezar una actividad y cada vez que me he encontrado en apuros. Así como también poder sacar la vuelta conversando sobre cualquier tema y lo mucho que siempre me ha hecho reír.

Al profesor Javier Morales, su siempre buena actitud, en muchos sentidos. Su comprensión frente a los problemas que a veces trae la vida y las conversaciones al respecto, que siempre han sido un alivio.

A la profesora Ximena, por su apoyo y confianza tan sólidas que me permitieron creerme el cuento, luego, con unas cuantas palabras hizo que desaparecieran en gran medida mis nervios antes de presentar. A razón de este poder que presenta, me convenció de escribir estos agradecimientos.

A mis profesores de colegio David, Felipe, Felipe y Nicolás, y a la profesora Karina del preuniversitario, por guiarme en el camino hacia la química y aprender a querer esta ciencia, y por las valiosas enseñanzas que me han entregado, no sólo hablo de conocimiento sino de actitud y rectitud.

A mis compañeros de laboratorio Christian, Catalina y Horacio que, de a poco y a pesar de mi inicial timidez, hicieron sentirme acogido. Analía, persona de la cual disfruto enormemente su particular personalidad. Carlos, su siempre correcta y respetuosa actitud. A Ignacio, quien llegó de último, pero se convirtió rápidamente en un gran amigo.

A mis compañeros de generación, que hemos logrado llegar tan lejos. Una particular mención a Ernesto, Ananda y Natalia que estamos chiquitos, pero ya no estamos tan chiquitos. A Omar y Agustín que me han apoyado en una variedad de momentos. Y a la Patty con quien hemos tomado una pésima decisión en la cual seremos felices al final, pero tendremos que trabajar duramente.

A Bastián y Francisca, amigos de la vida.

A Constanza, que llegó a mitad de este proceso y tuvo que aguantar lo más difícil, pero que, sin su guía y ayuda, no hubiese salido tan airoso de la situación.

A mi familia, a mi papá, Antonio, que supo ser mucho más que un abuelo. A mi Lela... quien sería la persona más feliz y orgullosa por este logro. A mi mamá y a Martín que me apoyaron enormemente en el día a día, a darme ánimos, revisar mi trabajo y escuchar y quehacer diario en el laboratorio. A Camila, Carolina, que se encuentran lejos e igual pude sentir su apoyo. A Carolina y Olga, de quienes siempre he sentido mucho su cariño. Alejandro, te agradezco, y a la vez te pido disculpas, por todo el tiempo que te robé de estar juntos.

Índice

Índice	i
Índice de tablas	iii
Índice de figuras	iv
Resumen	v
Summary.....	vi
1. Introducción.....	2
1.1. Oxígeno molecular singlete	2
1.2. Fotosensibilización	3
1.3. Rendimiento cuántico	5
1.3.1. Rendimiento cuántico de fluorescencia y de fosforescencia.	6
1.3.2. Rendimiento cuántico de generación de $O_2(^1 \text{g})$ en solución,	7
1.4. Sistemas micro-heterogéneos.....	9
1.4.1. Sistemas micelares.....	10
1.4.2. Nanosistemas rígidos y flexibles	11
2. Hipótesis	13
3. Objetivos.....	13
3.1. Objetivos generales.....	13
3.2. Objetivos específicos	13
4. Metodología.....	14
4.1. Nanosistemas rígidos	14
4.1.1. Preparación de nanopartículas de sílice no porosas.....	14
4.1.2. Preparación de nanopartículas de sílice mesoporosas	14
4.1.3. Funcionalización de nanopartículas	14
4.1.4. Adsorción de sensibilizador en nanopartículas de sílice	15
4.2. Nanosistemas flexibles (sistemas coloidales de asociación)	15
4.2.1. Preparación de micelas y vesículas	15
4.3. Caracterización	16
4.3.1. Mediciones espectroscópicas en estado estacionario	16
4.3.1.1. Evaluación de rendimientos cuánticos de fluorescencia.....	16
4.3.2.1. Evaluación de rendimientos cuánticos de generación de oxígeno singlete	18
4.4. Caracterización de nanopartículas	18

5.	Resultados y discusión	18
5.1.	Síntesis de nanopartículas y adsorción	18
5.2.	Caracterización de nanopartículas de sílice	21
5.2.1.	Espectroscopía infrarroja.....	23
5.3.	Preparación y caracterización de vesículas.....	26
5.4.	Caracterización fotofísica del (fenilbenzoxazol-2-il) fenolanenona en medio homogéneo y microheterogéneo.....	27
5.4.1.	Espectrofotometría de absorción UV-VIS.....	27
5.4.2.	Espectrofotometría de emisión	34
5.4.3.	Espectroscopía NIR resuelta en el tiempo	36
6.	Conclusiones.....	42
7.	Bibliografía.....	44

Índice de tablas

Tabla 1. Rendimiento promedio para las diferentes NP sintetizadas.	18
Tabla 2. Eficiencias de encapsulación y de carga de FNOXA en diferentes tipos de NP.....	20
Tabla 3. Tamaño de NP-OH evaluados por DLS.	22
Tabla 4. Tamaño de NP-NH ₂ evaluados por DLS.	22
Tabla 5. Tamaño de las vesículas DODAC y DPPC evaluados por DLS.	27
Tabla 6. Absortividad molar de FNOXA vealuada en los solventes indicados.	28
Tabla 7. $\lambda_{\text{máx}}$ [cm ⁻¹] observado y parámetros solvatocrómicos, extraídos de literatura, para diferentes solventes.....	30
Tabla 8. Sumario del ajuste multiparamétrico para describir la relación entre $\lambda_{\text{máx}}$ [cm ⁻¹] y las variables ϵ y (+).	31
Tabla 9. Absortividad molar de FNOXA en los surfactantes SDS, CTAB y TX-100.	31
Tabla 10. Absortividad molar de FNOXA en las vesículas evaluadas.....	32
Tabla 11. Evaluación de la variación de la absorbancia de la muestra FNOXA, en relación con la PNF, al ser irradiada con un LED a 365 nm.	33
Tabla 12. Rendimiento cuántico de generación de oxígeno singulete de PNF utilizando SAPYR como actinómetro.	36
Tabla 13. Rendimientos cuánticos de generación de oxígeno singulete de FNOXA evaluados utilizando PNF como actinómetro en a) medio homogéneo, b) en medio microheterogéneo: micelas y c) vesículas.	38
Tabla 14. Rendimiento cuántico de generación de oxígeno de FNOXA adsorbido en nanopartículas de sílice.....	41

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de fenalen-1-ona.	9
Figura 2. Estructura química de 2-(benzo[d]oxazol-2-il)-1H-fenalen-1-ona.	9
Figura 3. Curva de calibración en HPLC de FNOXA con detector DAD a 420 nm.....	19
Figura 4. Espectro FT-IR de molécula FNOXA.....	24
Figura 5. Espectro FT-IR de NP-OH, con sustrato adsorbido y no adsorbido.	25
Figura 6. Espectros FT-IR de NP-NH ₂ , con sustrato adsorbido y no adsorbido.	26
Figura 7. Linealidad de absorbancia FNOXA en función de la concentración.	29
Figura 8. Espectro de absorción UV-Vis normalizado en medio homogéneo.	29
Figura 9. Correlación del ajuste con parámetros de acidez y de polaridad (+) en un gráfico de valor observado en función del valor predicho por el ajuste multiparamétrico.	30
Figura 10. Espectro de absorción UV-Vis normalizado en sistemas micelares.	31
Figura 11. Espectro de absorción UV-Vis normalizado en vesículas.	32
Figura 12. Ajuste del decaimiento de fosforescencia resuelta en el tiempo de FNOXA en acetona purgada con N ₂ , excitando a una longitud de onda de 410 nm, midiendo a una longitud de onda de emisión 550 nm. El tiempo de vida de fosforescencia estimado es de 12,19 ns.....	35
Figura 13. Ajuste del decaimiento de fosforescencia resuelta en el tiempo de FNOXA en metanol purgado con N ₂ , excitando a una longitud de onda de 410 nm, midiendo a una longitud de onda de emisión 550 nm. El tiempo de vida de fosforescencia estimado es de 9,6 ns.....	35
Figura 14. Decaimiento de fluorescencia resuelta en el tiempo de oxígeno molecular singlete de estándares PNF y SAPYR, ambos con absorbancia igual a 0,10 en ACN como solvente.	37
Figura 15. Decaimiento de fosforescencia resuelta en el tiempo de oxígeno molecular singlete de sensibilizador FNOXA y PNF como actinómetro, ambos con absorbancia igual a 0,12 en etanol como solvente.....	37
Figura 16. a) Comparación de la intensidad de fosforescencia de oxígeno molecular singlete extrapolada a tiempo cero (A ₀) en función de la absorbancia de FNOXA y PNF.	39

Resumen

En este trabajo se estudiaron las propiedades fotofísicas del derivado de fenalenona 2-(benzo[d]oxazol-2-il)-1H-fenalen-1-ona en medio homogéneo y en medio microheterogéneo para establecer su potencial uso como fotosensibilizador. Para esto, se evaluaron las propiedades de absorción y emisión del derivado de fenalenona por espectroscopía UV-Vis y fluorescencia en solventes homogéneos, sistemas micelares y en vesículas. Para evaluar el rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) se utilizó el método comparativo usando sulfato de quinina. Además, se evaluó el rendimiento cuántico de generación de oxígeno molecular singulete (Φ_{O_2}) del derivado de fenalenona en los entornos previamente mencionados y con el compuesto adsorbido sobre nanopartículas de sílice (NP). Basándose en el método Stöber se sintetizaron nanopartículas compactas y mesoporosas, además de amino-funcionalizarlas con APTES. La caracterización de las NP, así como la evaluación del grado de absorción del compuesto sobre NP, se llevaron a cabo mediante las técnicas de dispersión de luz dinámica (DLS), espectroscopía infrarroja (FT-IR) y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Para evaluar Φ_{O_2} del derivado de fenalenona se utilizó el método comparativo de actinometría usando fenalenona como referencia. La molécula en estudio presentó una banda ancha de absorción alrededor de 415 nm, lo que implica un corrimiento batocrómico del orden de 50 nm en comparación con la fenalenona sin sustituir, exhibiendo emisión de fluorescencia alrededor de 550 nm con un Φ_F cercano a 0,05. En medio homogéneo se evaluaron Φ_{O_2} elevados, cercanos a la unidad y en igual magnitud que la fenalenona. En entorno microheterogéneo se evaluaron Φ_{O_2} del orden del 70% y del 50% en sistemas micelares y en vesículas, mientras que cuando el compuesto se encuentra adsorbido en NP, varía entre el 75% y el 100% con respecto a la capacidad de generación de oxígeno molecular singulete de la fenalenona en las mismas condiciones. Los resultados obtenidos en esta memoria permiten proponer a la 2-(benzo[d]oxazol-2-il)-1H-fenalen-1-ona como un efectivo agente fotosensibilizador con propiedades interesantes, así como la utilización de agentes surfactantes y vesículas para su solubilización en agua.

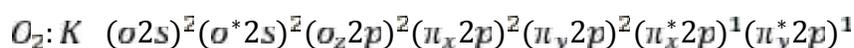
Summary

In this work The photophysical properties of the phenalenone derivate 2-(benzo[d]oxazol-2-yl)-1H-phenalen-1-one were studied in homogeneous media and microheterogeneous media to establish its potential use as photosensitizer. For this, the absorption and emission properties of the phenalenone derivative were evaluated by UV-Vis and fluorescence spectroscopy in homogeneous solvents, micellar systems and in liposomal vesicles. To evaluate the fluorescence quantum yield (Φ_F) the comparative method using quinine sulfate was used. In addition, the quantum yield of singlet molecular oxygen generation ($\Phi_{^1O_2}$) of the phenalenone derivative was evaluated in the previously mentioned environments and with the compound adsorbed on silica nanoparticles (NP). Based on the Stöber method, compact and mesoporous nanoparticles were synthesized, also amino-functionalized with APTES. The characterization of the NPs, as well as the evaluation of the degree of absorption of the compound on NPs, were carried out using dynamic light scattering (DLS), infrared spectroscopy (FT-IR) and high-performance liquid chromatography (HPLC) techniques. To evaluate $\Phi_{^1O_2}$, the comparative method of actinometry was used using phenalenone as a reference. The molecule under study presented a broad absorption band around 415 nm, which implies a bathochromic shift about 50 nm compared to unsubstituted phenalenone, exhibiting fluorescence emission around 550 nm with Φ_F close to 0,05. In homogeneous medium, high $\Phi_{^1O_2}$ were evaluated, close to unity and in the same magnitude as phenalenone. In microheterogeneous environment, $\Phi_{^1O_2}$ of the order about 70% and 50% were evaluated in micellar systems and vesicles, while when the compound is adsorbed in NP, it varies between 75% and 100% with respect to the generation capacity of singlet molecular oxygen of phenalenone under the same conditions. The results obtained in this study allow us to propose 2-(benzo[d]oxazol-2-yl)-1H-phenalen-1-one as an effective photosensitizing agent with interesting properties, as well as the use of surfactant agents and liposomal vesicles for its solubilization in water.

1. Introducción

1.1. Oxígeno molecular singulete

El oxígeno molecular es un compuesto diatómico, cuyas propiedades físico-químicas (Sengupta, Chattopadhyay, & Grossart, 2013) derivan de su configuración electrónica. La configuración electrónica del estado basal de la molécula del oxígeno corresponde a la siguiente: (Fresnadillo D. G., 2010) (Dickerson, Gray, Darensbourg, & Darensbourg, 1992):



La molécula en su estado basal posee dos electrones desapareados de espines paralelos, localizados en orbitales pi antienlazantes (π^*), por lo que se trata de un estado electrónico de multiplicidad triplete, denominado 3_g según notación espectroscópica. Esta distribución electrónica le confiere, por ejemplo, propiedades dirradicalarias y paramagnéticas.

El primer estado excitado del oxígeno molecular se encuentra a 22 kcal/mol por sobre el estado basal, estando sus electrones apareados, correspondiendo un estado con multiplicidad singulete degenerado. Este estado se denomina 1_g según notación espectroscópica. Un segundo estado excitado se encuentra a 37 kcal/mol por sobre el estado basal, donde los electrones se encuentran desapareados con spines antiparalelos, el cual se denota como 1_g . Sin embargo, este estado excitado decae rápidamente hacia 1_g a través de una conversión interna permitida.

El oxígeno en su estado singulete (1_g) exhibe un carácter diamagnético y su reactividad es diferente a la que posee en su estado basal, debido a la presencia de electrones apareados. Esta característica posibilita reacciones químicas en condiciones en que el oxígeno en su estado fundamental no participaría porque, a diferencia del estado triplete, no se presentan restricciones cuánticas relacionadas con la conservación de espín al interactuar con moléculas orgánicas que, en general, presentan un estado singulete en su estado basal (Epe B. , 1991).

La generación de esta especie reactiva de oxígeno (ERO) puede realizarse a través de diversos procedimientos, los cuales se pueden dividir en métodos físicos y métodos químicos.

Entre los métodos químicos, se pueden mencionar la descomposición de peróxido de hidrógeno en presencia de hipoclorito (Greer, 2006) (Arnold, Browne, & Ogryzlo, 1965), la

descomposición térmica de ozónidos, (Murray & Kaplan, 1969) de dioxetanos y de endoperóxidos (H. Wasserman, 1972) (Pierlot, Aubry, Briviba, Sies, & Mascio, 2000).

Entre los métodos de carácter físico, destacan la descarga eléctrica sobre una corriente de oxígeno, la descarga de microondas sobre oxígeno en fase gas y diversos procedimientos fotoquímicos, entre los que se encuentran la fotólisis de ozono (J. Pitts, 1968), la excitación directa del oxígeno (I. Matheson, 1972), que es un proceso muy poco eficiente (Matheson, Lee, Yamanashi, & Wolbarsht, 1974) y la fotosensibilización. Este último procedimiento será el utilizado en el presente trabajo, por lo que se describirá de forma más detallada en el apartado siguiente.

El tiempo de vida de una entidad molecular que decae siguiendo un proceso de primer orden es el tiempo necesario para que la concentración de dicha entidad disminuya hasta $1/e$ de su valor inicial. Estadísticamente representa la esperanza de vida de la entidad. Es igual al inverso de la suma de las constantes de velocidad (pseudo)unimoleculares de todos los procesos que causan su desaparición. Se define, a veces, un tiempo de vida para procesos que no son de primer orden. En tales casos, el tiempo de vida depende de la concentración inicial de la entidad, o de un desactivador, por lo que sólo puede definirse un tiempo de vida inicial o promedio. En estos casos debe llamarse tiempo de vida “aparente” (IUPAC recommendations) (Verhoeven J. W., 1996).

La desactivación de $O_2(^1g)$ por cualquier molécula presente en el medio, estará fuertemente influenciada por su tiempo de vida, independientemente de su constante de velocidad de reacción. Es por ello que el $O_2(^1g)$, a pesar de ser altamente reactivo, no se considera participante de las reacciones del oxígeno excitado (Schweitzer y col., 2003). En fase no condensada, se estima que la vida media radiativa de las moléculas de oxígeno singlete aisladas es de 45 min., con dependencia de la presión en velocidad de decaimiento (R. M. Badger, 1965). Los tiempos de vida del oxígeno singlete en solución son mucho más cortos, típicamente entre 10 y 100 μs dependiendo del solvente. Por ejemplo: en benceno, acetona y acetonitrilo y los tiempos de vida rondan 30, 50 y 70 μs respectivamente, en cambio en agua y etanol los tiempos de vida del oxígeno singlete se encuentran alrededor de los 10 y 4 μs respectivamente (Wilkinson, 1995). En solventes deuterados, el tiempo de vida del $O_2(^1g)$

aumenta notablemente, debido a cambios en la energía de los modos vibracionales del solvente (Hurst & Schuster).

El oxígeno molecular singulete en solución tiene tiempos de vida suficientemente largos para participar en reacciones bimoleculares, no tan sólo de interés biológico, sino también de interés químico. El oxígeno excitado es una especie electrofílica capaz de reaccionar con moléculas ricas en electrones, como alquenos, anillos aromáticos, o compuestos sulfurados, dando lugar a oxidaciones, a cicloadiciones [2+2] ó [2+4], a reacciones tipo “ene” con formación de hidroperóxidos, por dar algunos ejemplos (Zamadar y col. 2009). Además, las reacciones en las que participa el $O_2(^1g)$, con algunas excepciones, son procesos sin control difusional y la extensión de la reacción depende tanto de la concentración estacionaria de $O_2(^1g)$ en el sitio de reacción como de la constante de velocidad de la reacción bimolecular (Lissi y col., 1993). Debido a lo anterior, la producción y participación de esta especie reactiva del oxígeno puede ser aplicada en campos tan diversos como la síntesis química en el contexto de la Química Verde, en métodos de descontaminación medioambiental como los procesos avanzados de oxidación, o en nuevos tratamientos médicos como las terapias fotodinámicas contra microorganismos resistentes a antibióticos o contra algunos tipos de cáncer.

1.2. Fotosensibilización

La fotosensibilización corresponde a la generación de oxígeno molecular singulete ($O_2(^1g)$) por transferencia de energía desde una especie electrónicamente excitada al oxígeno en estado basal (Verhoeven J. , 1996). Como consecuencia de esta transferencia de energía, el oxígeno pasa a su primer estado electrónicamente excitado, 1g .

El proceso de fotosensibilización se inicia cuando un cromóforo, llamado fotosensibilizador (FS) (o simplemente sensibilizador), absorbe luz a una longitud de onda adecuada, promoviendo la generación de su primer estado electrónicamente excitado. Dependiendo de su estructura molecular y su entorno, el sensibilizador puede perder su energía por diversos procesos electrónicos o físicos, volviendo así al estado fundamental, o puede sufrir una transición al estado triplete excitado (Wainwright, 1998). En esta etapa, la molécula excitada puede transferir su energía al oxígeno molecular basal, formándose el oxígeno molecular singulete (1O_2). Si bien el mecanismo de la fotosensibilización se produce típicamente desde el primer estado excitado triplete del sensibilizador, el proceso puede también ocurrir desde el estado singulete.

El proceso de transferencia de energía ocurre con la aproximación de las moléculas involucradas durante el tiempo de vida del estado excitado del sensibilizador, tras lo cual se recupera el sensibilizador en estado fundamental (Wilkinson, 1993) (Tanielian, 2000). Debido a lo anterior, el proceso de fotosensibilización puede considerarse como un proceso fotocatalítico, sin embargo, la transferencia continua de energía al FS y las especies reactivas de oxígeno (EROs) formadas, pueden promover la descomposición total o parcial de este FS ocasionando su pérdida en un proceso denominado fotoblanqueamiento (Verhoeven J. , 1996). Entre los requisitos que debe poseer todo sensibilizador, para que el proceso de generación de oxígeno molecular singulete suceda de forma eficiente, se encuentran los siguientes:

- Absorción de luz UV-Vis con coeficientes de absorción molar (ϵ) elevados, preferentemente superiores a $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.
- Rendimiento cuántico de cruce intersistemas (ϕ_{ISC}) alto, para poblar eficientemente el estado triplete (T_1), que debe tener una energía superior a la del oxígeno molecular singulete.
- Tiempos de vida del estado excitado T_1 largos, en el orden de los μs o superior.
- Altos rendimientos cuánticos de producción de oxígeno molecular singulete (ϕ).
- Estabilidad térmica y fotoquímica.

Los inconvenientes más importantes en la producción de oxígeno molecular singulete ($^1\text{O}_2$) por fotosensibilizadores corresponden a:

- Cambios en las propiedades fotofísicas producidas por cambios en el entorno del FS, como pueden ser las variaciones de pH o la inmovilización del FS en un soporte. Los cambios en las bandas de absorción y en el tiempo de vida del estado T_1 pueden disminuir la eficiencia de producción de oxígeno molecular singulete.
- Desactivación del oxígeno molecular singulete por el fotosensibilizador, especialmente cuando la concentración de fotosensibilizador es alta.
- Agotamiento del oxígeno. Si el $^1\text{O}_2$ fotogenerado reacciona con un sustrato, la concentración de oxígeno podría disminuir notablemente, o hasta su completa eliminación, particularmente en experimentos prolongados en sistemas de reacción cerrados.

1.3. Rendimiento cuántico

Para que pueda ocurrir cualquier fenómeno desde un estado excitado (luminiscencia, reacción, etc.) es necesaria la absorción previa de radiación a una longitud de onda (λ) adecuada, provocando la transición de electrones desde el estado basal a estados electrónicos (y vibracionales) excitados. El proceso de absorción ocurre en escalas de tiempo del orden de los femtosegundos, luego el sistema decaerá a un nivel de menor energía (típicamente el estado basal) perdiendo el exceso de energía por vías radiativas o no radiativas.

Entre de las vías no radiativas -es decir, sin la emisión de radiación- la desactivación por conversión interna (IC) supone la transferencia de población entre estados electrónicos de igual multiplicidad. También es posible el cruce entre sistemas (ISC) que ocurre debido al solapamiento entre niveles electrónicos de diferente multiplicidad de espín, favorecido por el acoplamiento espín-órbita. Se pueden dar también procesos bimoleculares que incluyen choques o interacciones con pérdida de energía electrónica, en que la molécula excitada transfiere energía al solvente u otra especie en el medio.

Entre las vías radiativas -es decir, con emisión de radiación- se puede incluir la fluorescencia y la fosforescencia. El fenómeno de fluorescencia implica la emisión desde un estado excitado a un estado inferior de igual multiplicidad de espín, en cambio, la fosforescencia ocurre entre estados de diferente multiplicidad de espín. Según las reglas de selección, el primer fenómeno es permitido y el segundo es prohibido, lo que repercute en la duración del proceso. La emisión fluorescente es rápida y ocurre habitualmente en el rango de picosegundos a nanosegundos, mientras que la emisión fosforescente es notablemente más lenta, llegando a la escala de milisegundos y superior.

En este punto es válido aclarar que la generación fotosensibilizada de oxígeno singulete ocurre por la transferencia de energía desde una molécula en estado excitado triplete, considerando que en general las moléculas orgánicas tienen como primer estado excitado multiplicidad singulete, la eficiencia de generación de $^1\text{O}_2$ tendrá una estrecha relación con la eficiencia del proceso de cruce entre sistemas del sensibilizador para generar estados triplete a partir del singulete.

Para evaluar la eficiencia de un proceso dado, se define el rendimiento cuántico, Φ , como:

$$\Phi = \frac{\text{Núm d m d m éci q e p u c c d}}{\text{Núm d m d f a}} \quad \text{Eq. 1}$$

$$\Phi = \frac{V c q l i m o éci e p u c c d}{V d a ó n d f} \quad \text{Eq. 2}$$

1.3.1. Rendimiento cuántico de fluorescencia y de fosforescencia.

El rendimiento cuántico de fluorescencia es la relación entre el número de moléculas que emiten fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas.

$$\Phi_F = \frac{\text{Núm d f e p f}}{\text{Núm d f a}} \quad \text{Eq. 3}$$

Otra de las vías radiativas del decaimiento de una molécula excitada es la fosforescencia. Aunque, como ya se mencionó, la diferencia entre ellas radica en la multiplicidad del orbital desde donde ocurre la emisión, en la práctica se distinguen usualmente por el tiempo que transcurre entre la emisión y la absorción.

Similar al rendimiento cuántico de fluorescencia, el rendimiento cuántico de fosforescencia (Φ_F) corresponde el cociente entre la velocidad con que las moléculas fosforecen y la velocidad de absorción de fotones

A nivel general, existen dos metodologías para la determinación de Φ_F , el método absoluto y el método indirecto.

El primero de ellos permite determinar Φ_F tanto para especies en solución como en fase sólida, aunque carece de popularidad debido, principalmente, al uso de metodologías e instrumentación con requerimientos tecnológicos elevados.

El segundo método es sólo aplicable a especies en solución y es el más empleado, basado en el uso de sustancias patrón con rendimientos cuánticos previamente establecidos, ampliamente estudiados y que cumplen con características para ser empleados como referencia.

1.3.2. Rendimiento cuántico de generación de $O_2(^1\Delta_g)$ en solución, Φ_Δ

El rendimiento cuántico de generación de oxígeno singulete () es una medida de la eficiencia de generación de esta especie por cantidad de fotones absorbidos por el sensibilizador.

$$\Phi_\Delta = \frac{\text{Núm. d. m. é. c. d. } ^1O_2}{\text{Núm. d. f. a}}$$

Eq. 4

Wilkinson (1981, 1996) propuso un esquema cinético general que considera todos los procesos elementales involucrados en la generación fotosensibilizada del oxígeno molecular singulete en solución, incluyendo los procesos que conducen al consumo o desaparición de éste: desactivación por el solvente, por el mismo sensibilizador o por un sustrato reactivo.

La generación del oxígeno excitado involucra, o puede llegar a involucrar, a los dos estados electrónicamente excitados de menor energía del sensibilizador, el primer estado singulete excitado y el primer estado triplete. Como consecuencia, el rendimiento cuántico total de generación de oxígeno molecular singulete , para un sensibilizador dado, corresponderá a la suma de las contribuciones de ambos estados excitados.

Eq. 5

$$\Phi_\Delta = \Phi_\Delta(S_1) + \Phi_\Delta(T_1)$$

donde el primer término de la suma corresponde al número de moles de $O_2(^1\Delta_g)$ generados desde el primer estado singulete excitado, por mol de fotones absorbidos, y el segundo a la proporción originada por el estado triplete. De acuerdo con la expresión anterior, podría llegar a alcanzar valores iguales a 2,0 cuando de la interacción entre el estado singulete excitado del sensibilizador y el oxígeno fundamental resulta sensibilizador en estado triplete y una molécula de oxígeno singulete. Inmediatamente, todos los estados triplete del sensibilizador, serían desactivados nuevamente por moléculas de oxígeno fundamental, produciendo sensibilizador en su estado basal y una segunda molécula de oxígeno excitado. La situación descrita, claramente corresponde a un caso límite que no se observa experimentalmente.

En la literatura hay una variedad de procedimientos reportados para la determinación de rendimientos cuánticos de generación de oxígeno molecular singulete en solución. Se puede mencionar, por ejemplo: medidas de fotooxidación empleando condiciones de irradiación estacionaria (Schmidt, Tanielian, Dunsbach, & Wolff, 1994) y de irradiación pulsada. (Wilkinson, Helman, & Ross, 1993). Un tercer procedimiento empleado en forma habitual

involucra mediciones de la intensidad de la luminiscencia del $O_2(^1g)$, extrapoladas a tiempo cero (Schmidt, Tanielian, Dunsbach, & Wolff, 1994).

En el presente trabajo, sólo se empleó la última técnica mencionada para determinar rendimientos cuánticos de generación de $O_2(^1g)$, la medida de la intensidad de la luminiscencia infrarroja del $O_2(^1g)$.

La fenalenona o perinaftenona (PNF) es una molécula de estructura aromática con una cetona cíclica conjugada (*Figura 1.*) que presenta rendimientos de cruce entre sistemas cercanos a la unidad, produce importantes cantidades de oxígeno molecular singulete, tanto en solventes polares como no polares, no dependiendo de su concentración ni de la longitud de onda de excitación (entre 337 nm y 436 nm). La fenalenona es fotoestable (Schmidt, y col., 1994) y no reacciona con el oxígeno molecular singulete. Así, este compuesto se considera un estándar universal para la determinación de los rendimientos cuánticos de generación de oxígeno molecular singulete por otros compuestos.

Debido a lo anteriormente descrito, fluoróforos con estructuras derivadas de fenalenona son particularmente interesantes debido a que podrían mantener las propiedades relacionadas con altos rendimientos cuánticos de producción de oxígeno molecular singulete, pero con corrimientos de su absorción al rojo inducidos por sustitución en el núcleo de fenalenona. El fotosensibilizador propuesto, que en este trabajo se abreviará FNOXA, corresponde a la 2-(benzo[d]oxazol-2-il)-1H-fenalen-1-ona (*Figura 2.*), un derivado de fenalenona con un grupo benzoxazolil en la posición 2 respecto del grupo cetónico, unido al núcleo de fenolanena. Sin embargo, la alta hidrofobicidad del compuesto hace necesaria su incorporación en sistemas que faciliten su solubilidad en solventes más polares. De este compuesto se ha reportado que posee máximos de absorción entre 400 y 430, y emite en el rango de 511 nm a 554 nm con el rango de desplazamiento de Stokes de 100 a 136 nm. El compuesto muestra rendimientos de emisión de fluorescencia variables desde $\Phi_F = 0,166$ en cloroformo hasta a valores entre 0,038 a 0,085 en otros solventes. Posee estabilidad térmica por sobre 300°C (Phatangare y col., 2014).

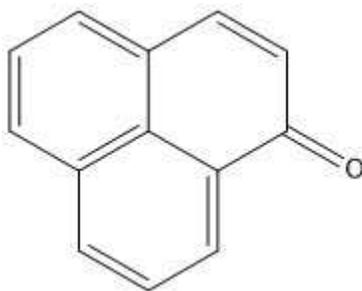


Figura 1. Estructura química de fenalen-1-ona.

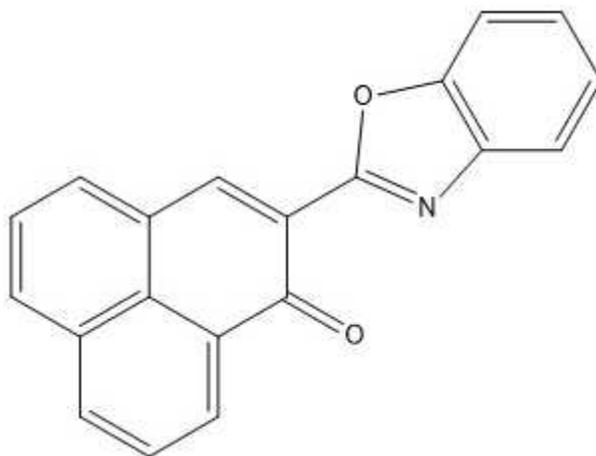


Figura 2. Estructura química de 2-(benzo[d]oxazol-2-il)-1H-fenalen-1-ona.

1.4. Sistemas micro-heterogéneos

La incorporación de fotosensibilizadores en nanopartículas es una opción prometedora -particularmente en el área de la medicina- debido a la aparición de cepas patógenas resistentes a uno o más antibióticos terapéuticamente útiles (Sengupta y col., 2013), lo que incrementa las pérdidas económicas y humanas (Kollef y col., 2001).

En este ámbito, la fotoinactivación bacteriana (PDI en inglés) es una propuesta interesante que ha recibido especial atención en las últimas décadas como posible solución al problema planteado (Hu y col., 2018) (Xiaoqing y col., 2018) (Hamblin y col., 2015) debido a que permitiría combatir infecciones sin generar nuevas resistencias en los microorganismos (Lauro y col., 2002). La PDI utiliza un agente FS que induce la formación de EROs altamente tóxicas, como el oxígeno molecular singulete, sobre células blanco causando necrosis celular (Huang y col., 2010). Otra aplicación interesante del uso de fotosensibilizadores corresponde al tratamiento de aguas, permitiendo la oxidación de variadas especies orgánicas reduciendo la demanda bioquímica y química de oxígeno (García-Fresnadillo, 2018).

Sin embargo, el uso directo de los FS en tratamientos en sistemas biológicos presenta diferentes problemas, principalmente, debido a las características de polaridad de los FS que dificultan su administración y limitan su eficiencia. Frente a esto, el desarrollo de nanosistemas es una herramienta de gran relevancia, ya que se puede mejorar la solubilidad y lograr el control espacio-temporal de la llegada del FS a células blanco, dado que no sólo dependerá de la propia estructura del FS ni sus características fisicoquímicas, sino de las del nanosistema (Skurko, 2020).

1.4.1. Sistemas micelares

Los surfactantes o tensoactivos corresponden a moléculas que tienen características duales de hidrofiliidad e hidrofobicidad y que presentan actividad superficial, tendiendo a adsorberse en las interfaces. El carácter anfipático viene dado por una porción apolar, hidrofóbica, generalmente formada por cadenas hidrocarbonadas; y por una porción hidrofílica, que muestra una fuerte afinidad o atracción hacia los disolventes polares (D. Nikunj, 2017). El grupo polar puede ser aniónico, catiónico, anfótero o no iónico, característica que se suele utilizar para agrupar y clasificar a los surfactantes.

La presencia de este tipo de moléculas en solución implica la existencia de interacciones con el solvente, atractivas para un segmento y repulsivas para el otro, lo que se traduce en la formación espontánea de agregados de tamaño coloidal, llamados micelas, por sobre la concentración micelar crítica (CMC). En medio acuoso, las moléculas se orientan de modo tal que las cadenas hidrocarbonadas tengan el menor contacto posible con el solvente, quedando las cabezas polares en contacto directo con éste (D. Nikunj, 2017).

La concentración a la que comienzan a formarse las micelas se denomina concentración micelar crítica (CMC), característica fisicoquímica importante, ya que las moléculas de surfactante se comportan de manera diferente dependiendo de si están presentes en micelas o como monómeros libres. De hecho, la evaluación experimental de la CMC se basa en el cambio de alguna propiedad fisicoquímica con el aumento de la concentración de surfactante. La CMC no es un valor preciso, sino que corresponde a un rango de concentración, y su magnitud experimental depende de la metodología empleada para evaluarlo (D. Nikunj, 2017).

La existencia y naturaleza de este tipo de estructuras (micelas) proporciona al sistema un carácter bifásico, por lo que estos agregados pueden influir en la solubilidad de un soluto y modificar sus propiedades fisicoquímicas.

1.4.2. Nanosistemas rígidos y flexibles

La nanotecnología es un campo interdisciplinario prometedor en diferentes ámbitos, en particular en la obtención de nanopartículas (NP) debido a sus propiedades ópticas, magnéticas y estructurales. Es por esto que, en este trabajo se propone el uso de NP como vehículos de transporte y su acoplamiento, por adsorción o mediante unión covalente al FS, para optimizar su potencial utilización (Abrahamse, 2017).

Entre la variedad de vehículos existente para el transporte de compuestos bioactivos, el uso de vesículas como transportadores supone muchas ventajas, entre las que se pueden destacar: mejora en la solubilidad, protección a la degradación, liberación sostenida y -en los casos que corresponda- modificarían las características farmacocinéticas y biodisponibilidad (Allen, 1998).

Las vesículas son estructuras de bicapa cerrada -en principio, de forma esférica- que se pueden formar a partir de lípidos o surfactantes de topología cilíndrica. En particular, se denominan liposomas a aquellas vesículas constituidas por fosfolípidos. Las propiedades de las vesículas dependen de la composición de los lípidos, la carga superficial, el tamaño y el método de preparación. El tamaño de estas estructuras puede variar desde vesículas muy pequeñas (0,025 μm) a grandes (2,5 μm). Se pueden clasificar en: vesículas multilaminares (MLV) y vesículas unilaminares.

Las vesículas unilaminares también se pueden clasificar en dos categorías: vesículas unilaminares grandes (LUV) y vesículas unilaminares pequeñas (SUV). En las vesículas unilaminares, la vesícula tiene una única esfera de bicapa de lípidos que encierra la solución acuosa. En las vesículas multilaminares consisten en varias vesículas unilaminares, una en el interior de la otra, formando una estructura multilaminar de esferas fosfolipídicas concéntricas separadas por capas de agua (Akbarzadeh, y otros, 2013).

Otra opción prometedora es el uso de nanopartículas inorgánicas como, por ejemplo, el uso de NP de sílice amorfa debido a sus propiedades fisicoquímicas, (Frederice y col., 2010) (Mamaeva y col., 2013) dentro de las que destacan su estabilidad química, gran capacidad de carga y versatilidad sintética (obtención controlada en cuanto a tamaño, poro y forma, además de su carácter hidrofílico y capacidad para la funcionalización superficial) (Slowing y col., 2010) (Stöber y col., 1968).

En las últimas décadas, la aplicación de nanopartículas de sílice (Si-NP) con fines farmacéuticos es una disciplina emergente y prometedora, siendo utilizadas en el ámbito del biomarcaje e imagenología, y como sistemas de administración de fármacos (Mamaeva y col., 2013). En la investigación farmacéutica, diversos estudios han demostrado que los vehículos porosos de sílice podrían ser utilizados en el desarrollo de formas farmacéuticas para moléculas de baja solubilidad en agua (Zhang, y col., 2010). La presencia de poros otorga una gran área superficial, la cual puede ser modificada con relativa facilidad; posibilitando la adsorción, conjugación y encapsulación de diversas moléculas de interés farmacológico y el posible control de su liberación (Manzano y col., 2008).

Las nanopartículas de sílice poseen hidroxilos en su superficie, los cuales pueden reaccionar para formar nuevas funcionalidades. La funcionalización orgánica de estos sólidos permite el ajuste de las propiedades de su superficie (por ejemplo, hidrofiliidad, hidrofobicidad, unión a moléculas huésped), la modificación de la reactividad, la protección del ataque junto con la modificación de las propiedades generales de los materiales y al mismo tiempo la estabilización temporal de los materiales frente a hidrólisis (B. Asim, 2013).

En este ámbito, las nanopartículas de sílice se han utilizado para incorporar [por oclusión (Mortera y col., 2009), adsorción no covalente (Doane y col., 2013) y/o unión covalente (Ohulchanskyy y col., 2007)] diferentes moléculas, tales como: fármacos (Bhaskara, y otros, 2014), fotosensibilizadores (Kumar y col., 2008), biomoléculas (Chen y col., 2013), antioxidantes (Zhang y col., 2008) y otros (Sun y col., 2011), para su posterior liberación.

Si bien el término “nanopartícula” se encuentra asociado a partículas de diferente naturaleza que por lo menos tienen una de sus dimensiones en el rango nanométrico (~100 nm) con dimensiones menores a 300-500 nm de diámetro y una elevada relación entre área superficial y volumen; en este trabajo el término de nanopartículas se referirá exclusivamente a NP-Si, para hacer una diferenciación clara de vesículas, independiente de que su tamaño también puede encontrarse en el rango nanométrico.

2. Hipótesis

La sustitución en el núcleo de la fenalenona provocará un desplazamiento batocrómico de la absorción sin provocar cambios significativos en la fotofísica de este compuesto, manteniendo un elevado rendimiento cuántico de generación de oxígeno molecular singulete. Adicionalmente, se espera que este compuesto adsorbido a nanopartículas de sílice o incorporado en la región hidrofóbica de micelas o vesículas mantendrá una elevada capacidad de generar oxígeno molecular singulete.

3. Objetivos

3.1. Objetivos generales

Estudiar el comportamiento fotofísico de la molécula 2-(benzo[d]oxazol-2-il)-1H-fenalen-1-ona, particularmente en la generación de oxígeno molecular singulete en medio homogéneo y en micelas, nanopartículas de sílice y vesículas (como efectivos soportes moleculares para la adsorción/incorporación del compuesto en cuestión), para establecer su posible uso como efectivo agente fotosensibilizador.

3.2. Objetivos específicos

1. Establecer la magnitud de la adsorción del derivado de fenalenona en nanopartículas de sílice no porosas y mesoporosas, obteniendo la eficiencia de encapsulación y el porcentaje de carga del compuesto.
2. Evaluar el rendimiento cuántico de fluorescencia de benzo[d]oxazol-2-il)-1H-fenalen-1-ona en medio homogéneo y microheterogéneo.
3. Evaluar el rendimiento cuántico de generación de $O_2(^1\text{g})$ del benzo[d]oxazol-2-il)-1H-fenalen-1-ona en medio homogéneo y microheterogéneo.
4. Comparar los resultados obtenidos en este trabajo, en relación con los valores reportados en literatura de la fenalenona sin modificar, analizando el efecto del sustituyente en el núcleo de la fenalenona y el comportamiento del sistema en los diferentes microentornos.

4. Metodología

4.1. Nanosistemas rígidos

4.1.1. Preparación de nanopartículas de sílice no porosas

La síntesis de nanopartículas no porosas se basó en el método Stöber previamente descrito en la literatura (Tadanaga, Morita, Mori, & Tatsumisago, 2013).

Brevemente, se agrega una cantidad de tetraetilortosilicato (TEOS) (6 mL) a una mezcla de agua, etanol e hidróxido de amonio (40, 120 y 7 mL), la cual se deja con agitación constante por 2 horas. Las nanopartículas de sílice formadas (se observa una suspensión de color blanco) se recuperan mediante centrifugación y lavados sucesivos con etanol y agua.

4.1.2. Preparación de nanopartículas de sílice mesoporosas

La síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosas (MNP) se encuentra ampliamente estudiada y se planteó la utilización de un método ya informado, con modificaciones (Ugazio y col., 2016) (Nairi y col., 2018).

Brevemente, se agrega una cantidad de tetraetilortosilicato (TEOS) a una solución que contiene cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC), agua desionizada e hidróxido de sodio a 80 °C bajo agitación constante. Las nanopartículas obtenidas se recuperan mediante centrifugación y lavados con etanol y agua. El tensoactivo se elimina mediante resuspensión con una solución etanólica ácida a reflujo. El producto se lava nuevamente con agua y etanol. Para calcular la cantidad de nanopartículas producidas, una alícuota de nanopartículas resuspendidas en etanol son secadas y pesadas.

4.1.3. Funcionalización de nanopartículas

Las nanopartículas de sílice poseen hidroxilos en su superficie los cuales fueron funcionalizados para obtener un grupo aminopropil.

Tanto para nanopartículas de sílice no porosas como mesoporosas, se agrega a un balón una cantidad de nanopartículas dispersas en etanol absoluto, se añade gota a gota (3-aminopropil)triétoxissilano (APTES) en una proporción de 500 μ L por 300 mg de NPs, la mezcla se deja reaccionar toda la noche a 40 °C bajo agitación. El producto se recupera mediante centrifugación y lavados con etanol 95% y etanol absoluto.

4.1.4. Adsorción de sensibilizador en nanopartículas de sílice

La fisisorción del fotosensibilizador se realizó empleando el método tipo batch. Para esto se añade una cantidad conocida del fotosensibilizador a una solución con una concentración conocida de adsorbente (nanopartículas) permitiendo que se alcance el equilibrio. El producto (nanopartícula y sensibilizador adsorbido) se recupera por centrifugación. La técnica de adsorción se propuso considerando que la presencia de átomos electronegativos en la molécula sensibilizador puede formar enlaces de hidrógeno con los grupos -OH y NH₂ expuestos de la nanopartícula. Además, es posible que la alta hidrofobicidad del fotosensibilizador permita que éste interactúe con la superficie de la nanopartícula.

La eficiencia de encapsulación (%EE) y el porcentaje de carga del compuesto (%LC), se determinaron utilizando las siguientes ecuaciones (Merck-Sigma Aldrich, s.f.):

$$\%E = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} * 100 \quad \text{Eq. 6}$$

$$\%L = \frac{(C_i - C_f)}{P} * 100 \quad \text{Eq. 7}$$

Donde C_i y C_f son las cantidades de compuesto inicialmente agregadas en las nanopartículas desarrolladas y la cantidad de compuesto no encapsulado determinada por el método HPLC, respectivamente. El peso total es la cantidad total de nanopartículas y compuesto en la preparación final.

4.2. Nanosistemas flexibles (sistemas coloidales de asociación)

4.2.1. Preparación de micelas y vesículas

Los estudios en sistemas micelares involucran la formación de micelas, por lo que los experimentos se llevaron a cabo con concentraciones de surfactante a 10 y 50 veces la CMC para SDS y CETAB, mientras que la solubilidad del TX-100 sólo permite trabajar a 10 veces la concentración de la CMC.

Para la preparación de vesículas se trabajó con dipalmitoilfosfatidilcolina (**DPPC**) y DODAC y se le añadió la cantidad adecuada de sensibilizador. El tamaño de vesícula se puede definir según la metodología empleada para su preparación, entre los procedimientos

más comunes de en la preparación de vesículas se encuentra el método de extrusión y el de sonicación. (Lapinski y col., 2007).

La ultrasonicación de suspensiones acuosas de lípidos o tensioactivos (puros o mezclados en las proporciones requeridas) permite obtener Vesículas Unilamelares Pequeñas (SUVs en inglés) (Allen, 1998).

Se obtuvieron vesículas unilaminares (SUV) mediante ultrasonicación del lípido en suspensión acuosa, utilizando un homogeneizador ultrasónico Cole Parmer, en una cabina acústica (Dawe tipo 7532-1A) durante 15 min. (5x3min.) a temperatura ambiente (Ortan, Câmpeanu, Dinu, Pîrvu, & Popescu, 2009)

4.3. Caracterización

4.3.1. Mediciones espectroscópicas en estado estacionario

Las propiedades fisicoquímicas de la sonda se caracterizaron mediante el estudio y comparación de su comportamiento fotofísico en distintos sistemas. Esto incluyó la absorbancia/emisión de radiación UV-Vis del sensibilizador, con metodologías en estado estacionario y resueltas en el tiempo, así como la medición directa de la fosforescencia del oxígeno singlete en el infrarrojo cercano (1270 nm).

Los espectros de absorción ultravioleta-visible se obtuvieron en un espectrofotómetro UV-Visible ATI-Unicam UV4 y controlado por el software Vision.

Los espectros de emisión se obtuvieron en un Fluorímetro PC1 ISS provisto de polarizadores y controlado por el programa VINCI.

Espectros infrarrojos de transformada de Fourier (FT-IR) se registraron en un equipo Nicolet iS5 (Thermo Scientific, EE. UU.) Con una resolución de 4 cm^{-1} , entre 4000 y 500 cm^{-1} , y el espectro final corresponde a un promedio de 16 barridos.

4.3.1.1. Evaluación de rendimientos cuánticos de fluorescencia

El método más confiable para registrar rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) es el método comparativo de Williams *et al.* (1983) que consiste en el uso de estándares con valores bien conocidos de Φ_F denominados actinómetros. Se asume como principio básico que soluciones del estándar y de la muestra a igual absorbancia, a la misma longitud de onda de excitación y en las mismas condiciones absorben el mismo número de fotones, luego, una

relación simple entre el área bajo la curva del espectro de emisión de las dos soluciones será equivalente a la relación entre los valores de Φ_F .

Se grafica el área bajo la curva del espectro corregido de fluorescencia en función de las absorbancias, en un rango lineal de absorbancias con un máximo de 0,1 unidades, tanto para el estándar como para las muestras. Luego se utilizará la razón de la pendiente de estos gráficos para calcular el valor de Φ_F de la muestra, aplicando un factor de corrección por índice de refracción en caso de ser necesario. Lo anterior es expuesto en la siguiente expresión:

$$\Phi_X = \Phi_S \left(\frac{G_X}{G_S} \right) \left(\frac{\eta_S^2}{\eta_X^2} \right) \quad \text{Eq. 4}$$

Donde los subíndices ST y X denotan al estándar y a la muestra respectivamente, Φ es el rendimiento cuántico de fluorescencia, Grad es la pendiente del gráfico entre la intensidad de fluorescencia integrada en función de la absorbancia y η es el índice de refracción del solvente.

4.3.2. Mediciones con resolución temporal

Las mediciones tiempo de vida de la luminiscencia se llevaron a cabo con la técnica de recuento de fotones individuales correlacionados en el tiempo (TCSPC) utilizando un espectrómetro de vida útil de fluorescencia con un escalador multicanal con una resolución de 30 ps (corresponde a un sistema PicoQuant Fluotime 200). Las fuentes de excitación se seleccionaron según la absorbancia del fluoróforo. La evolución temporal del oxígeno molecular singulete, $O_2 (^1g)$, con tiempos de vida en el rango de microsegundos se adquirieron con un fotomultiplicador NIR y seleccionando la longitud de onda con un filtro de interferencia. Los rendimientos cuánticos de oxígeno molecular singulete (Φ) se determinaron comparando la intensidad de la señal a 1270 nm, extrapolado a tiempo cero, de soluciones de fenalenona u otro actinómetro (método comparativo).

4.3.2.1. Evaluación de rendimientos cuánticos de generación de oxígeno singlete

En este caso, se observa la evolución temporal de la intensidad de la luminiscencia infrarroja del oxígeno molecular singlete, propiedad directamente proporcional a la cantidad de $O_2(^1g)$ presente en el medio y se mide el rendimiento cuántico de fosforescencia del $O_2(^1g)$. La intensidad de la luminiscencia extrapolada a tiempo cero es proporcional a la cantidad de $O_2(^1g)$ generada por el sensibilizador inmediatamente tras el pulso del láser. Si se compara la intensidad de la emisión a tiempo cero para el sensibilizador en estudio (S) con la obtenida en las mismas condiciones experimentales para un sensibilizador de rendimiento cuántico de generación de $O_2(^1g)$ conocido (S'), se obtendrá $\Phi_{\Delta}(S)$ para el sensibilizador (S), relativo al sensibilizador de referencia (S').

Eq. 5

$$\frac{\Phi_{\Delta}(S)}{\Phi_{\Delta}(S')} = \frac{L_{\Delta}(S)_{t=0}}{L_{\Delta}(S')_{t=0}}$$

4.4. Caracterización de nanopartículas

El potencial Zeta (ζ) y el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas se obtuvieron utilizando un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, UK) con un ángulo de detección de 173 °C y un tiempo de equilibrio de 120 s. Para la determinación de los potenciales Zeta, las nanopartículas se suspendieron en agua desionizada.

5. Resultados y discusión

5.1. Síntesis de nanopartículas y adsorción

La síntesis de las nanopartículas fue realizada por batch según los procedimientos ya descritos (ver sección metodología). En la Tabla 1 se muestran los rendimientos obtenidos considerando todas las síntesis realizadas.

Tabla 1. Rendimiento promedio para las diferentes NP sintetizadas.

Tipo NP	Rendimiento promedio
OH _C	313 m /m T
OH _M	397 m /m T
NH _{2C}	0,6 g NH ₂ /g O
NH _{2M}	1,08N NH ₂ /g O

Para la adsorción del fotosensibilizador en las estructuras de sílice, se dejó en contacto el compuesto FNOXA con una cantidad de nanopartículas en un volumen de solvente durante 16 horas. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas y las nanopartículas separadas se guardaron, y luego se cuantificó la cantidad de FNOXA en el sobrenadante mediante HPLC.

La columna utilizada es C-18 de 35 cm, utilizando como fase móvil ACN (80%) y (TFA 0,1%) con un flujo de 1,5 L/min. El tiempo de retención del solvente se obtuvo a los 2 min. y el tiempo de retención del compuesto a los 3,75 min. De iniciada la corrida cromatográfica. Para esta determinación se utilizó un detector DAD, midiendo a una longitud de onda de 420 nm.

La curva de calibración abarcó un rango lineal de concentración entre 10^{-6} M y 7×10^{-5} M. Considerando el área bajo la curva, se obtuvo como curva de calibración una recta con un coeficiente de correlación de Pearson de 0,9994, una pendiente con un valor de 5×10^9 área/M y un intercepto con un valor de 1266,4 área.

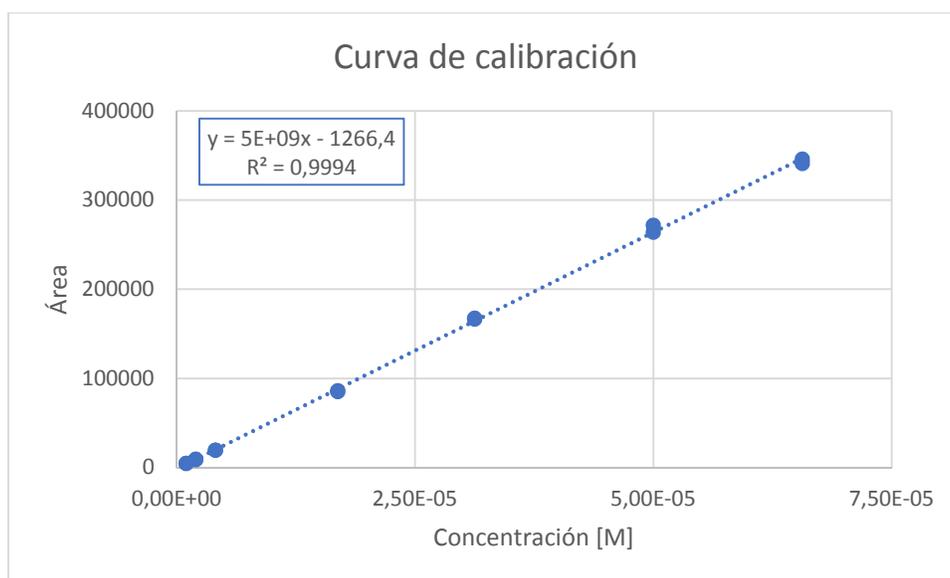


Figura 3. Curva de calibración en HPLC de FNOXA con detector DAD a 420 nm.

La determinación de la fracción no adsorbida del compuesto por HPLC (correspondiente al sobrenadante separado por centrifugación de la mezcla nanopartícula-sensibilizador) permitió calcular parámetros como la eficiencia de encapsulación (%EE) que da cuenta del porcentaje de sustrato que queda atrapado o adsorbido con éxito en la nanopartícula y la eficiencia de carga (%LC) que muestra la razón del sustrato incorporado por unidad de peso de nanopartícula.

En la Tabla 2, se informan los resultados de poner en contacto 5 mg de FNOXA con 100 mg de nanopartícula en 20 mL de etanol como solvente.

Tabla 2. Eficiencias de encapsulación y de carga de FNOXA en diferentes tipos de NP.

Tipo de nanopartícula	%EE	%LC
OH _C	8,86 ± 0,2	0,0412 ± 0,0008
OH _M	10,5 ± 0,4	0,053 ± 0,002
NH _{2C}	3,38 ± 0,08	0,0168 ± 0,0005
NH _{2M}	1,97 ± 0,01	0,0098 ± 0,0001

Los resultados muestran que los porcentajes de eficiencia de encapsulación y de carga del compuesto en estudio son mayores en las nanopartículas con función hidroxilo que cuando la funcionalización corresponde al grupo amino. Evidentemente, en este sistema se ven favorecidas las interacciones con el grupo hidroxilo, donde pueden estar implicados enlaces de hidrógeno entre el grupo dador de la nanopartícula y alguno de los átomos electronegativos del sensibilizador, el cual posee un nitrógeno y un oxígeno en la fracción del oxazol y otro oxígeno en el núcleo de la fenalenona. Es posible que las diferencias encontradas en el %LC entre NPOH y NPNH₂ se deba a las leves diferencias que presenta el enlace por puente de hidrógeno (ángulo, distancia y energía de enlace) teniendo como dador al grupo hidroxilo o al grupo amino (Grabowski, 2003), encontrándose más favorecido este tipo de interacción con el grupo hidroxilo.

Las nanopartículas mesoporosas tienen mayor área superficial y deberían tener mayor capacidad para adsorber sensibilizador; sin embargo, este efecto no es apreciable siendo el factor dominante el grupo expuesto de la nanopartícula.

Además, se evaluó el efecto en relaciones diferentes de sustrato-nanopartícula en la eficiencia de incorporación y de carga. Para esto, se seleccionaron proporciones de 1:200 y 1:4000 con el fin de dilucidar si el equilibrio fisicoquímico se ve beneficiado por aumento de la proporción de nanopartículas, encontrándose que el %EE aumentó hasta un 13% para el caso de las OH_M y un 10% para NH_{2M}. Por otra parte, el %LC disminuyó notoriamente hasta en un factor cercano a 4 para el NH_{2M} y hasta un porcentaje de carga despreciable en el caso de OH_C.

Se obtuvieron valores muy bajos de adsorción, por lo que para estudios posteriores es razonable proponer un sustituyente altamente hidrofóbico en la nanopartícula para favorecer el proceso de adsorción del sustrato mediante interacciones hidrofóbicas por sobre la

formación de enlaces de puente de hidrógeno. Adicionalmente, incluyendo modificaciones en el FS, sería posible optar por mecanismos de quimisorción mediante enlaces covalentes entre grupos reactivos del sensibilizador y de la nanopartícula.

Dada la hidrofobicidad del compuesto, y la ausencia de grupos funcionales en su estructura que permitan la interacción con superficies polares como las de nanopartículas de sílice sin modificación y con funcionalización con grupo amino, es que se propone en el futuro modificar la superficie de estas nanopartículas con grupo apolares, como grupos metil, que permitan la interacción hidrofóbica entre el fotosensibilizador y la nanopartícula, obteniendo así mejores eficiencias de encapsulación y de carga, sin embargo, el problema podría presentarse en la dispersión de estas nanopartículas en solventes polares.

5.2. Caracterización de nanopartículas de sílice

La caracterización por tamaño de las nanopartículas se realizó mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS por su sigla en inglés) y el potencial Zeta por Doppler láser electroforesis, ambos en el equipo zetasizer mencionado en la metodología.

Las mediciones de distribución de tamaño se realizaron utilizando agua mili-Q como solvente para las nanopartículas -OH y etanol para las nanopartículas -NH₂, ya que estos solventes producen menos agregaciones en las respectivas nanopartículas. En cambio, la medición del potencial Zeta necesariamente se ha de realizar utilizando agua mili-Q como solvente. Para esto, las nanopartículas secas en forma de polvo fueron resuspendidas en el solvente adecuado y luego se procedió a determinar la distribución de tamaño y potencial Zeta en el equipo, utilizando cubetas desechables.

Los resultados obtenidos de las distribuciones de tamaño de nanopartículas basado en intensidad, volumen y número son sumariados en las Tabla 3 y 4. Además, se indica el índice de polidispersidad y el potencial Z medido (ζ).

La función química en la superficie de la nanopartícula es indicada por “OH” o “NH₂”, la letra C es para nanopartículas compactas o no porosas, M para el tipo mesoporosas y ADS para las nanopartículas con el sensibilizador adsorbido. Se aparejó de modo que las nanopartículas en blanco y con el sensibilizador adsorbido corresponden a la misma partida de síntesis.

Tabla 3. Tamaño de NP-OH evaluados por DLS.

Tipo	PDI	Tamaño medio [nm] de distribución por:			ζ (mv)
		Intensidad	Número	Volumen	
OH C	0,12 ± 0,03	284 ± 9	244 ± 3	309 ± 15	-35,9 ± 0,4
OH C ADS	0,41 ± 0,5	120 ± 3	81 ± 4	103 ± 2	-41 ± 1
OH M	0,38 ± 0,01	363 ± 22	173 ± 8	499 ± 64	-23 ± 1
OH M ADS	0,45 ± 0,02	268 ± 30	159,9 ± 55	169 ± 19	-27,1 ± 0,7

Tabla 4. Tamaño de NP-NH₂ evaluados por DLS.

Tipo	PDI	Tamaño medio [nm] de distribución por:			ζ (mV)
		Intensidad	Número	Volumen	
NH₂ C	0,31 ± 0,03	349 ± 46	294 ± 10	342 ± 10	31,9 ± 0,6
NH₂ C ADS	0,23 ± 0,04	289 ± 17	263 ± 9	307 ± 24	27,3 ± 0,6
NH₂ M	0,41 ± 0,01	264 ± 29	226 ± 12	287 ± 48	26,9 ± 0,8
NH₂ M ADS	0,35 ± 0,01	295 ± 30	217 ± 6	310 ± 5	24,4 ± 0,6

Se puede observar que el tamaño de las nanopartículas es similar en todas las síntesis realizadas y que efectivamente las nanopartículas se encuentran dentro del rango nanométrico. Además, el índice de polidispersión (PDI) se encuentra dentro de valores aceptables (~0,4), aunque no todos los casos alcanzan el ideal (< 0,3). El potencial Zeta es negativo en las NP con grupos OH y positivo en aquellas con funcionalización amino, tal y como era de esperarse, pues el potencial Zeta es un indicativo del valor de la carga eléctrica de la nanopartícula. Al comparar el valor medido de potencial Zeta entre nanopartículas compactas y mesoporosas, de la misma funcionalización, se observa que el potencial de las nanopartículas compactas es de mayor magnitud que el de las nanopartículas mesoporosas.

Al comparar el cambio de las nanopartículas de sílice (NP-OH) compactas y mesoporosas luego de adsorber FNOXA sobre su superficie, se observa que disminuye el valor del tamaño medio de las nanopartículas según todas las distribuciones. Lo anterior va acompañado de un incremento de la magnitud del potencial Zeta alrededor de 5mV (Z), el cual, al ser proporcional al valor de la carga superficial de la nanopartícula, es un indicativo de la capacidad de las nanopartículas para repelerse y evitar aglomeraciones; esto explica por qué se observan las mencionadas variaciones respecto al tamaño, la adsorción del sustrato disminuye las aglomeraciones de nanopartículas y, por ende, el tamaño medio observado. Esta variación en el tamaño medio de las NP-OH es más grande y evidente en el caso de las nanopartículas compactas, pues la magnitud del potencial Zeta es mayor que en el caso de las nanopartículas mesoporosas. Si bien las nanopartículas mesoporosas tienen mayor área superficial y, por consiguiente, una mayor cantidad de grupos hidroxilos; parte de estos grupos se encuentran en el interior de los poros y no aportan a una disminución del potencial Zeta.

En el caso de las nanopartículas de sílice funcionalizadas con APTES (NP-NH₂), luego de adsorber el sensibilizador sobre su superficie se pueden realizar dos observaciones sobre los resultados.

Primero, que las nanopartículas compactas presentan una leve disminución del tamaño medio observado y del potencial Zeta. Si bien disminuye el potencial Zeta en casi 5 mV, el mismo sensibilizador -en algún grado- puede estar evitando mayores aglomeraciones. Debido a que se encuentra aportando “carga negativa”, aunque la carga neta superficial de la NP sigue siendo positiva, esta contribución puede estar produciendo el efecto de disminuir aglomeraciones entre nanopartículas con sustrato adsorbido.

Segundo, las nanopartículas mesoporosas no presentan una variación clara del tamaño medio entre las nanopartículas blanco y aquellas cargadas con sensibilizador, pues las diferencias se encuentran dentro del error estándar asociado a las mediciones.

5.2.1. Espectroscopía infrarroja

Para caracterizar la adsorción de sensibilizador en las nanopartículas se recogieron espectros FT-IR de la FNOXA y de las nanopartículas -OH y amino funcionalizadas, tanto como blanco y con el compuesto adsorbido.

Espectro FT-IR FNOXA:

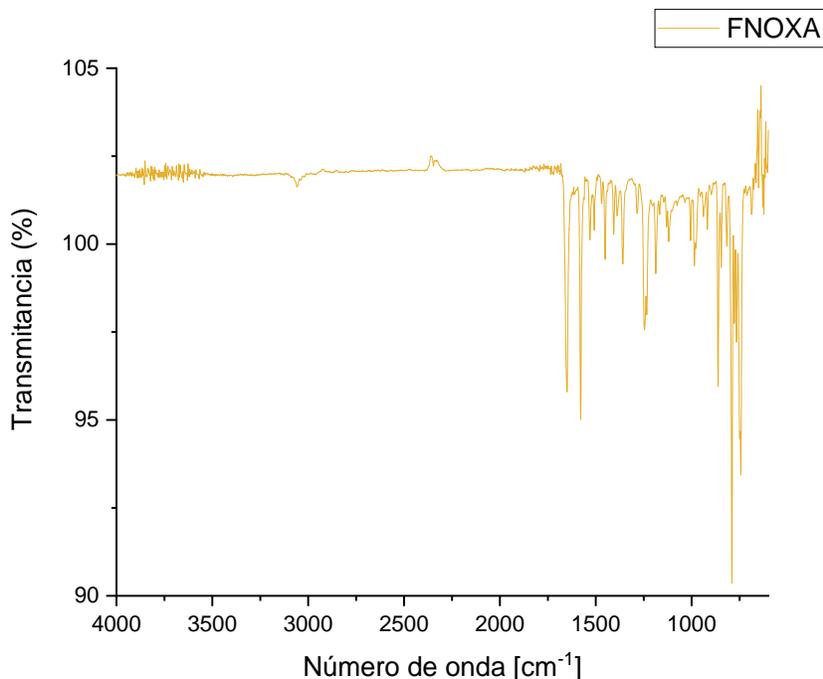


Figura 4. Espectro FT-IR de molécula FNOXA.

En el espectro FT-IR de la FNOXA (Figura 4) se distinguen las siguientes bandas de absorción: a 3054 cm^{-1} (stretching -C-H aromáticos), en 1650 cm^{-1} (stretching C=O de la cetona conjugada), en $\sim 1578\text{ cm}^{-1}$ (stretching C=C y C=N del anillo) en 1247 cm^{-1} (stretching C-O-C aromático), 985 cm^{-1} (bending C-H en el plano), 862 , 790 y 743 cm^{-1} (bending C-H fuera del plano).

En el espectro FT-IR de las nanopartículas OH (Figura 5) se puede distinguir una banda ancha de absorción entre 3050 cm^{-1} y 3550 cm^{-1} , característica de la tensión OH de los grupos Si-OH aislados. Es posible observar una banda de absorción en 1072 cm^{-1} debido a los grupos Si-O-Si y un hombro hacia 1220 cm^{-1} asociado al largo y ramificación de las cadenas de siloxano, por ello es más notorio en las nanopartículas compactas. Las señales a 968 cm^{-1} y a 800 cm^{-1} corresponden a la vibración asimétrica de Si-OH y la vibración simétrica de Si-O. En el caso de las nanopartículas mesoporosas en 880 cm^{-1} se observa una banda adicional (que cobra relevancia al estar el compuesto adsorbido) que se puede asociar a la superposición de peaks de SiO₂ entre 800 cm^{-1} y 1260 cm^{-1} .

Espectros FT-IR NP-OH:

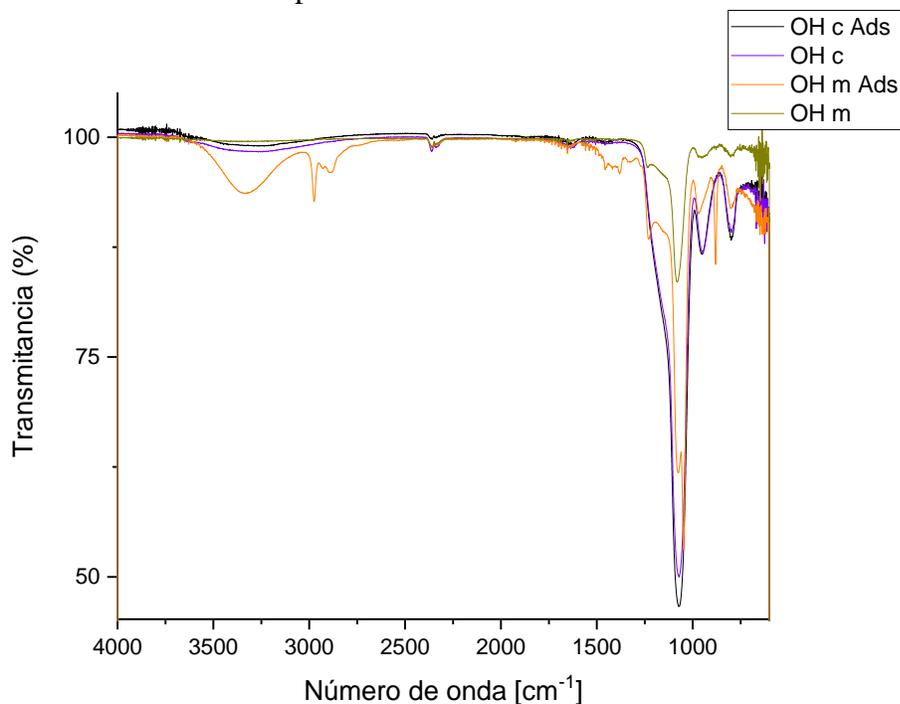


Figura 5. Espectro FT-IR de NP-OH, con sustrato adsorbido y no adsorbido.

En el caso de OH_M Ads, se observa claramente en 2980 cm⁻¹ y 2879 cm⁻¹ bandas de tensión -C-H, en 1454, 1419 y 1380 cm⁻¹ se pueden observar stretching C=O, C=C y C=N del anillo respectivamente.

En el caso de OH_C Ads como la cantidad adsorbida de fotosensibilizador es muy baja, sólo se pueden detectar pequeñas variaciones en el espectro, respecto a la nanopartícula sin adsorbato, que pueden asociarse al sensibilizador adsorbido.

En el espectro FT-IR de las nanopartículas NH₂ (Figura 6) se puede distinguir una disminución de la banda ancha de absorción entre 3050 cm⁻¹ y 3550 cm⁻¹, característica de la tensión OH de los grupos Si-OH aislados; esto se debe existen grupos hidroxilos que no fueron amino-funcionalizados, o bien, que sufrieron una hidrólisis posterior.

Al igual que en el espectro anterior, es posible observar bandas de absorción debido a los grupos Si-O-Si en 1072 cm⁻¹, un hombro hacia 1220 cm⁻¹; asociado al largo y ramificación de las cadenas, la vibración asimétrica Si-OH en 949 cm⁻¹, y la vibración simétrica de Si-O en 794 cm⁻¹.

En los dos tipos de nanopartículas, porosas y mesoporosas, con sensibilizador adsorbido se pueden distinguir ligeras señales, respecto a las nanopartículas en blanco, que dan cuenta de la adsorción.

Espectros FT-IR NP-NH₂:

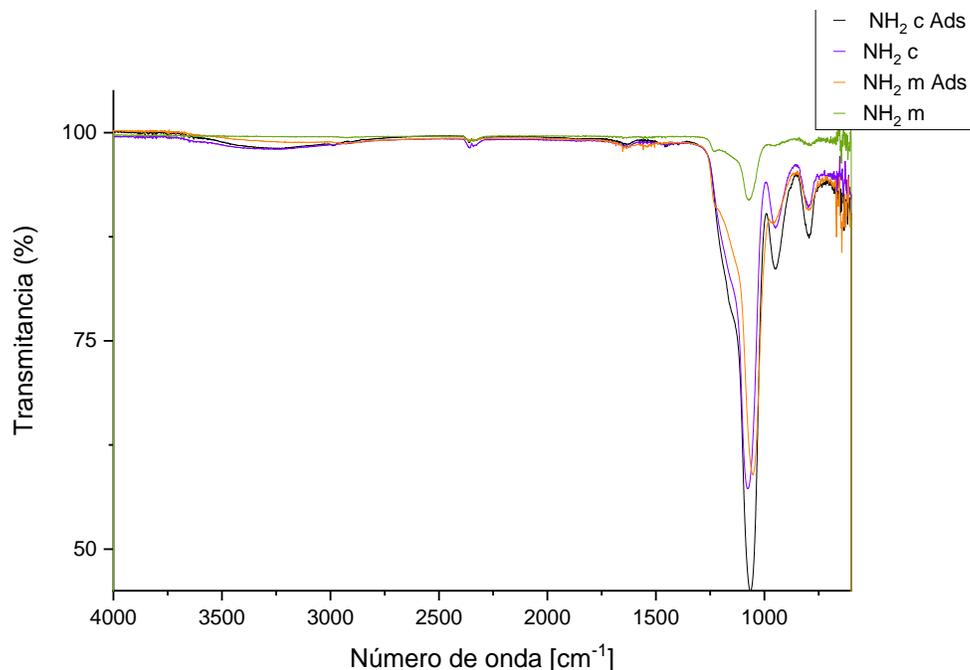


Figura 6. Espectros FT-IR de NP-NH₂, con sustrato adsorbido y no adsorbido.

5.3. Preparación y caracterización de vesículas

Se trabajó con DODAC y el fosfolípido DPPC. La caracterización por tamaño de las vesículas se realizó mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS por su sigla en inglés) en el equipo zetasizer mencionado en la metodología.

Las vesículas preparadas por ultrasonicación presentan una polidispersidad adecuada ($\sim 0,4$). Con ambos tipos de surfactante, se obtuvieron vesículas en el rango nanométrico, la distribución por intensidad se ve mayormente afectada por agregados de mayor tamaño y por ello tiende a tener un valor más elevado que las otras distribuciones. El tamaño de la vesícula según la distribución por número se asemeja a la distribución por volumen, con la diferencia que la distribución por número es más estrecha mientras que la distribución por volumen tiende a pesquisar agregados de mayor tamaño.

Tabla 5. Tamaño de las vesículas DODAC y DPPC evaluados por DLS.

Tipo	Adición de sensibilizador	PDI	Z-Average (nm)	Tamaño medio [nm] de distribución por:		
				intensidad	número	volumen
DODAC	Blanco	0,56 ± 0,01	151 ± 3	155 ± 49	30 ± 2	61 ± 20
DODAC	FNOXA 2:1	0,52 ± 0,03	130,2 ± 8	178 ± 85	33 ± 5	68 ± 13
DODAC	Blanco	0,27 ± 0,01	214 ± 40	124 ± 12	26 ± 1	28 ± 1
DODAC	PNF 1:1	0,35 ± 0,03	156 ± 20	181 ± 3	45 ± 5	110 ± 50
DPPC	Blanco	0,37 ± 0,07	94 ± 5	197 ± 4	31 ± 9	42 ± 2
DPPC	FNOXA 2:1	0,34 ± 0,04	92 ± 1	111 ± 8	24,8 ± 8	45 ± 3
DPPC	Blanco	0,44 ± 0,03	141 ± 6	210 ± 21	29 ± 1	50 ± 10
DPPC	PNF 2:1	0,39 ± 0,08	153 ± 6	210 ± 16	29 ± 1	48 ± 2

Se añadió sensibilizador hasta proporciones de 2:1 en moles, donde se puede apreciar que para el sensibilizador FNOXA, en ambos lípidos no se presentan variaciones en el tamaño de la vesícula con respecto al blanco realizado. En el caso de la PNF se aprecia esta misma situación con DPPC, mientras que con DODAC empiezan a encontrarse diferencias en el tamaño a partir de una relación 1:1 de sensibilizador y lípido en moles, una proporción más elevada (2:1) se asocia a tamaños de 230 nm para distribuciones por intensidad y volumen y de 100 nm según la distribución por número. Lo anterior es un indicativo de que la molécula FNOXA y PNF no se ubican en el mismo lugar dentro de la vesícula.

5.4. Caracterización fotofísica del (fenilbenzoxazol-2-il) fenolanenona en medio homogéneo y microheterogéneo

5.4.1. Espectrofotometría de absorción UV-VIS

Se recogieron datos de absorbancia del compuesto en cuestión, en distintos solventes.

Se calculó el valor de la absorptividad molar del compuesto (ϵ_M) a la longitud de onda de máxima absorción, en algunos solventes: H₂O, Hexano, entre otros, valores reportados en la Tabla 6.

Tabla 6. Absortividad molar de FNOXA vealuada en los solventes indicados.

Solvente	λ_{\max} Absorción [nm]	$[\epsilon \text{ }^{-1} \text{ M}^{-1}]$
Agua	425	$11\,540 \pm 270$
MeOH	414	$14\,650 \pm 380$
EtOH	415	$14\,140 \pm 540$
Acetona	408	$15\,680 \pm 690$
Hexano	405	$15\,720 \pm 420$

El coeficiente de extinción molar se mantiene relativamente constante con la variación del solvente, a excepción del agua, donde vale añadir que su solubilidad permite trabajar sólo a concentraciones bajas (alrededor de 8×10^{-6} M) sin que se presenten desviaciones considerables a la ley de Lambert-Beer debido a interacciones intermoleculares.

Se tiene como referencia el trabajo de Phantangare y Lanke (2014), en el cual informan el valor de absortividad molar de este compuesto en MeOH con un valor de $15\,948,9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, lo cual se encuentra en acuerdo con este trabajo con una diferencia menor al 10%.

En general, descontando el agua como solvente, FNOXA presenta absortividades molares alrededor de $15\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, con un máximo de absorción que ronda los 415 nm y con una banda ancha de absorción del oxazol conjugado al núcleo de fenalenona (Phantangare & Lanke, 2014). FNOXA presenta un notorio corrimiento al rojo y un leve aumento de la absortividad molar en comparación con la perinaftenona, pues esta última presenta máximos de absorción alrededor de 360 y 380 nm con poca dependencia del solvente y absortividades molares alrededor de 10 000 unidades siendo de menor intensidad el segundo pico de absorción (Oliveros, Suardi-Murasecco, Aminian-Saghafi, & Braun, 1991). Evidentemente, el desplazamiento batocrómico observado es producido por la presencia en el núcleo de fenalenona de un grupo sustituyente benzoxazol.

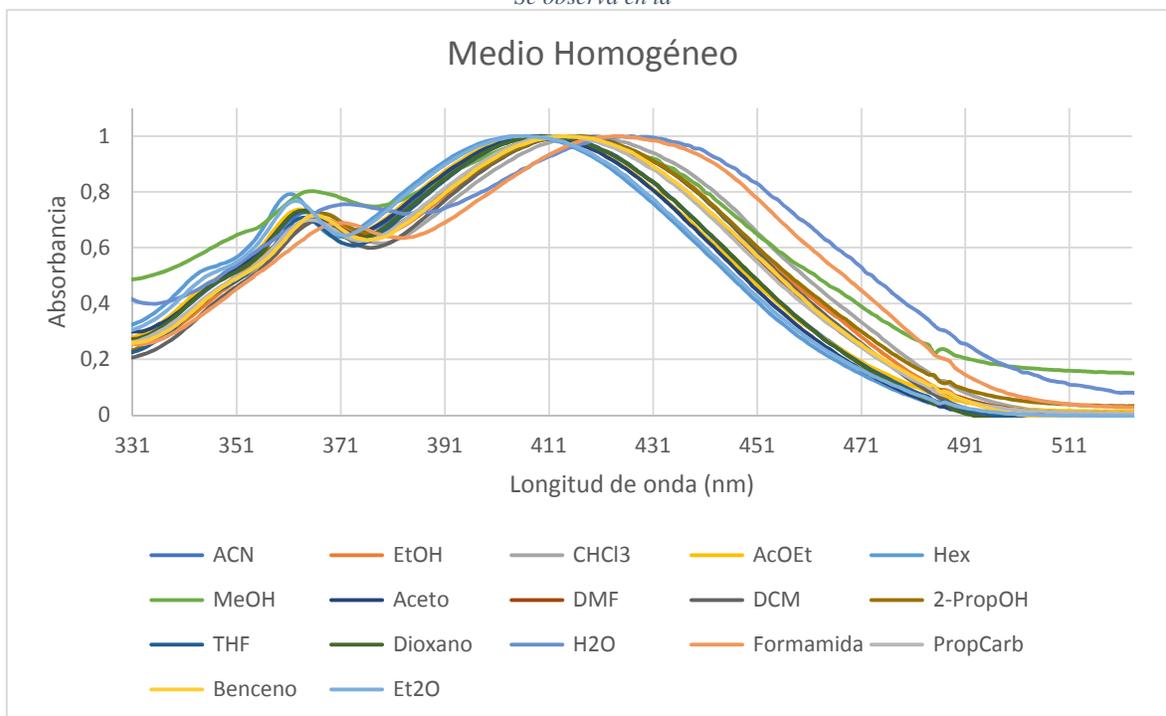


Figura 8 que existe un desplazamiento del máximo de absorción del sensibilizador FNOXA de hasta 20 nm dependiendo del solvente. Para describir este fenómeno, se estudió el efecto solvatocrómico del compuesto en al menos 17 solventes que poseen diferentes características, se analizó la dependencia del corrimiento en función de parámetros solvatocrómicos ρ , σ , τ , $(\rho + \sigma)$ y los parámetros de acidez $E_{T(30)}$ y basicidad DN, encontrándose una correlación significativa con los parámetros de acidez $E_{T(30)}$ y de polaridad $(\rho + \sigma)$. Este estudio se realizó mediante un ajuste multiparamétrico (ref. Figura 9, Tabla 7 y 8) entre el máximo de absorción (en nm) de la sonda en una variedad de solventes y los parámetros asociados a esos solventes recogidos de literatura (Kamlet, Abboud, & Taft, 1977) (Krygowski & Fawcett, 1975).

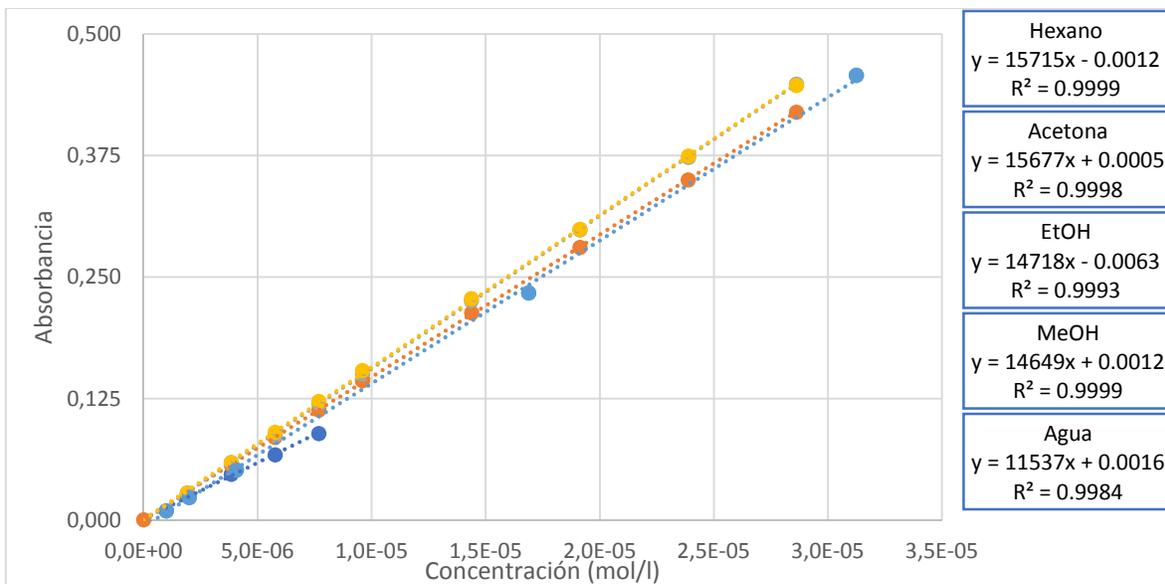


Figura 7. Linealidad de absorbancia FNOXA en función de la concentración.

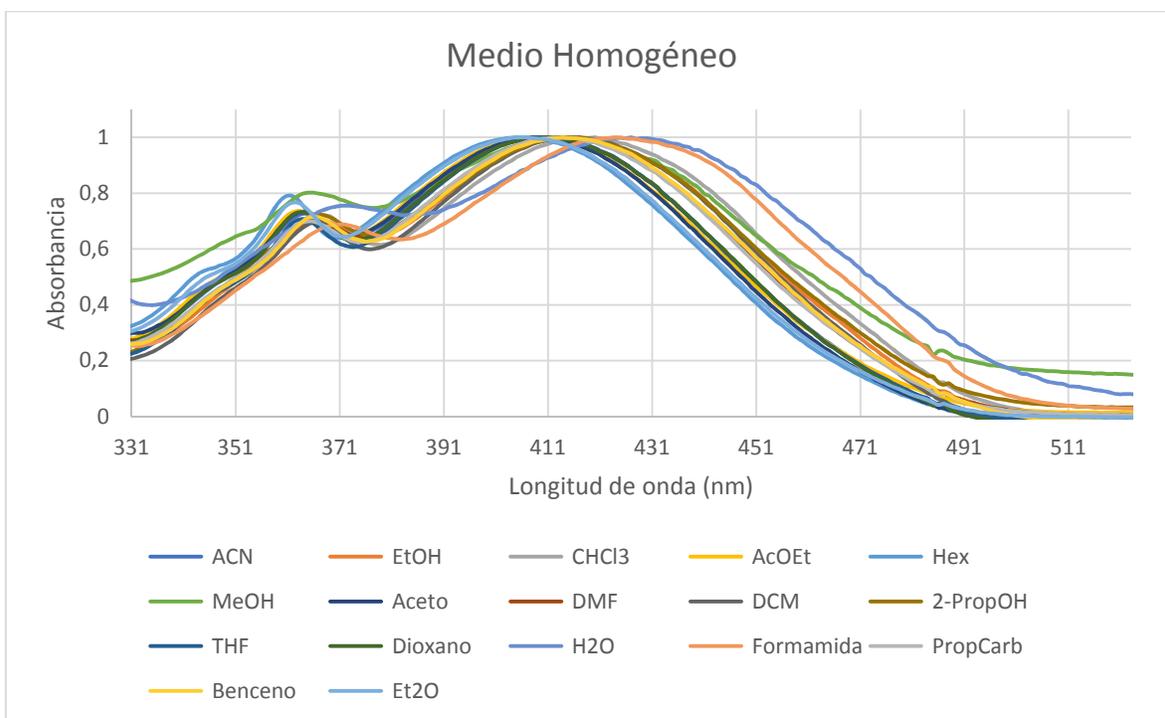


Figura 8. Espectro de absorción UV-Vis normalizado en medio homogéneo.

Tabla 7. $\nu_{\text{máx}} [\text{cm}^{-1}]$ observado y parámetros solvatocrómicos, extraídos de literatura, para diferentes solventes.

Solvente	$\nu_{\text{máx}} [\text{cm}^{-1}]$					(+)	Et ₃₀	DN
Hexano	24691,36	0	0	-0,04	0	-0,04	31	-
Et ₂ O	24630,54	0	0	0,27	0	0,27	34,6	20
Acetona	24509,80	0,08	0,43	0,71	0	0,71	42,2	17
AcOEt	24449,88	0	0,45	0,55	0	0,55	38,1	17,1
THF	24390,24	0	0,55	0,58	0	0,58	37,4	20
Dioxano	24330,90	0	0,37	0,55	0	0,55	36	-
ACN	24330,90	0,19	0,31	0,75	0	0,75	46	14,1
DMF	24213,08	0	0,69	0,88	0	0,88	43,8	26,6
MeOH	24154,59	0,98	0,66	0,6	0	0,6	55,4	25,7
Benceno	24154,59	0	0,1	0,59	1	1,59	34,3	0,4
EtOH	24096,39	0,86	0,75	0,54	0	0,54	51,9	31,5
i-propOH	24096,39	0,76	0,84	0,48	0	0,48	48,4	-
DCM	24096,39	0,13	0,1	0,82	0,5	1,32	40,7	-
PropCarb	24096,39	0	0,4	0,83	0	0,83	46,6	15,1
CHCl ₃	23809,52	0,2	0,1	0,58	0,5	1,08	39,1	-
Formamida	23584,91	0,71	0,48	0,97	0	0,97	56,6	24,7
H ₂ O	23529,41	1,17	0,18	1,09	0	1,09	63,1	33

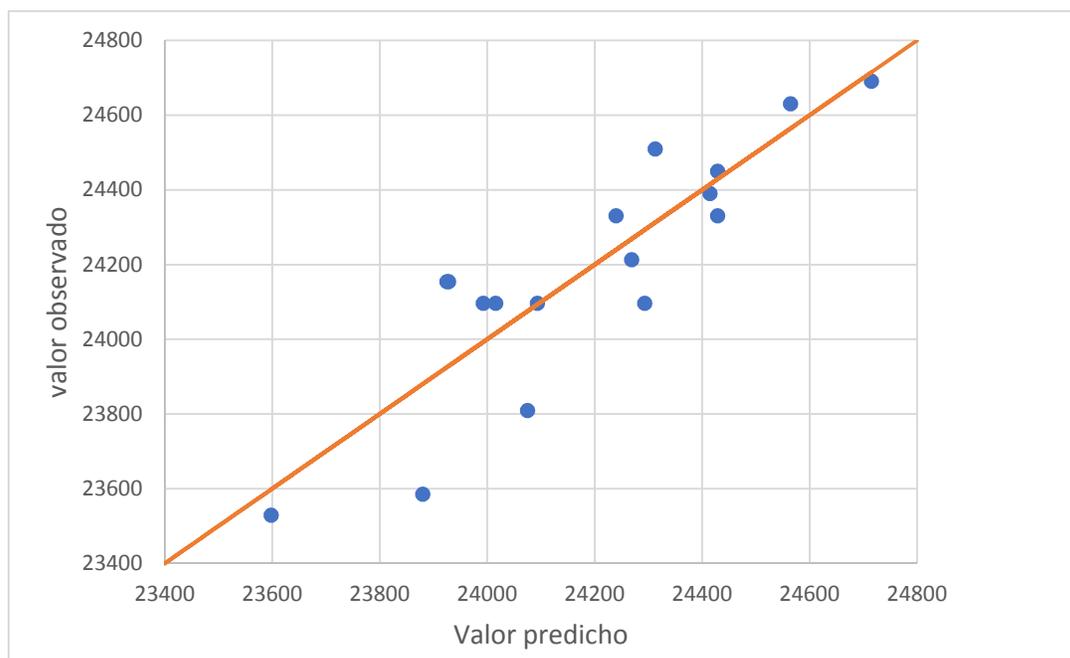


Figura 9. Correlación del ajuste con parámetros de acidez y de polaridad (+) en un gráfico de valor observado en función del valor predicho por el ajuste multiparamétrico.

Tabla 8. Sumario del ajuste multiparamétrico para describir la relación entre $\lambda_{\text{máx}} [\text{cm}^{-1}]$ y las variables y ($+$).

Parámetro	Estimado	Error estándar	Estadístico T	P-Value
Constante	24695	93.1978	264.974	0
α	-486.39	100.949	-4.8182	0.0003
$(\pi+\Delta)$	-484.637	107.011	-4.52886	0.0005
R-cuadrado = 76.8893 %		R-cuadrado (ajustado por g.l.) = 73.5878 %		
Modelo de ajuste: $\lambda_{\text{máx}} [\text{cm}^{-1}] = 24695 - 486.39 \lambda - 484.637 (\lambda +)$			Error estándar del estimado: 166,54	

El sensibilizador derivado de fenalenona es soluble en sistemas micelares de naturaleza iónica y neutra. Se recogieron datos de absorbancia del compuesto FNOXA surfactantes aniónicos, catiónicos y neutros, siendo SDS, CTAB y TX-100 respectivamente.

Tabla 9. Absortividad molar de FNOXA en los surfactantes SDS, CTAB y TX-100.

Surfactante	λ_{max} Absorción [nm]	ϵ [$\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$]
SDS	430	$26\,810 \pm 30$
CTAB	420	$16\,600 \pm 30$
TX-100	420	$14\,760 \pm 200$

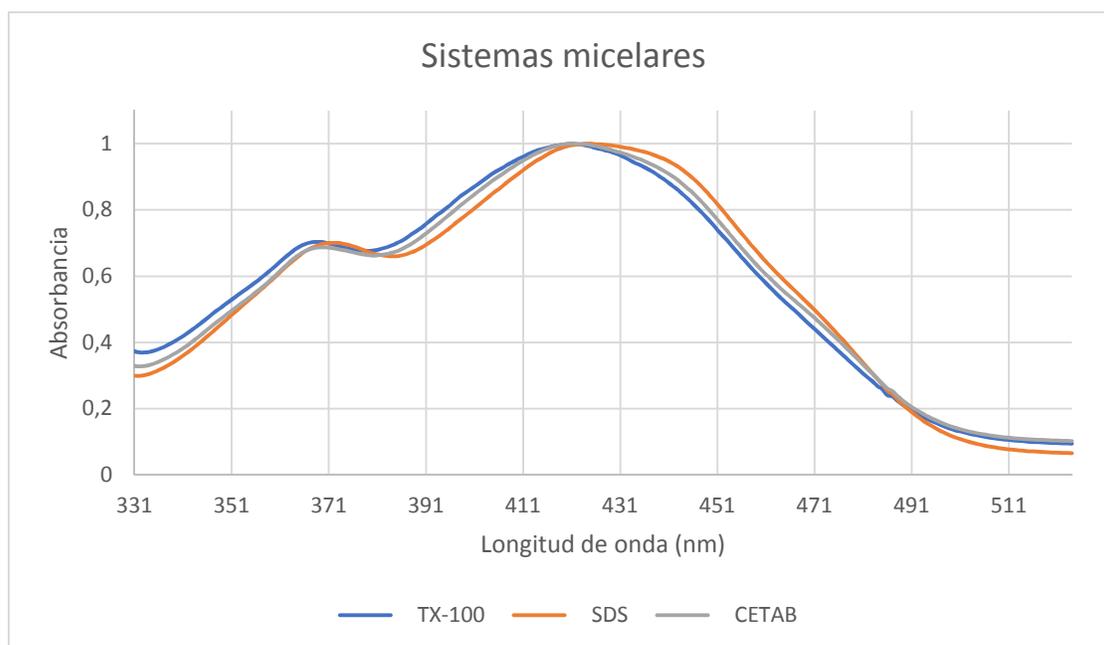


Figura 10. Espectro de absorción UV-Vis normalizado en sistemas micelares.

En la Tabla 9 se aprecia que en el surfactante aniónico la transición electrónica se hace más permitida, reflejado en un valor de absortividad molar más elevado, mientras que en los otros surfactantes se mantiene en valores un poco más elevados en comparación con los determinados en medio homogéneo.

Tanto el sensibilizador PNF como FNOXA se pueden solubilizar e incorporar en vesículas. Se registraron en la Tabla 10 datos de absorbancia del sensibilizador en vesículas constituidas por DPPC y DODAC. Para la incorporación adecuada del derivado de fenalenona a la vesícula liposomal, las muestras se mantuvieron sobre la temperatura de transición durante 10 min., a 40 °C para DPPC y 50 °C para DODAC (Kalepu, Kumar, Betha, & Varma, 2013) (Feitosa, Rosa, Castanheira, & Real, 2009).

Tabla 10. Absortividad molar de FNOXA en las vesículas evaluadas.

Lípido	max Absorción [nm]	[$c:^{-1} M^{-1}$]
DPPC	420	4560 ± 120
DODAC	425	9200 ± 420

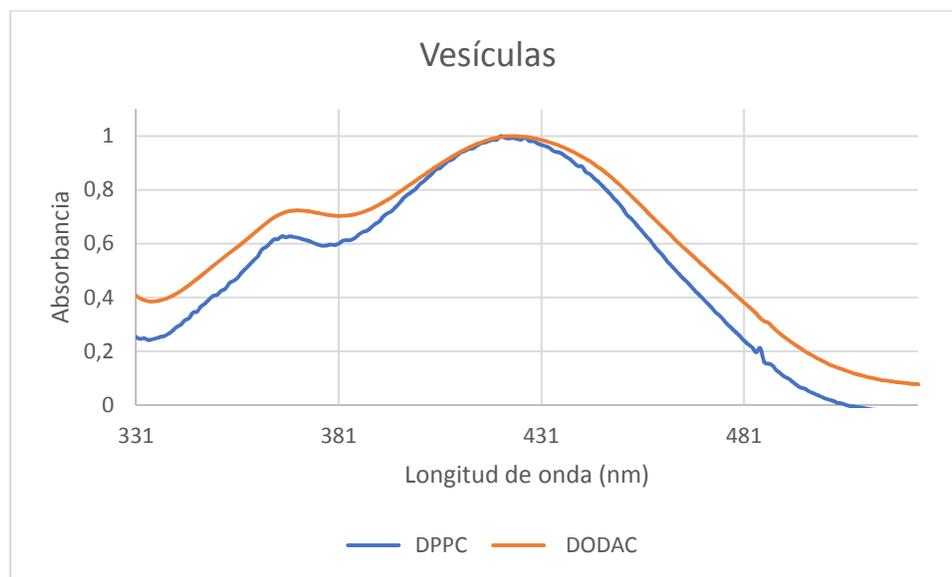


Figura 11. Espectro de absorción UV-Vis normalizado en vesículas.

Se encontró que la absortividad del compuesto FNOXA es notablemente mayor en DODAC en comparación a DPPC, la razón recae seguramente en la naturaleza catiónica del lípido DODAC, la cual hace más permitida la transición electrónica en comparación con el ambiente de vesículas de DPPC (zwitterión). Los valores de absortividad molar son menores que aquellos evaluados en medio homogéneo, sin embargo, es importante destacar que al igual que el uso de surfactantes, el medio microheterogéneo permite trabajar a concentraciones mayores que en agua como medio homogéneo. Por lo que se establece que tanto las vesículas como los surfactantes sirven como agentes que aumentan la solubilidad de FNOXA en agua.

Uno de los requisitos para que un fotosensibilizador sea adecuado para su empleo es que sea fotoestable, por lo que se realizó un estudio de esta característica. Se estudió la fotoestabilidad en dos solventes diferentes y un surfactante, evaluando la variación () de la absorbancia a dos horas de exposición con un led de 365 nm.

Tabla 11. Evaluación de la variación de la absorbancia de la muestra FNOXA, en relación con la PNF, al ser irradiada con un LED a 365 nm.

Solvente	$\frac{\Delta_F \times}{\Delta_P}$
MeoH (sin led)	1
MeOH	0,1356
Acetona	0,2066
Hexano	1,169
SDS (100 mM)	~0,002

Con el led apagado la absorbancia de la FNOXA y de la fenalenona se mantienen constantes en el tiempo. Con el LED encendido se aprecia que la fotoestabilidad de la FNOXA es mayor que la fenalenona, pues la variación de la absorbancia de la PNF es cerca de 7 veces mayor que el de la FNOXA. Este comportamiento es similar tanto en MeOH y acetona, mientras que en hexano ambos compuestos decaen de forma similar. Esto puede ser explicado mediante el mecanismo propuesto para la descomposición de la PNF (Oliveros, y otros, 1999), que corresponde a una fotorreducción mediante la extracción de un hidrógeno del solvente, pues este proceso se ha propuesto tanto en solventes próticos y polares apróticos (Oliveros, y otros, 1999).

Se propone que la molécula FNOXA es menos propensa a sufrir fotorreacciones con el solvente, del tipo fotorreducción, pues no se observa el mismo como comportamiento que la PNF en sistemas que promueven esta reacción, mientras que en solventes que no promueven la fotorreacción del compuesto mantienen un comportamiento similar. Los productos de la descomposición de FNOXA no se han determinado en la realización de este trabajo.

La disminución de la absorbancia de FNOXA en hexano con respecto del tiempo se puede ajustar mediante una reacción de primer orden con una constante de valor $2,8 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

En medio microheterogéneo la variación observada se encuentra dentro del margen de error experimental, evidenciando que en medio micelar la FNOXA no se degrada fotoquímicamente. Por lo anterior, se puede señalar que la 2-(benzo[d]oxazol-2-il)-1H-fenalen-1-ona es fotoestable.

5.4.2. Espectrofotometría de emisión

Se recogieron datos de emisión del derivado de fenalenona, observándose una banda ancha de emisión entre 500 y 560 nm, con un máximo de emisión alrededor de 540 en todos los solventes.

Considerando la situación experimental de baja emisión de fluorescencia de la FNOXA, se optó por evaluar el rendimiento de fluorescencia en sólo un punto, con valores de absorbancia iguales entre el actinómetro y la FNOXA en distintos medios a la longitud de onda de excitación. Considerando diferencias de absorbancia menores al 5% y registro del espectro de emisión de la muestra y la referencia durante el mismo día. Se utilizó como referencia sulfato de quinina en H₂SO₄ 0,1N con un Φ_F tabulado del 54,6%, excitando a 350 nm (Demas & Crosby, 1971).

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia obtenidos en medio homogéneo se encuentran en el orden del 5%, concordante con lo encontrado en la literatura, el Φ_F de FNOXA reportado varía entre 0,038 a 0,085 en solventes homogéneos (Phatangare & Lanke, 2014). El compuesto exhibe una leve emisión de fluorescencia, casi negligible, pero mayor que el presentado por la fenalenona sin sustituir, la cual posee rendimientos cuánticos de fluorescencia no detectables hasta 0,008, considerándose un compuesto no fluorescente (Oliveros, Suardi-Murasecco, Aminian-Saghafi, & Braun, 1991) (Oliveros, y otros, 1999). Se midieron los tiempos de vida de la emisión de mediante la técnica de recuento de fotones individuales correlacionados en el tiempo (TCSPC) en un equipo PicoQuant Fluotime 200, excitando a una longitud de onda de 405 nm, con una frecuencia de pulso del láser de 10 MHz.

En sistemas en equilibrio de oxígeno disuelto en el solvente, los tiempos de vida de fluorescencia son inapreciables, mientras que purgando el oxígeno disuelto con nitrógeno (N₂) se estimaron tiempos de vida del orden de 10 ns en los solventes metanol (Figura 12) y acetona (Figura 13). Evidenciando que el primer estado excitado de la molécula FNOXA puede ser desactivado por el oxígeno molecular en el estado basal. Además, se comprobó que una longitud de onda de excitación de 310 nm presenta resultados análogos.

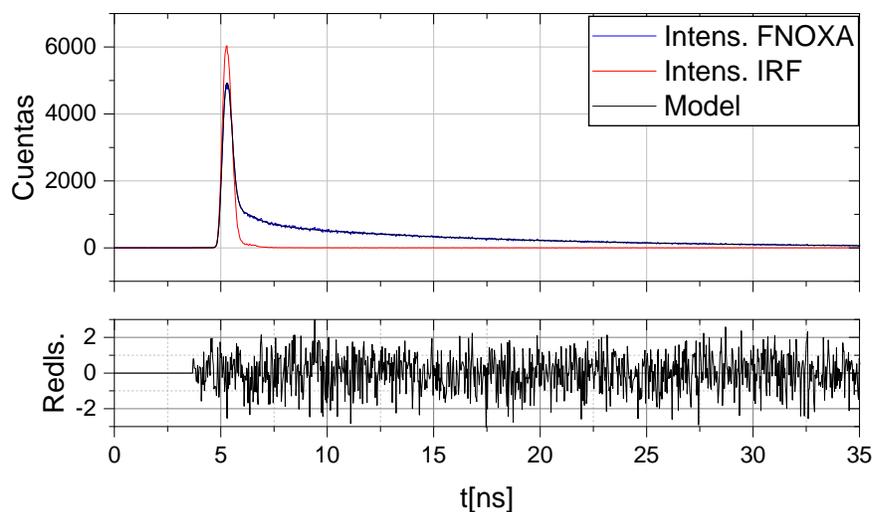


Figura 12. Ajuste del decaimiento de fosforescencia resuelta en el tiempo de FNOXA en acetona purgada con N_2 , excitando a una longitud de onda de 410 nm, midiendo a una longitud de onda de emisión 550 nm. El tiempo de vida de fosforescencia estimado es de 12,19 ns.

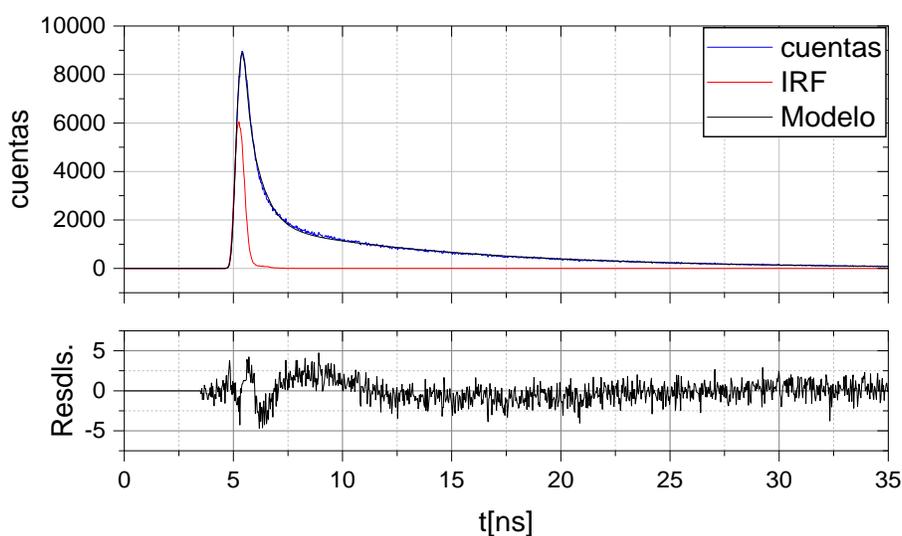


Figura 13. Ajuste del decaimiento de fosforescencia resuelta en el tiempo de FNOXA en metanol purgado con N_2 , excitando a una longitud de onda de 410 nm, midiendo a una longitud de onda de emisión 550 nm. El tiempo de vida de fosforescencia estimado es de 9,6 ns.

Considerando los bajos tiempos de vida de fluorescencia registrados y el bajo rendimiento cuántico de fluorescencia de FNOXA, se espera que el cruce intersistema desde el estado singlete excitado hacia el estado triplete excitado ocurra con un rendimiento cuántico ϕ_{ISC} cercano a la unidad, de manera similar a lo reportado para la PNF, pues los procesos de desactivación térmica (conversión interna) pueden despreciarse en cetonas aromáticas rígidas (Turro, 1991).

En sistemas micelares y en vesículas la emisión de fluorescencia presenta rendimientos cuánticos entre 0,1 - 0,3%. La disminución de los rendimientos cuánticos de fluorescencia

en sistemas microheterogéneos frente a sistemas homogéneos puede deberse a que el sistema microheterogéneo favorece la transición desde el primer estado singlete excitado del sensibilizador al estado triplete excitado. En este caso se observaría un aumento del rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete en comparación con el medio homogéneo.

5.4.3. Espectroscopía NIR resuelta en el tiempo

Se evaluaron los rendimientos cuánticos del sensibilizador 2-(benzo[d]oxazol-2-il)-1H-fenalen-1-ona en medio homogéneo y microheterogéneo, utilizando como actinómetro fenalenona (o perinaftenona, PNF). Además, se realizó la validación del comportamiento de la PNF con otro estándar, donde se utilizó SAPYR como actinómetro. La PNF al igual que el SAPYR tienen reportados como rendimientos cuánticos de cercanos a la unidad en una variedad de solventes (Schmidt, Tanielian, Dunsbach, & Wolff, 1994) (Cieplik, y otros, 2013).

Todas las mediciones se realizaron con la técnica de recuento de fotones individuales correlacionados en el tiempo (TCSPC) en un equipo PicoQuant Fluotime 200, excitando a una longitud de onda de 355 nm. La evolución temporal del oxígeno molecular singlete fue adquirida con un fotomultiplicador NIR.

Los rendimientos cuánticos de oxígeno molecular singlete () se evaluaron comparando la intensidad de la señal a 1270 nm extrapolada a tiempo cero (A_0) entre soluciones de sensibilizador (FNOXA) y actinómetro de absorbancia similar, en un método comparativo de pendientes.

Todos los resultados informados están referidos al valor de la perinaftenona, medido en las mismas condiciones experimentales, a menos que indique lo contrario.

Tabla 12. Rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete de PNF utilizando SAPYR como actinómetro.

Muestra: PNF		Medio: Homogéneo
Solvente	Actinómetro	
ACN	SAPYR	$1,057 \pm 0,001$

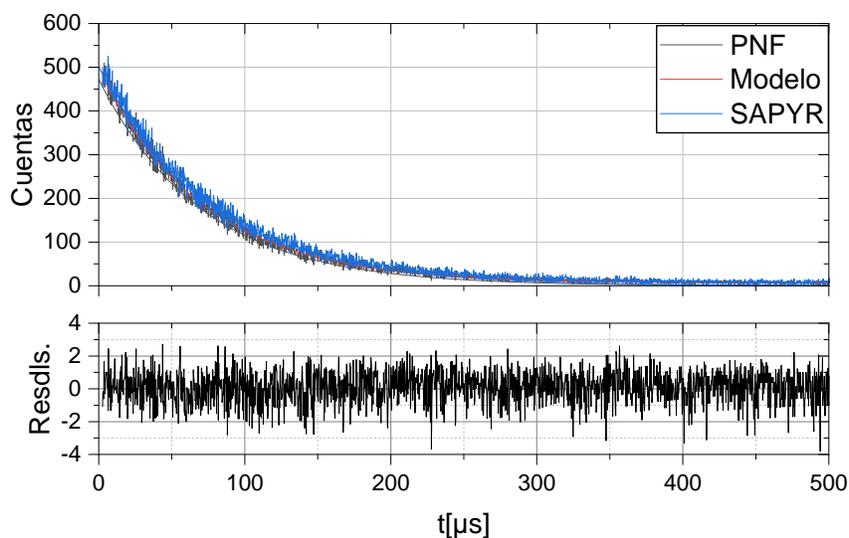


Figura 14. Decaimiento de fluorescencia resuelta en el tiempo de oxígeno molecular singlete de estándares PNF y SAPYR, ambos con absorbancia igual a 0,10 en ACN como solvente.

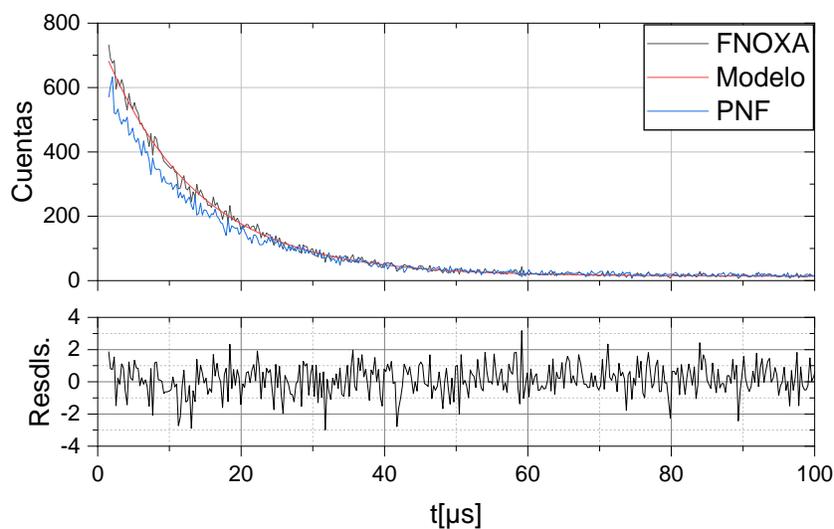


Figura 15. Decaimiento de fosforescencia resuelta en el tiempo de oxígeno molecular singlete de sensibilizador FNOXA y PNF como actinómetro, ambos con absorbancia igual a 0,12 en etanol como solvente.

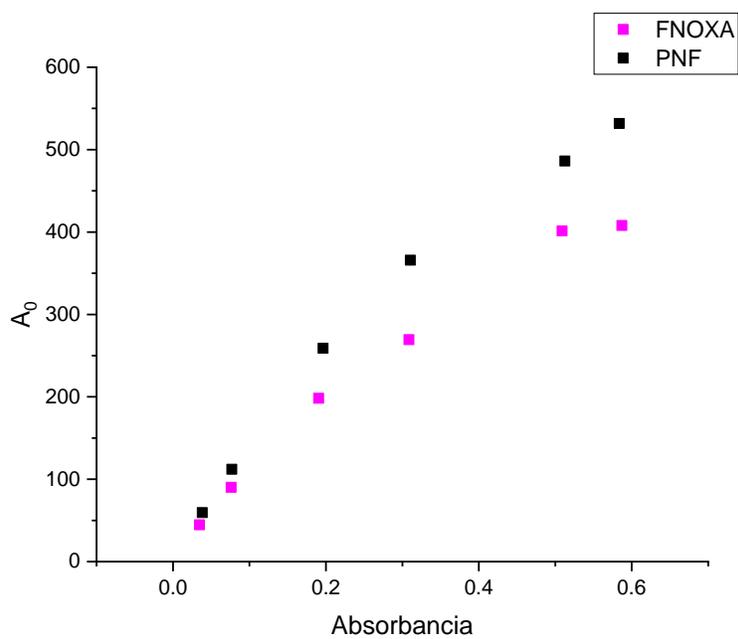
En medio homogéneo, en los solventes estudiados, se obtuvo el mismo rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete siendo igual a 1 en comparación con la fenalenona, sin encontrarse variaciones referentes a la polaridad o que sea un solvente prótico o aromático. Se considera un excelente resultado, pues la fenalenona presenta rendimientos cuánticos de generación de oxígeno molecular singlete iguales a 1 en una variedad de solventes, debido a lo mismo es considerado un compuesto de referencia universal en la determinación de

mediante actinometría (Schmidt, Tanielian, Dunsbach, & Wolff, 1994). Esto ya pone de manifiesto la versatilidad del sensibilizador FNOXA para ser usado en alguna de las áreas de la ciencia antes mencionadas, pues puede ser solubilizado en una variedad de solventes, presenta un corrimiento al rojo que le permite absorber luz visible (entre los colores violeta e índigo) y genera oxígeno molecular singulete con elevados rendimientos cuánticos.

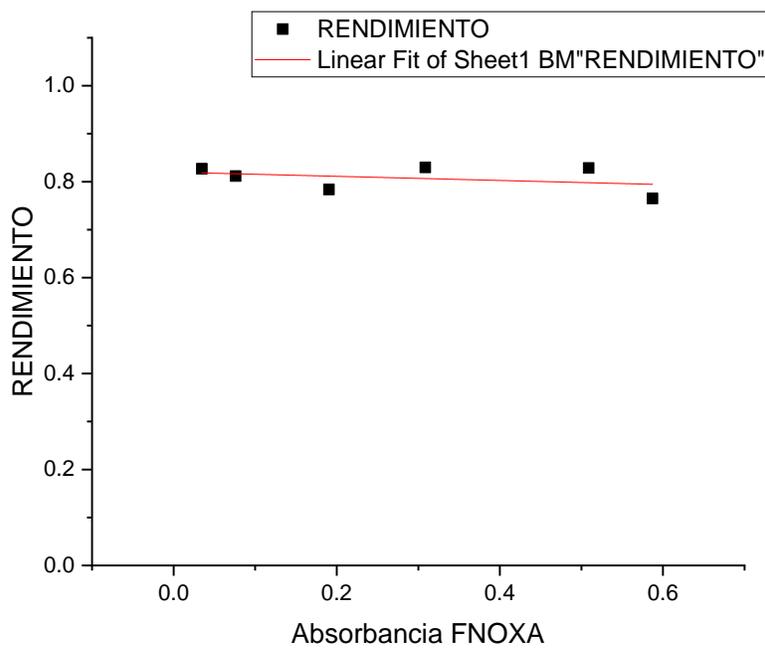
Tabla 13. Rendimientos cuánticos de generación de oxígeno singulete de FNOXA evaluados utilizando PNF como actinómetro en a) medio homogéneo, b) en medio microheterogéneo: micelas y c) vesículas.

Muestra: FNOXA		Actinómetro: PNF	Medio: Homogéneo ^(a)
Solvente		(μ s)	
EtOH		12,8	$1,05 \pm 0,06$
ACN		72,3	$0,94 \pm 0,05$
n-Hexano		26,8	$1,06 \pm 0,06$
Benceno		28,3	$1,04 \pm 0,05$
Muestra: FNOXA		Actinómetro: PNF	Medio: Microheterogéneo, micelas ^(b)
Surfactante		(μ s)	
CETAB (5 mM)		64,4	$0,75 \pm 0,02$
CETAB (10 mM)		63,5	$0,79 \pm 0,03$
TX-100 (8 mM)		51,5	$0,9 \pm 0,2$
SDS (50 mM)		55,8	$0,70 \pm 0,03$
SDS (100 mM)		53,3	$0,68 \pm 0,01$
Muestra: FNOXA		Actinómetro: PNF	Medio: Microheterogéneo, vesículas ^(c)
Lípido		(μ s)	
DODAC (0,5 mM)		60,2	$0,33 \pm 0,06$
DODAC (1mM)		60,2	$0,42 \pm 0,02$
DODAC (2M)		53,84	$0,55 \pm 0,09$
DPPC (0,5 mM)		66,7	$0,395 \pm 0,007$
DPPC (2 mM)		56,0	$0,579 \pm 0,002$

Además, se estudió la dependencia del rendimiento cuántico de FNOXA con respecto a la absorbancia en ACN, referenciado a la PNF. A absorbancias mayores la generación de oxígeno singulete por parte del actinómetro no tiene respuesta lineal y el comportamiento del sensibilizador FNOXA es análogo al de la PNF, evidenciado fenómenos de autodesactivación en la muestra y en la referencia a absorbancias relativamente elevadas. Para el conjunto de datos estudiados se obtuvo un valor constante para el rendimiento cuántico de generación de oxígeno singulete (referido a la PNF) con un valor de $0,81 \pm 0,01$.



a)



b)

Figura 16. a) Comparación de la intensidad de fosforescencia de oxígeno molecular singulete extrapolada a tiempo cero (A_0) en función de la absorbancia de FNOXA y PNF a 355 nm en ACN. b) Rendimiento cuántico de generación de oxígeno molecular singulete, referenciado a PNF en función de la absorbancia de FNOXA a 355 nm en ACN..

En el caso de los rendimientos cuánticos de generación de oxígeno molecular singulete evaluados en sistemas micelares se encontró que, en el caso de un surfactante neutro, se mantiene el mismo comportamiento respecto a la PNF. En surfactantes iónicos FNOXA disminuye su capacidad de generar oxígeno a alrededor de un 70% de la capacidad de la PNF. Esto se puede deber que la presencia de iones en el microentorno de la FNOXA favorece la desactivación del estado triplete por otras vías antes de que ocurra la desactivación por oxígeno y consecuente formación del oxígeno molecular excitado. Es apropiado mencionar que no se tiene un valor de Φ en agua con el cual comparar debido a la pobre solubilidad de FNOXA en agua. Además, se realizó la comparación con surfactante SDS en agua miliQ obteniéndose el mismo valor de rendimiento cuántico de generación de oxígeno singulete ($\Phi = 0,65 \pm 0,01$) que en agua deuterada. Evidentemente, utilizar agua o agua deuterada no afecta la capacidad de generación de $O_2(^1g)$.

En el caso de los Φ evaluados en vesículas el rendimiento Φ en DODAC es levemente menor que en DPPC, lo que podría indicar (al igual que en el caso de uso de surfactantes) que efectivamente la presencia de iones afecta el rendimiento cuántico de generación de 1O_2 . Interesantemente, se observó que al disminuir la concentración de vesículas en la suspensión mientras se mantiene el mismo valor de absorbancia, es decir, vesículas con más carga, disminuye el rendimiento cuántico de generación de $O_2(^1g)$ en ambos lípidos estudiados. De manera similar, experimentalmente se observó que al aumentar la absorbancia (o concentración) del sensibilizador FNOXA, manteniendo una misma concentración de vesículas, Φ también disminuye, aunque con una dependencia menor. Lo anterior puede indicar que cuando el sensibilizador se encuentra encapsulado en una elevada concentración local presenta agotamiento de oxígeno o fenómenos de autodesactivación. Recordando que los Φ están referidos a la PNF, medido en las mismas condiciones, es poco probable que el agotamiento de oxígeno sea la respuesta, pues también se agotaría en este caso compensando el resultado. El fenómeno de autodesactivación se observó a concentraciones relativamente elevadas en medio homogéneo (Figura 16) sin observarse desviaciones a la ley de Lambert-Beer a la concentración utilizada ni se registró evidencia de la formación de excímeros por fluorescencia, por lo que debe corresponder a un mecanismo no radiativo.

En orden de evaluar correctamente el rendimiento cuántico de generación de oxígeno molecular singulete por parte de las nanopartículas de sílice mesoporosas con FNOXA fisiosorbida, se comparó con FNOXA y PNF en solvente homogéneo y en matriz de

nanopartículas blanco (sin sorción de sustrato sobre su superficie). Todas las medidas se realizaron utilizando etanol como solvente (dispersante). Las nanopartículas blanco fueron utilizadas desde el mismo batch que aquellas con sensibilizador adsorbido, y se utilizó más de un batch en orden de mantener la reproducibilidad de resultados. La preparación de actinómetro con matriz de nanopartículas se preparó resuspendiendo las nanopartículas blanco en etanol, añadiendo un volumen de actinómetro desde una solución de actinómetro en EtOH, agitando y realizando las mediciones sin dejar que el sistema alcance el equilibrio. Como control en este experimento, se tiene que la FNOXA presenta un η igual a 1 (uno) referido a la PNF en solvente homogéneo, resultado ya obtenido y discutido.

Tabla 14. Rendimiento cuántico de generación de oxígeno de FNOXA adsorbido en nanopartículas de sílice.

Estudio de τ en nanosistema de sílice			
Sistema	(μ s)	Actinómetro	
$\text{OH}_{\text{M AD}} (0,8 \text{ m} / \text{m})$	14,1	PNF (EtOH)	$0,87 \pm 0,22$
		PNF (matriz NP OH_{M})	$0,85 \pm 0,2$
		FNOXA (EtOH)	$0,9 \pm 0,1$
		FNOXA (matriz NP OH_{M})	$0,86 \pm 0,13$
FNOXA (EtOH)	-	PNF (EtOH)	$1,01 \pm 0,02$

Las nanopartículas blanco presentan dispersión de luz a la longitud de onda de detección, que no corresponde a generación de oxígeno, pudiendo ajustarse a un decaimiento monoexponencial con un “tiempo de vida” de 8 μ s. Es importante mencionar que la contribución de este decaimiento es mínima y no afecta en el ajuste monoexponencial cuando se utilizan nanopartículas con sensibilizador adsorbido, o al ser utilizadas como matriz. Relacionado con lo anterior se tiene que los rendimientos cuánticos de generación de $^1\text{O}_2$ utilizando solvente homogéneo y utilizando matriz de nanopartículas son similares, evidenciado la leve interferencia de matriz a la concentración utilizada en estos experimentos. Los rendimientos cuánticos evaluados al utilizar FNOXA y PNF como actinómetros son cercanos a la unidad o levemente menores, se tiene también una mayor dispersión de datos, reflejado en el error estándar. Esto sucede debido a las dificultades de medir la absorbancia de la muestra con nanopartículas debido a la inherente dispersión producida. Además, se cuenta con una sola relación sensibilizador/nanopartícula y es baja ($\%L = 0,05$). Para conseguir una concentración de sensibilizador que entregue una señal detectable y medible tanto por UV-vis como en el detector infrarrojo se debe aumentar la cantidad de

nanopartículas por mililitro de suspensión, con un consecuente aumento de línea base en el espectro de absorción debido a la dispersión de luz. Se analizó solamente a una concentración de nanopartículas (8 mg N / mL E), pues a menores concentraciones no se logra una señal de absorbancia clara y a mayores concentraciones la línea base supera el rango de linealidad de instrumento UV-Vis. Vale recordar la importancia de poder obtener un valor de absorbancia adecuado: el método comparativo, como ya se ha explicado, tiene su fundamento en que dos soluciones (o suspensiones en este caso) que posean la misma absorbancia, irradiadas en las mismas condiciones a la misma longitud de onda, absorberán la misma cantidad de fotones; luego, la señal del decaimiento de oxígeno molecular singulete extrapolado a tiempo cero es comparable. Consecuentemente el error producido al medir la absorbancia es arrastrado al evaluar el rendimiento cuántico. Para subsanar esta dificultad, lo ideal es tener una mayor carga de sustrato por nanopartícula, lo cual puede lograrse mediante la utilización de nanopartículas con cadenas hidrocarbonadas que permitan interacciones hidrofóbicas con el sustrato y lograr una adsorción física de mayor magnitud; otra opción es utilizar una unión química en vez de física, claramente deben introducirse los cambios adecuados en el sensibilizador para este fin y formar un enlace covalente entre el sustrato y la nanopartícula.

6. Conclusiones

En este trabajo se estudiaron las propiedades fotofísicas de la molécula 2-(benzo[d]oxazol-2-il)-1H-fenalen-1-ona, abreviado aquí como FNOXA. Este compuesto corresponde a una cetona aromática derivada de perinaftenona, donde el núcleo de perinaftenona se encuentra unido a un grupo benzoxazol. Este sensibilizador, tal como se ha planteado en la hipótesis, exhibe y mantiene propiedades fotofísicas de interés similares a su precursor; los resultados avalan su uso como fotosensibilizador en diversos solventes y el empleo de surfactantes o vesículas para su solubilización en agua, mientras que el soporte de este compuesto sobre nanopartículas de sílice necesita estudios adicionales.

Los resultados obtenidos en esta memoria muestran que la sustitución con el grupo benzoxazol en la posición 2 del núcleo de la fenalenona efectivamente provoca un corrimiento batocrómico, pues presenta una absorptividad molar alrededor de $15\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ con una longitud de máximo de absorción alrededor de 415 nm, levemente dependiente del solvente. Correspondiendo esto a una absorptividad molar ligeramente mayor que su precursor

y un corrimiento al rojo de 50 nm. FNOXA exhibe bajos rendimientos cuánticos de fluorescencia con emisión de una banda amplia en torno a 550 nm.

El estudio de fotoestabilidad de FNOXA muestra que es más estable que la perinaftena en solventes polares próticos y apróticos, sugiriendo que el mecanismo de fotorreducción por abstracción de un hidrógeno del solvente se encuentra menos favorecido. De igual manera, se necesita un estudio más profundo incluyendo una variedad de solventes y un análisis de los productos de la fotodescomposición para obtener resultados concluyentes.

Por un lado, el estudio sobre la capacidad de FNOXA para generar $O_2(^1\ g)$ en medio homogéneo muestra que esta molécula presenta el mismo rendimiento cuántico de generación de oxígeno singulete que el actinómetro de referencia fenalenona, su precursor, en una variedad de solventes: polar prótico, polar aprótico, apolar y aromático. Dicho de otro modo, la sustitución en el núcleo de la fenalenona no afecta su capacidad para generar $O_2(^1\ g)$ en medio homogéneo. Además, el comportamiento en función de la absorbancia es análogo al de la perinaftena.

Por otro lado, en sistemas microheterogéneos el comportamiento de FNOXA depende del microentorno donde se encuentra variando su Φ con respecto a la perinaftena. En sistemas micelares neutros se presenta una leve disminución del rendimiento cuántico de generación de $O_2(^1\ g)$ ($\Phi = 0,9$), mientras que surfactantes iónicos disminuye a un 70% en relación a la perinaftena evaluada en las mismas condiciones. En vesículas se encontró que depende de la cantidad de sensibilizador que se encuentre en su interior, presumiblemente debido a fenómenos de autodesactivación. El Φ evaluado para estos sistemas en DODAC y DPPC se encuentran en torno a $0,46 \pm 0,12$, con respecto a la perinaftena en las mismas condiciones.

El sensibilizador FNOXA, contrario a lo esperado, se adsorbió en baja cantidad sobre las nanopartículas de sílice (-OH) como las amino funcionalizadas (-NH₂). En estudios adicionales sobre esta base, el enfoque de utilizar enlaces de hidrógeno para lograr la adsorción de sensibilizador puede ser redirigido a interacciones de carácter hidrofóbico con la adición de cadenas hidrocarbonadas en la superficie de las NPs o en la formación de enlaces covalentes para la unión considerando que se debe introducir, por ejemplo, un ácido carboxílico en el sensibilizador. Considerando la baja capacidad de carga del compuesto, igualmente se logró evaluar Φ . Luego, los rendimientos cuánticos de generación de $O_2(^1\ g)$ se encuentran asociados a un mayor rango de error, inherente a la dispersión de luz producida por la suspensión de nanopartículas. Interesantemente los Φ registrados son elevados, entre

0,75 y 1. Además, al evaluar el actinómetro de referencia en solvente homogéneo y en una matriz de nanopartículas blanco se obtienen resultados similares, sin evidencias de interferencia por matriz a la concentración de nanopartículas utilizada.

7. Bibliografía

- Abrahamse, H., Kruger, C. A., Kadanyo, S., Mishra, A., (2017). Nanoparticles for Advanced Photodynamic Therapy of Cancer. *Photomed. Laser Surg.* 35, 581-588. doi: 10.1089/pho.2017.4308.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Woo, S., Zarghami, M., & Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoescale Res. Lett.*, 8(1), 102-111. doi:10.1186/1556-276X-8-102
- Allen, T. (1998). Liposomal drug formulations. Rationale for development and what we can expect for the future. *Drugs*, 56(5), 747-56. doi:10.2165/00003495-199856050-00001. PMID: 9829150.
- Arnold, J. S., Browne, R. J., & Ogryzlo, E. A. (1965). THE RED EMISSION BANDS OF MOLECULAR OXYGEN. *photochem photobiol*, 4(6), 963-969. doi:10.1111/j.1751-1097.1965.tb09287.x
- Arroyo, A. (2019). *Fotosensibilización de oxígeno singlete: aplicaciones al estudio de la fotooxidación de tiocetonas y fotoerradicación de H. pylori*. Universidad Complutense de Madrid, Química Orgánica I. Madrid: Ed. electrónica.
- B. Asim, P. N. (2013). Soft templating strategies for the synthesis of mesoporous materials: Inorganic, organic–inorganic hybrid and purely organic solids. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 189(190), 21-41. doi:10.1016/j.cis.2012.12.002
- Bhaskara, B., Mukherji, R., Shitre, G., Alam, F., Prabhune, A., & Kale, S. (2014). Controlled release of antimicrobial Cephalexin drug from silica microparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 1(34), 9-14. doi:10.1016/j.msec.2013.10.002
- Bland, J. (1976). Biochemical effects of excited state molecular oxygen. *Journal of Chemical Education*, 53(5), 274. doi:10.1021/ed053p274
- Carmona, A., & Chaimovic, H. (1983). Preparation and characterization of large dioctadecyldimethylammonium chloride liposomes and comparison with small sonicated vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 733(1), 172-179. doi:10.1016/0005-2736(83)90103-7
- Chandran, P., & Thomas, R. (2015). Gold Nanoparticles in Cancer Drug Delivery. *Nanotechnology Applications for Tissue Engineering*, 221–237.
- Chen, Y.-P., Chen, C.-T., Hung, Y., Chou, C.-M., Liu, T.-P., Liang, M.-R., . . . Mou, C.-Y. (2013). A New Strategy for Intracellular Delivery of Enzyme Using Mesoporous Silica Nanoparticles: Superoxide Dismutase. *J Am Soc*, 135(4), 1516-23.

- Cieplik, F., Späth, A., Regensburger, J., Gollmer, A., Tabenski, L., Hiller, K.-A., . . . Schmalz, G. (2013). Photodynamic biofilm inactivation by SAPYR—An exclusive singlet oxygen photosensitizer. *Free Radic. Biol. Med.*, *65*, 477-487. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.031
- D. Nikunj, J. T. (2017). A Concise Review on Surfactants and Its Significance. *Int. J. Appl. Chem.*, *13*(3), 663-72.
- Darmanyan, A., & Foote, C. (1993). Solvent effects on singlet oxygen yield from n, π .* and π , π .* triplet carbonyl compounds. *J. Phys. Chem.*, *91*(19), 5032–5035.
- Demas, J. N., & Crosby, G. A. (1971). Measurement of photoluminescence quantum yields. Review. *J. Phys. Chem.*, *75*(8), 991-1024. doi:10.1021/j100678a001
- Dickerson, R. E., Gray, H. B., Darensbourg, M. Y., & Darensbourg, D. J. (1992). *Principios de Química* (3ra ed.). Ed. Reverté.
- Doane, T., & Burda, C. (2013). Nanoparticle mediated non-covalent drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *65*(5), 607-21.
- Dreamer, D., & Bangham, A. (1976). Large Volume Liposomes by an Ether Vaporization. *Biochim Biophys Acta*, *443*(3), 629-634.
- E. Corey, W. T. (1964). A Study of the Peroxidation of Organic Compounds by Externally Generated Singlet Oxygen Molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, *86*(18), 3881-2. doi:10.1021/ja01072a062
- Epe, B. (1991). Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem.-Biol. Interactions*, *80*(3), 239-260. doi:10.1016/0009-2797(91)90086-m
- Epe, B. (1991). Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem.-Biol. Interactions*, *80*(3), 239-260. doi:10.1016/0009-2797(91)90086-m
- Feitosa, E., Rosa, F., Castanheira, E., & Real, M. E. (2009). DODAB and DODAC bilayer-like aggregates in the micromolar surfactant concentration domain. *Colloid Polym. Sci.*, *287*(5), 591-599. doi:10.1007/s00396-009-2008-1
- Frederice, R., Ferreira, A., & Gehlen, M. (2010). Molecular Fluorescence in Silica Particles Doped with Quercetin-Al³⁺ Complexes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *21*(7), 1213-17.
- Fresnadillo, D. (2010). GENERACIÓN FOTOSENSIBILIZADA DE OXÍGENO SINGLETE. *TECNIA*, *20*(1), 5-11.
- Fresnadillo, D. G. (2010). GENERACIÓN FOTOSENSIBILIZADA DE OXÍGENO SINGLETE. *TECNIA*, *20*(1), 5-11.
- Giraldo, L., & Peñuela, G. (2007). Tratamiento de las aguas residuales de una industria textil utilizando colector solar. *Revista Lasallista de Investigación*, *4*(2), 24-31.
- Grabowski, S. J. (2003). Hydrogen bonding strength—measures based on geometric and topological parameters. *Journal of Physical Organic Chemistry*. *17*(1), 18-31. doi:10.1002/poc.685
- Greer, A. (2006). Christopher Foote's Discovery of the Role of Singlet Oxygen [1O₂(¹Δ_{g)] in Photosensitized Oxidation Reactions. *Accounts of Chemical Research*, *39*(11), 797-804. doi:10.1021/ar050191g}

- H. Wasserman, J. S. (1972). Singlet oxygen reactions with 9,10-diphenylanthracene peroxide. *J. Am. Chem. Soc.*, *94*(14), 4991-6. doi:10.1021/ja00769a034
- Hamblin, M., Chiang, L., Lakshmanan, S., Huang, Y.-Y., Garcia-Diaz, M., Karimi, M., . . . Chandran, R. (2015). Nanotechnology for photodynamic therapy: A perspective from the Laboratory of Dr. Michael R. Hamblin in the Wellman Center for Photomedicine at Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School. *Nanotechnology Reviews*, *4*(4), 359–372. doi:10.1515/ntrev-2015-0027
- Hu, X., Huang, Y., Wang, Y., Wang, X., & Hamblin, M. (2018). Antimicrobial Photodynamic Therapy to Control Clinically Relevant Biofilm Infections. *Frontiers in Microbiology*, *9*(1299). doi:10.3389/fmicb.2018.01299
- Huang, D., & Hamblin, M. (2010). Antimicrobial photodynamic inactivation and photodynamic therapy for infections. *Methods Mol Biol*, 155-173. doi:10.1007/978-1-60761-697-9_12
- Hurst, J. R., & Schuster, G. B. (n.d.). Nonradiative relaxation of singlet oxygen in solution. *J. Am. Chem. Soc.*, *105*(18), 5756–60. doi:10.1021/ja00356a009
- I. Matheson, J. L. (1972). Quenching of photophysically formed singlet (1.DELTA.4g) oxygen in solution by amines. *J. Am. Chem. Soc.*, *94*(10), 3310-13. doi:10.1021/ja00765a006
- J. Pitts, A. K. (1968). Singlet oxygen in the environmental sciences. Singlet molecular oxygen and photochemical air pollution. *Environ. Sci. Technol.*, *3*(3), 241-7. doi:10.1021/es60026a004.
- Kalepu, S., Kumar, S., Betha, S., & Varma, M. (2013). Liposomal drug delivery system - A Comprehensive Review. *Int. j. drug dev.*, *5*(4), 62-75.
- Kamlet, M. J., Abboud, J. L., & Taft, R. W. (1977). The solvatochromic comparison method. 6. The .pi.* scale of solvent polarities. *J. Am. Chem. Soc.*, *99*(18), 6027-38. doi:10.1021/ja00460a031
- Kollef, M., & Fraser, V. (2001). Antibiotic Resistance in the Intensive Care Unit. *Ann Intern Med.*, *134*(4), 298-314. doi:10.7326/0003-4819-134-4-200102200-00014
- Krygowski, T. M., & Fawcett, W. R. (1975). Complementary Lewis Acid-Base Description of Solvent Effects. I. Ion-Ion and Ion-Dipole Interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, *97*(8), 2143–2148. doi:10.1021/ja00841a026
- Kumar, R., Roy, I., Ohulchanskyy, T., Goswami, L., Bonoiu, A., Bergey, E., . . . Prasad, P. (2008). Covalently Dye-Linked, Surface-Controlled, and Bioconjugated Organically Modified Silica Nanoparticles as Targeted Probes for Optical Imaging. *ACS Nano*, *2*(3), 449-56.
- Kupetz, E., & Bunjes, H. (2014). Lipid nanoparticles: Drug localization is substance-specific and achievable load depends on the size and physical state of the particles. *Journal of Controlled Release*, *189*, 54-64.
- Lapinski, M., Castro-Forero, A., Greiner, A., Ofoli, R., & Blanchard, G. (2007). Comparison of Liposomes Formed by Sonication and Extrusion: Rotational and Translational Diffusion of an Embedded Chromophore. *Langmuir*, *23*(23), 11677-11683.

- Lauro, F., Pretto, P., Covolo, L., Jori, G., & Bertoloni, G. (2002). Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene–polylysine conjugates. *Photochem. Photobiol. Sci*, 1(7), 468-470. doi: 10.1039/b200977c
- Lissi, E. A., Encinas, M. V., Lemp, E., & Rubio, M. A. (1993). Singlet Oxygen O₂(¹DELTA.g) Bimolecular processes. Solvent and compartmentalization effects. *Chemical Reviews*, 93(2), 699-723. doi:10.1021/cr00018a004
- Mamaeva, V., Sahlgren, C., & Lindén, M. (2013). Mesoporous silica nanoparticles in medicine—Recent advances. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(5), 689-702. doi:10.1016/j.addr.2012.07.018.
- Manzano, M., Aina, V., Areán, C., Balas, F., Cauda, V., Colilla, M., . . . Vallet-Regí, M. (2008). Studies on MCM-41 Mesoporous Silica for Drug Delivery: Effect of Particle Morphology and Amine Functionalization. *Chemical Engineering Journal*, 137(1), 30-37. doi:10.1016/j.cej.2007.07.078
- Martinetti, M. (2009). *Aplicación tópica de liposomas ultradeformables para terapia fotodinámica*. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal. Retrieved from <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/124>
- Masood, F. (2016). Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 60, 569-78.
- Matheson, I. B., Lee, J., Yamanashi, B. S., & Wolbarsht, M. L. (1974). Measurement of the absolute rate constants for singlet molecular oxygen (¹DELTA.g) reaction with 1,3-diphenylisobenzofuran and physical quenching by ground state molecular oxygen. *J. Am. Chem. Soc.*, 96(11), 3343–48. doi:10.1021/ja00818a001
- Mehnert, W., & Mader, K. (2012). Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 83-101.
- Merck-Sigma Aldrich. (n.d.). *Drug Delivery FAQs*. Retrieved diciembre 5, 2021, from Merck: <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/technical-documents/technical-article/materials-science-and-engineering/drug-delivery/drug-delivery-questions>
- Moreno, G., Eng, A., Alvarado, A., & Camps-Fresneda, A. (2007). Terapia fotodinámica. *Med Cutan Iber Lat Am*, 35(6), 255-68.
- Mortera, R., Fiorilli, S., Garrone, E., Vernè, E., & Onida, B. (2009). Pores occlusion in MCM-41 spheres immersed in SBF and the effect on ibuprofen delivery kinetics: A quantitative model. *Chemical Engineering Journal*, 156(1), 184-193. doi:10.1016/j.cej.2009.10.018
- Murray, R. W., & Kaplan, M. L. (1969). Singlet oxygen sources in ozone chemistry. Chemical oxygenations using the adducts between phosphite esters and ozone. *J Amer Chem Soc*, 91(19), 5358-64. doi:10.1021/ja01047a027
- Nairi, V., Medda, S., Piludu, M., Casula, M., Vallet-Regí, M., Monduzzi, M., & Salis, A. (2018). Interactions between bovine serum albumin and mesoporous silica nanoparticles functionalized with biopolymers. *Chemical Engineering Journal*, 340, 42-50.

- Ogilby, P., & Iu, K. (1987). A Time-Resolved Study of Singlet Molecular Oxygen ($^1\text{O}_2$) Formation in a Solution-Phase Photosensitized Reaction: A New Experimental Technique To Examine the Dynamics of Quenching by Oxygen. *J. Phys. Chem.*, *91*(6), 1611-1617.
- Ohulchanskyy, T., Roy, I., Goswami, L., Chen, Y., Bergey, E., Pandey, R., . . . Prasad, P. (2007). Organically modified silica nanoparticles with covalently incorporated photosensitizer for photodynamic therapy of cancer. *Nano Lett*, *7*(9), 2835-42. doi:10.1021/nl0714637
- Oliveros, E., Bossmann, S., Nonell, S., Martí, C., Heit, G., Tröscher, G., . . . Braun, A. (1999). Photochemistry of the singlet oxygen [$\text{O}_2(^1\Delta_g)$] sensitizer perinaphthenone (phenalenone) in N,N'-dimethylacetamide and 1,4-dioxane. *New J. Chem.*, *23*(1), 85-93. doi:10.1039/a804054k
- Oliveros, E., Suardi-Murasecco, P., Aminian-Saghafi, T., & Braun, A. (1991). ^1H -Phenalen-1-one: Photophysical Properties and Singlet-Oxygen Production. *Helv. Chim. Acta*, *74*(1), 79-90. doi:10.1002/hlca.19910740110
- Ortan, A., Câmpeanu, G., Dinu, C., Pîrvu, & Popescu, L. (2009). Studies concerning the entrapment of Anethum graveolens essential oil in liposomes. *Rom. Biotechnol. Lett.*, *13*(3), 4411-17.
- Patty, P., & Frisken, B. (2003). The Pressure-Dependence of the Size of Extruded Vesicles. *Biophysical Journal*, *85*(2), 996-1004.
- Phatangare, K., & Lanke, S. (2014). Phenalenone Fluorophores-Synthesis, Photophysical Properties. *J Fluoresc*, *24*(6), 1827-40. doi:10.1007/s10895-014-1471-3
- Pierlot, C., Aubry, J.-M., Briviba, K., Sies, H., & Mascio, P. D. (2000). Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media. *Methods in Enzymology*, *319*(1), 3-20. doi:10.1016/s0076-6879(00)19003-2
- Queiroz, R., Varca, G., Kadlubowski, S., Ulanski, P., & Lugão, A. (2016). Radiation-synthesized protein-based drug carriers: Size-controlled BSA nanoparticles. *Int J Biol Macromol*, *85*(82), 82-91. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.12.074
- R. M. Badger, A. W. (1965). Absolute Intensities of the Discrete and Continuous Absorption Bands of Oxygen Gas at 1.26 and 1.065 μ and the Radiative Lifetime of the $^1\Delta_g$ State of Oxygen. *J. Chem. Phys.*, *43*(12), 4345-50. doi:10.1063/1.1696694
- Rai, M., Ingle, A., Gupta, I., & Brandelli, A. (2015). Bioactivity of noble metal nanoparticles decorated with biopolymers and their application in drug delivery. *Int J Pharm*, *496*(2), 159-72. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.10.059
- Roblero-Bartolón, G., & Ramón-Gallegos, E. (2015). Uso de nanopartículas (NP) en la terapia fotodinámica (photodynamic therapy [PDT]) contra el cáncer. *Gac Med Mex*, *151*(1), 85-98.
- Schmidt, R., Tanielian, C., Dunsbach, R., & Wolff, C. (1994). Phenalenone, a universal reference compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ sensitization. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *79*(1-2), 11-17. doi:10.1016/1010-6030(93)03746-4

- Schweitzer, C., & Schmidt, R. (2003). Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. *Chemical Reviews*, 103(5), 1685-1758. doi:10.1021/cr010371d
- Sengupta, S., Chattopadhyay, M., & Grossart, H. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol*, 4(47). doi:10.3389/fmicb.2013.00047
- Slowing, I., Vivero-Escoto, J., Trewyn, B., & Lin, V. (2010). Mesoporous silica nanoparticles: structural design and applications. *Journal of Materials Chemistry*, 20(37), 7924–7937. doi:10.1039/c0jm00554a
- Stöber, W., Fink, A., & Bohn, E. (1968). Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *Journal of Colloid and Interface Science*, 26(1), 62-69.
- Sun, X., Zhao, Y., Lin, V., Slowing, I., & Trewyn, B. (2011). Luciferase and Luciferin Co-immobilized Mesoporous Silica Nanoparticle Materials for Intracellular Biocatalysis. *J Am Soc*, 133(46), 18554-57.
- Tadanaga, K., Morita, K., Mori, K., & Tatsumisago, M. (2013). Synthesis of monodispersed silica nanoparticles with high concentration by the Stöber process. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 68(2), 341-345. doi:10.1007/s10971-013-3175-6
- Turro, N. J. (1991). *Modern Molecular Photochemistry*. University Science Books.
- Ugazio, E., Gastaldi, L., Brunella, V., Scalarone, D., Jadhav, S., Oliaro-Bosso, S., & Sapino, S. (2016). Thermoresponsive mesoporous silica nanoparticles as a carrier for skin delivery of quercetin. *International Journal of Pharmaceutics*, 511(1).
- Verhoeven, J. (1996). Glossary of terms used in photochemistry (IUPAC Recommendations 1996). *Pure Appl Chem*, 68(12), 2223-86. doi:10.1351/pac199668122223.
- Verhoeven, J. W. (1996). Glosario de términos usados en fotoquímica. (J. L. Bourdelande, S. Nonell, A. U. Acuña, & R. Sastre, Eds.) *Pure Appl. Chem.*, 68, 2223-86.
- Wainwright, M. (1998). Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42(1), 13-28. doi:10.1093/jac/42.1.13
- Wang, Y., Zhao, Q., Han, N., Bai, L., Li, J., Liu, J., . . . Wang, S. (2015). Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. *Nanomedicine*, 11(2), 313-27. doi:10.1016/j.nano.2014.09.014
- Wilkinson, F. (1995). Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. An Expanded and Revised Compilation. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 24(2), 663-677. doi:10.1063/1.555965
- Wilkinson, F., Helman, W., & Ross, A. (1993). Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 22(1), 113-262. doi:10.1063/1.555934
- Williams, A., Winfield, S., & Miller, J. (1983). Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer. *The Analyst*, 108(1290), 1067-1071. doi:10.1039/an9830801067

- Xiaoqing, H., Huang, Y.-Y., Yuguang, W., Xiaoyuan, W., & Hamblin, M. (2018). Antimicrobial Photodynamic Therapy to Control Clinically Relevant Biofilm Infections. *Frontiers in Microbiology*, *9*(1299). doi:10.3389/fmicb.2018.01299
- Yue, H., & Ma, G. (2015). Polymeric micro/nanoparticles: Particle design and potential vaccine delivery applications. *Vaccine*, *33*(44), 5927-36.
- Zamadar, M., & Greer, A. (2009). Singlet Oxygen as a Reagent in Organic Synthesis. In *Handbook of Synthetic Photochemistry* (pp. pp. 353-386). John Wiley & Sons.
doi:10.1002/9783527628193.ch11
- Zhang, B., Xing, J., Lang, Y., & Liu, H. (2008). Synthesis of amino-silane modified magnetic silica adsorbents and application for adsorption of flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Science in China Series B Chemistry*, *51*(2), 145-151. doi:10.1007/s11426-007-0104-y
- Zhang, Y., Zhi, Z., Jiang, T., Zhang, J., Wang, Z., & Wang, S. (2010). Spherical mesoporous silica nanoparticles for loading and release of the poorly water-soluble drug telmisartan. *J Control Release*, *145*(3), 257-63. doi:10.1016/j.jconrel.2010.04.029