



Universidad de Los Andes

Facultad de Ciencias

Departamento de Química



**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y FOTOQUÍMICA DE NUEVOS
ÉSTERES DERIVADOS DE LOMEFLOXACINA. ESTUDIO DE SU ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA FOTOINDUCIDA.**

www.bdigital.ula.ve
Trabajo Especial de Grado

Presentado ante la ilustre Universidad de Los Andes como requisito parcial para optar al
título de Licenciada en Química

Estudiante:

Arlene C. Giménez Suárez

Tutor Académico:

Dr. Carmelo Rosquete P.

Tutor Externo:

Dra. Tamara Zoltan F.

Mérida, 2015

DEDICATORIA

A mi familia, por la confianza que apostaron en mí, por su apoyo incondicional, por estar en las buenas y en las malas, en las mejores y peores, alegrándose con los triunfos y apoyándome en las derrotas. Gracias por nunca darse por vencidos conmigo. Esto es para ustedes...

Con una dedicación especial a mi luz, mi motor, mis alas... gracias por recordarme lo buena que puede ser la vida... gracias por devolverme las ganas... Esto va para ti mi princesa Julieta, mientras estemos juntas, no habrá nada que me detenga.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por la vida, que me permitió tener esta experiencia.

A mis abuelitos Ana y Epifanio, a mi tía Maddy, siempre apoyándome desde allá arriba, gracias por cuidarme.

Les agradezco a mi madre Arlene y a mi hermana Ana, las mejores amigas que la vida pudo darme, el mayor ejemplo, gracias por sus ánimos y sus regaños, gracias por la presión, sé que es porque esperan grandes cosas de mí. Gracias por estar ahí en todo.

A mi padre Segundo y mis hermanos Julio y Jorge por enseñarme tantas cosas sobre la vida.

A mi abuelita Maria y a mis tías Fanny y Josefa, por siempre esperar tantas cosas bonitas de mí, siempre dándome un gran impulso.

Un especial agradecimiento al Laboratorio de Fotoquímica del IVIC, lugar donde encontré más que una tutora, una amiga, doctora Tamara, gracias por sus enseñanzas, gracias por compartir esa hermosa parte de la química conmigo y por tantos consejos académicos y personales, siempre los atesorare, gracias por la gran oportunidad de trabajar a su lado, disculpe todo lo malo!, a mis compañeros de laboratorio, mis compinches, Oly, Julio y Marcel, Gracias por los espectaculares momentos vividos en esta experiencia, gracias por su ayuda y su apoyo en todos esos trasnochos!.

Al profesor Carmelo, gracias por su paciencia y apoyo.

A mis amigos Kristal, Hector, Liz y Nicolás, por su incondicional amistad. A Eli, esas amigas que la vida te da en un instante, que no solo te dan un impulso, sino que sabes que pase lo que pase, van a estar ahí.

Gracias a la vida misma, que me puso en el lugar y en el momento correcto.

Gracias a mi hermosa hija Julieta por llegar y demostrarme lo que es el verdadero amor, no sabía lo que era la felicidad hasta que te conocí, nunca dejare de agradecerle a dios por ponerte en mi vida, la bendición más inesperada que llego a iluminar el momento más oscuro de mi vida.

A los que no nombro en este momento pero siempre han sido parte de mi vida, saben que de una u otra manera les he demostrado mi agradecimiento, no solo es necesario que los mencione aquí.

Gracias!

RESUMEN

La Lomefloxacin es una de las fluoroquinolonas con mayor actividad antibacteriana y también es conocida por exhibir una severa fototoxicidad por exposición al sol. La fotosensibilidad es un término empleado para describir las reacciones no deseadas de fármacos, pigmentos y aditivos de comidas con la radiación proveniente de las emisiones solares (UVA/UVB). En este trabajo se propone modificar la estructura la Lomefloxacin, específicamente en el grupo carboxilato mediante las reacciones con fenol y B-naftol para formar ésteres derivados de Lomefloxacin y aumentar su estabilidad frente a la radiación UVA y UVB, y así evaluar su potencial aplicación en fototerapia dinámica antibacteriana frente a *E. coli*. Se realizó la purificación del Clorhidrato de Lomefloxacin (LOM.HCl) que es la presentación comercial, se obtuvo un rendimiento del 73% de la base libre de Lomefloxacin, La síntesis se llevó a cabo mediante la esterificación, en medio ácido gaseoso, en una solución acuosa de cloroformo con una relación estequiométrica de 1:3 fluoroquinolona:alcohol obteniendo un rendimiento de 78% y 73% para el éster fenílico y el éster naftílico, respectivamente. La caracterización estructural se llevó a cabo mediante técnicas espectroscópicas como Espectroscopia de Absorción en el Infrarrojo (FT-IR), Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (^1H RMN y ^{13}C RMN), Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear Bidimensional (COSY y HMQC), Espectrometría de Masas, Espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis) y Espectroscopia de Fluorescencia, comprobando la inclusión de los grupos aromáticos en la estructura. La caracterización fotoquímica consistió en **1-** Determinación de la fotoestabilidad de los productos de la esterificación encontrándose que los dos ésteres se degradan con la interacción con los rayos UVA y UVB, en menor proporción que el compuesto de partida. **2-** Determinación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia: se observó una tendencia de Lomefloxacin > éster fenílico de Lomefloxacin > éster naftílico de Lomefloxacin en agua, en PBS la tendencia observada fue Lomefloxacin > éster naftílico de Lomefloxacin > éster fenílico de Lomefloxacin. **3-** Determinación de los rendimientos cuánticos de generación de oxígeno singlete obteniéndose la tendencia Lomefloxacin > éster fenílico de Lomefloxacin > éster naftílico de Lomefloxacin, infiriendo así que la inclusión de grupos resonantes disminuye el tiempo de vida media del estado triplete. **4-** Determinación de producción de radicales libres oxigenados, observando que la tendencia de la producción de radicales libres por parte de los compuestos es la siguiente: éster naftílico de Lomefloxacin > Lomefloxacin > éster fenílico de Lomefloxacin, demostrando así que el éster fenílico muestra preferencia por el mecanismo de fotosensibilización tipo II (mayor producción de oxígeno singlete) que para la transferencia electrónica, al contrario, el éster naftílico muestra una marcada preferencia por la producción de radicales libres oxigenados (mecanismo de fotosensibilización tipo I) que por la transferencia energética al oxígeno. La determinación de la actividad antibacteriana fotoinducida demostró que el éster fenílico de Lomefloxacin es el compuesto que mayor inactivación hace sobre la viabilidad celular de la *E. coli*, pudiendo atribuirse el mecanismo tipo II en la que se genera la especie Oxígeno Singlete, y la acción que esta especie ejerce sobre la viabilidad de la bacteria. Debido a que se encontró que la integridad estructural de los compuestos se ve comprometida al exponerse a las radiaciones UVA y UVB, se sugiere el estudio de la estructura de los compuestos obtenidos luego de la radiación, asíndolos y caracterizándolos estructuralmente para comprobar que la descomposición es debido a la liberación del flúor y todas las variaciones estructurales que se derivan de esta.

ABSTRACT

Lomefloxacin is an antibacterial fluoroquinolone known to exhibit a severe phototoxicity by sun exposure. The photosensitivity is a term used to describe unwanted reactions of drugs, pigments and additives in foods with solar radiation (UVA / UVB). In this paper we propose to modify the structure of lomefloxacin, specifically in the carboxylate group by reactions with phenol and B-naphthol to form esters derived of lomefloxacin and increase their stability against UVA and UVB radiation, and assess their potential application in dynamic phototherapy antibacterial against *E.coli*. Purification of Lomefloxacin Hydrochloride (LOM.HCl) which is the commercial form, was performed, a yield of 73% of the free base was obtained. The synthesis was carried out by esterification in acidic gaseous medium, in an aqueous solution of chloroform with a stoichiometric ratio of 1: 3 fluoroquinolone: alcohol to obtain a yield of 78% and 73% for the phenyl ester and naphthyl ester, respectively. Structural characterization was carried out using spectroscopic techniques such as absorption spectroscopy in the infrared (FT-IR), Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (^1H NMR and ^{13}C NMR) Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy bidimensional (COSY and HMQC), Spectrometry mass, spectrophotometry UV-Visible (UV-Vis) and fluorescence spectroscopy, checking the inclusion of aromatic groups in the structure. Photochemical characterization consisted of **1-** Determination of the photostability of the esterification products finding that the two esters degrade the interaction with both UVA and UVB rays, lesser than the parent compound. **2-** Determining the fluorescence quantum yields: a tendency Lomefloxacin > phenyl ester Lomefloxacin > Lomefloxacin naphthyl ester observed in water, the trend observed in PBS was Lomefloxacin > naphthyl ester Lomefloxacin > Lomefloxacin phenyl ester . **3-** Determination of quantum yields of singlet oxygen generation obtaining lomefloxacin > phenyl ester Lomefloxacin > naphthyl ester Lomefloxacin tendency, thus inferring that the inclusion of resonant groups decreases the half-life of the triplet state. **4-** Determination of the production of oxygenated free radicals, noting that the tendency of the free radical production by the compounds is: Lomefloxacin naphthyl > Lomefloxacin > ester phenyl ester Lomefloxacin, demonstrating that a preference for phenyl ester the mechanism of type II photosensitization (increased production of singlet oxygen) for electronic transfer, on the contrary, the naphthyl ester shows a marked preference for the production of oxygen free radicals (type I photosensitization mechanism) that transfer energy to oxygen. Determining the photoinduced antibacterial activity showed that phenyl ester compound Lomefloxacin has greater inactivation on viability of the cells of *E. coli*, this can be attributed to the type II mechanism wherein the singlet oxygen species is generated, and the action that his species has on the viability of the bacterium. Because it was found that the structural integrity of the sintetized compounds is compromised by exposure to UVA and UVB radiation, the study of the structure of the compounds obtained after radiation, is suggested, to show that decomposition is due to the release of fluorine and all structural variations arising from this.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|------|
| DEDICATORIA..... | ii |
| AGRADECIMIENTOS..... | iii |
| RESUMEN..... | iv |
| ABSTRACT..... | v |
| ÍNDICE GENERAL..... | vi |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | viii |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | xi |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. MARCO TEÓRICO..... | 3 |
| 2.1 La naturaleza cuántica de la luz y la materia..... | 3 |
| 2.1.1 Teoría Cuántica de Planck..... | 3 |
| 2.1.2 El Espectro Electromagnético..... | 4 |
| 2.1.3 Regiones del espectro electromagnético..... | 5 |
| 2.2 Orbitales Atómicos..... | 7 |
| 2.3 Orbitales Moleculares..... | 9 |
| 2.4 Absorción de la luz..... | 11 |
| 2.4.1 Estados electrónicos excitados..... | 11 |
| 2.4.2 Transiciones electrónicas..... | 13 |
| 2.4.3 Ley de Lambert-Beer..... | 14 |
| 2.5 Fotoquímica..... | 15 |
| 2.6 Leyes de la Fotoquímica..... | 16 |
| 2.6.1 Rendimiento cuántico..... | 17 |
| 2.7 Secuencias Fotoquímica..... | 18 |
| 2.7.1 Procesos fotoquímicos y fotofísicos..... | 18 |
| 2.8 Cinética de los procesos fotofísicos y fotoquímicos..... | 21 |
| 2.9 Quinolonas..... | 23 |
| 2.9.1 Reacciones químicas importantes para las propiedades medicinales de las quinolonas..... | 26 |
| 2.10 Fotosensibilidad inducida por drogas o fotosensibilidad medicamentosa..... | 29 |
| 2.10.1 Pruebas para la determinación de fototoxicidad de la droga..... | 31 |
| 2.11 Fotosensibilización y fotosensibilizadores..... | 31 |
| 2.11.1 Mecanismos fotoquímicos..... | 32 |
| 2.11.2 Fotosensibilizadores..... | 33 |
| 2.11.3 Fotogeneración de oxígeno singlete..... | 33 |
| 2.11.4 Requisitos de un fotosensibilizador de oxígeno singlete..... | 35 |
| 2.11.5 Aplicaciones de los fotosensibilizadores..... | 36 |
| 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 39 |
| 5. ANTECEDENTES..... | 40 |
| 6. HIPOTESIS PRELIMINAR..... | 51 |
| 7. OBJETIVOS..... | 51 |
| 7.1 Objetivo general..... | 51 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 7.2 | Objetivos específicos | 51 |
| 8. | PARTE EXPERIMENTAL | 52 |
| 7.1 | Purificación del Clorhidrato de Lomefloxacin (LOM.HCl) | 52 |
| 7.2 | Síntesis de los ésteres derivados de Lomefloxacin | 52 |
| 7.3 | Caracterización mediante técnicas espectroscópicas | 53 |
| 7.4 | Caracterización Fotoquímica de los esteres derivados. | 54 |
| 7.4.1 | Estudio de la Fotoestabilidad frente a irradiación UVA y UVB | 54 |
| 7.4.2 | Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia..... | 54 |
| 7.4.3 | Determinación del rendimiento cuántico de oxígeno singlete (1O_2). | 55 |
| 7.4.4 | Determinación de producción de radicales libres oxigenados..... | 56 |
| 7.5 | Determinación de la actividad antibacteriana fotoinducida..... | 58 |
| 9. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 60 |
| 9.1 | Purificación del Clorhidrato de Lomefloxacin (LOM.HCl) | 60 |
| 9.2 | Síntesis de los ésteres derivados de Lomefloxacin | 60 |
| 9.3 | Caracterización mediante técnicas espectroscópicas | 61 |
| 9.3.1 | Espectroscopia de Absorción en el Infrarrojo (IR-TF)..... | 61 |
| 9.3.2 | Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear | 64 |
| 9.3.3 | Espectrometría de Masas | 72 |
| 9.3.4 | Espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis). | 76 |
| 9.4 | Caracterización Fotoquímica de los esteres derivados. | 79 |
| 9.4.1 | Estudio de la Fotoestabilidad frente a irradiación UVA y UVB | 79 |
| 9.4.2 | Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia..... | 87 |
| 9.4.3 | Determinación del rendimiento cuántico de oxígeno singlete..... | 93 |
| 9.4.4 | Determinación de producción de radicales libres oxigenados..... | 96 |
| 9.4.5 | Determinación de la actividad antibacteriana fotoinducida | 99 |
| 10. | CONCLUSIONES..... | 102 |
| 11. | RECOMENDACIONES | 103 |
| 12. | BIBLIOGRAFÍA..... | 104 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Onda electromagnética. Luz polarizada en el plano. Dirección del campo eléctrico y del campo magnético. λ = Longitud de la onda..... | 4 |
| Figura 2. Regiones del espectro electromagnético..... | 5 |
| Figura 3. Formación de orbitales moleculares (OM) por la interacción de dos orbitales atómicos (OA) idénticos..... | 9 |
| Figura 4. Superficie de enlace del orbital enlazante σ y antienlazante σ^* | 10 |
| Figura 5. Superficies de enlaces de los orbitales π (enlazante) y π^* (antienlazante). | 10 |
| Figura 6. Representación esquemática de las energías de los orbitales moleculares en las moléculas orgánicas..... | 10 |
| Figura 7. Representación de las diferencias de energías de los estados electrónicos..... | 12 |
| Figura 8. Representación de los orbitales involucrados en la absorción de luz, transición | 13 |
| Figura 9. Representación de los niveles de energía de los orbitales moleculares y de las transiciones electrónicas posibles entre ellos. | 13 |
| Figura 10. Diagrama de Jablonski..... | 20 |
| Figura 11. Diagrama de Jablonski en función de las constantes de velocidad entre los procesos de los estados electrónicos..... | 23 |
| Figura 12. Estructura general de las quinolonas..... | 24 |
| Figura 13. Representación estructural de algunas quinolonas conocidas..... | 25 |
| Figura 14. Mecanismo postulado para la fotólisis de las quinolonas | 26 |
| Figura 15. Quelatos de las fluoroquinolonas con metales..... | 27 |
| Figura 16. Estructura de la lomefloxacin a diferentes pH. | 28 |
| Figura 17. Esquema de los mecanismos fotoquímicos..... | 32 |
| Figura 18. Estado fundamental (triplete) y excitado (singlete) de la molécula de oxígeno. | 34 |
| Figura 19. Proceso de fotosensibilización para la fotogeneración de oxígeno singlete. | 34 |
| Figura 20. Monitoreo de la fotodegradación del Ácido Nalidíxico mediante la variación de sus espectros de absorción..... | 40 |
| Figura 21. Mecanismo propuesto para la fotodegradación del ácido nalidíxico en medio oxigenado (Vargas, Rivas, & Machado, 1991). | 41 |
| Figura 22. Efecto de la irradiación UVA en algunas fluoroquinolonas conocidas. Una solución conteniendo 20 $\mu\text{g/mL}$ de fluoroquinolonas fue irradiada con UVA y sus espectros tomados a diferentes tiempos de la irradiación. | 42 |
| Figura 23. Estructuras de los compuestos estudiados. | 45 |
| Figura 24. (A) Producción fotoquímica de $^1\text{O}_2$ por algunas fluoroquinolonas al ser irradiadas con UVA. (4,32 J/cm^2). (B). Producción fotoquímica de $^1\text{O}_2$ por algunas fluoroquinolonas al ser irradiadas con UVB (2,16 J/cm^2). (C) Producción fotoquímica de $^1\text{O}_2$ por algunas fluoroquinolonas al ser irradiadas con luz solar por 60 minutos..... | 46 |
| Figura 25. (A) Producción fotoquímica de O_2^- por algunas fluoroquinolonas a diferentes concentraciones al ser irradiadas con UVA. (1,44 J/cm^2). (B) Producción fotoquímica de O_2^- por algunas fluoroquinolonas a diferentes concentraciones al ser irradiadas con UVB (0,70 J/cm^2). (C) Producción fotoquímica de O_2^- por algunas fluoroquinolonas a diferentes concentraciones al ser irradiadas con luz solar por 20 minutos. | 47 |
| Figura 26. Estructuras de las quinolonas estudiadas y sus derivados ésteres naftílicos..... | 48 |
| Figura 27. Generación de especies peroxídicas determinadas por quimioluminiscencia. .. | 49 |
| Figura 28. Influencia de la irradiación de los compuestos 1 a 4 en el ensayo de la oxidación de la Histidina a 440 nm. La Rosa de Bengala fue usada como patrón..... | 49 |

| | |
|--|----|
| Figura 29. Ensayo de la viabilidad celular microbiana basado en la cuantificación de ATP presente medido por quimioluminiscencia en 5 horas de incubación de la <i>E. coli</i> con los compuestos 2 y 4. | 49 |
| Figura 30. Reacción general de síntesis. | 52 |
| Figura 31. Reacción específica de la Histidina con el Oxígeno Singlete ($^1\text{O}_2$)..... | 55 |
| Figura 32. Reacción enzimática del NADH con radicales libres oxigenados (ROS). | 57 |
| Figura 33. Reacción del luminol. | 57 |
| Figura 34. Reacción enzimática de la luciferasa | 59 |
| Figura 35. Resumen del mecanismo de esterificación (Fessenden & Fessenden, 1991)..... | 61 |
| Figura 36. Espectro IR-FT obtenido para el Fenil éster derivado. | 62 |
| Figura 37. Espectro IR-FT obtenido para el éster naftílico derivado. | 63 |
| Figura 38. Espectro RMN ^1H del éster fenílico de Lomefloxacina en DMSO- d_6 | 64 |
| Figura 39. Identificación de los protones del éster fenílico de Lomefloxacina..... | 65 |
| Figura 40. Espectro COSY del éster fenílico de Lomefloxacina en DMSO- d_6 | 65 |
| Figura 41. Espectro RMN ^{13}C del éster fenílico de Lomefloxacina en DMSO- d_6 | 66 |
| Figura 42. Identificación de los carbonos del éster fenílico de Lomefloxacina..... | 66 |
| Figura 43. Espectro HMQC de éster fenílico de Lomefloxacina en DMSO- d_6 | 67 |
| Figura 44. Espectro RMN ^1H del éster naftílico de Lomefloxacina..... | 69 |
| Figura 45. Identificación de los protones del éster naftílico de Lomefloxacina | 69 |
| Figura 46. Espectro COSY del éster naftílico de Lomefloxacina | 70 |
| Figura 47. Espectro RMN ^{13}C para el éster naftílico de Lomefloxacina..... | 71 |
| Figura 48. Identificación de los carbonos del éster naftílico de Lomefloxacina..... | 71 |
| Figura 49. Espectro HMQC del éster naftílico de Lomefloxacina..... | 71 |
| Figura 50. Espectro de Masa obtenido para el éster fenílico de Lomefloxacina..... | 73 |
| Figura 51. Pico obtenido para el ion molecular el éster fenílico. | 73 |
| Figura 52. Espectro de Masas para el éster naftílico de Lomefloxacina | 74 |
| Figura 53. Pico obtenido para el ion molecular del éster naftílico de Lomefloxacina..... | 75 |
| Figura 54. Espectro UV de Lomefloxacina en agua [2×10^{-5} M]. | 76 |
| Figura 55. Espectro UV del éster fenílico de Lomefloxacina en agua [2×10^{-5} M]. | 76 |
| Figura 56. Espectro UV del éster naftílico de Lomefloxacina en agua [$1,9 \times 10^{-5}$ M]. | 77 |
| Figura 57. Espectro UV de Lomefloxacina en PBS [$2,48 \times 10^{-5}$ M]. | 78 |
| Figura 58. Espectro UV del éster fenílico de Lomefloxacina en PBS [$2,5 \times 10^{-5}$ M]. | 78 |
| Figura 59. Espectro UV del éster naftílico de Lomefloxacina en PBS [$2,48 \times 10^{-5}$ M]. | 79 |
| Figura 60. Fotodegradación de Lomefloxacina en UVA. | 80 |
| Figura 61. Fotodegradación de Lomefloxacina en UVB..... | 80 |
| Figura 62. Fotodegradación del éster fenílico de Lomefloxacina en UVA..... | 80 |
| Figura 63. Fotodegradación del éster fenílico de Lomefloxacina en UVB..... | 81 |
| Figura 64. Fotodegradación del éster naftílico de Lomefloxacina en UVA..... | 81 |
| Figura 65. Fotodegradación del éster naftílico de Lomefloxacina en UVB..... | 82 |
| Figura 66. Porcentaje de fotodegradación de las principales bandas de los compuestos en UVA. | 83 |
| Figura 67. Porcentaje de Fotodegradación de las principales bandas de los compuestos en UVB..... | 83 |
| Figura 68. Fotodegradación de Lomefloxacina en UVA. | 84 |
| Figura 69. Fotodegradación de Lomefloxacina en UVB..... | 85 |
| Figura 70. Fotodegradación del éster fenílico en UVA..... | 85 |
| Figura 71. Fotodegradación del éster fenílico en UVB..... | 85 |

| | |
|--|----|
| Figura 72. Fotodegradación del éster naftílico en UVA..... | 86 |
| Figura 73. Fotodegradación del éster naftílico en UVB..... | 86 |
| Figura 74. Porcentaje de fotodegradación de las principales bandas de los compuestos en UVA. | 86 |
| Figura 75. Porcentaje de fotodegradación de las principales bandas de los compuestos en UVB..... | 87 |
| Figura 76. Espectro de fluorescencia de Lomefloxacin en agua [1×10^{-7} M]..... | 87 |
| Figura 77. Espectro de fluorescencia del éster fenílico de Lomefloxacin en agua [1×10^{-6} M]. | 88 |
| Figura 78. Espectro de fluorescencia del éster naftílico de Lomefloxacin en agua [1×10^{-7} M]. | 88 |
| Figura 79. Espectro de fluorescencia de Rodamina B (patrón) en agua [$3,9 \times 10^{-7}$ M]. | 88 |
| Figura 80. Comparación rendimiento cuántico de fluorescencia en Agua..... | 90 |
| Figura 81. Espectro de fluorescencia de Lomefloxacin en PBS [$1,2 \times 10^{-7}$ M]. | 90 |
| Figura 82. Espectro de fluorescencia del éster fenílico de Lomefloxacin en PBS [3×10^{-7} M]. | 91 |
| Figura 83. Espectro de fluorescencia del éster naftílico de Lomefloxacin en PBS [5×10^{-7} M]. | 91 |
| Figura 84. Espectro de fluorescencia de la Rodamina B en PBS [$4,9 \times 10^{-7}$ M]. | 91 |
| Figura 85. Comparación rendimiento cuántico de fluorescencia en PBS | 92 |
| Figura 86. Producción de Oxígeno Singlete de los Compuestos y la Rosa de Bengala al ser irradiados con luz UVA en agua..... | 93 |
| Figura 87. Comparación de la Producción de Oxígeno Singlete de los compuestos y la Rosa de Bengala al ser irradiados con luz UVA en PBS | 94 |
| Figura 88. Comparación entre la producción de Oxígeno Singlete de los compuestos irradiados y a oscuras en agua. | 95 |
| Figura 89. Comparación en la producción de Oxígeno Singlete entre los compuestos irradiados y a oscuras en PBS | 95 |
| Figura 90. Comparación de la producción de [H_2O_2] de los compuestos a diferentes tiempos de irradiación | 97 |
| Figura 91. Efecto de la SOD en la producción de radicales libres oxigenados en 15 minutos de irradiación | 97 |
| Figura 92. Efecto de la SOD en la producción de radicales libres oxigenados en 20 minutos de irradiación | 98 |
| Figura 93. Comparación de la fotoinactivación de <i>E.coli</i> por parte de los compuestos sintetizados y el compuesto de partida. | 99 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Tipos de procesos fotoquímicos. | 20 |
| Tabla 2. Fototoxicidad relativa y potencial fotocarcinogénico/mutagénico de algunas fluoroquinolonas. | 43 |
| Tabla 3. Rendimientos cuánticos de oxígeno singlete para algunas fluoroquinolonas en PBS a pH 7,5 y en metanol. | 43 |
| Tabla 4. Comparación entre las propiedades fotoquímicas de algunas fluoroquinolonas... .. | 44 |
| Tabla 5. Fotodescomposición de fluoroquinolonas. | 44 |
| Tabla 6. Rendimiento cuántico de la fotodescomposición de LOM-H y su derivado éster metílico en solución acuosa. | 45 |
| Tabla 7. Porcentaje de $^1\text{O}_2$ generado por diferentes drogas mediante irradiación con UVA, UVB y luz solar con varios quencher. | 46 |
| Tabla 8. Porcentaje de generación del anión superóxido mediante irradiación a diferentes longitudes de onda. | 47 |
| Tabla 9. Variables para optimizar el rendimiento de reacción para el éster fenílico derivado. | 60 |
| Tabla 10. Asignación de las señales del IR-FT para el éster fenílico. | 62 |
| Tabla 11. Asignación de las señales del IR-FT para el éster naftílico. | 63 |
| Tabla 12. Asignación de las señales del RMN ^1H del éster fenílico de Lomefloxacina | 66 |
| Tabla 13. Asignación de las señales del espectro de ^{13}C para el éster fenílico de Lomefloxacina. | 67 |
| Tabla 14. Asignación de las señales del RMN ^1H del éster naftílico de Lomefloxacina | 70 |
| Tabla 15. Asignación de las señales del espectro de ^{13}C para el éster naftílico de Lomefloxacina. | 72 |
| Tabla 16. Identificación de las fragmentaciones observadas en las figuras 50 y 51 | 74 |
| Tabla 17. Identificación de las fragmentaciones observadas en las figuras 52 y 53 | 75 |
| Tabla 18. Coeficientes de Extinción Molar en Agua. | 77 |
| Tabla 19. Coeficientes de Extinción Molar en PBS | 79 |
| Tabla 20. Rendimientos Cuánticos de Florescencia en Agua. | 89 |
| Tabla 21. Rendimientos Cuánticos de fluorescencia en PBS | 92 |
| Tabla 22. Rendimientos cuánticos de fluorescencia en agua y PBS | 94 |

1. INTRODUCCIÓN

La luz solar es imprescindible para la vida y siempre ha sido considerada como una fuente de salud. Es muy conocido el hecho de que la radiación solar da lugar a la formación de vitamina D y ello combate eficazmente el raquitismo. Sin embargo, junto a sus efectos beneficiosos, la exposición prolongada a esta radiación puede ocasionar en el hombre efectos claramente nocivos: quemaduras (eritemas), daños o incluso muerte de células, alteraciones en el ADN, envejecimiento de la piel, cáncer cutáneo, etc.

Debido a que el Sol emite fuertemente en la región UV-visible-Infrarrojo, los seres vivos en el planeta Tierra han evolucionado para aprovechar la energía que nos llega del Sol. La especie humana también ha utilizado fuentes de luz visible y ultravioleta para efectuar reacciones químicas inducidas por la luz (reacciones fotoquímicas, fotólisis, fotolitografía, máquinas fotocopadoras, impresoras láser, impresión de microcircuitos) (Fontal B, 2005).

La fotoquímica es un área de la química, que estudian los cambios producidos por la interacción de las moléculas con radiaciones no ionizantes (Vargas & Martínez, 2000). Las reacciones fotoquímicas tienen gran importancia biológica, pues un proceso tan fundamental como la fotosíntesis entra en esta clasificación. También la fotodisociación del ozono en la atmósfera, proceso que ayuda a filtrar la radiación ultravioleta del Sol y que protege la vida en la superficie de La Tierra, es un proceso fotoquímico.

Esta ciencia como área independiente se ha venido desarrollando en los últimos 20 años. No obstante, desde hace siglos se ha evidenciado el interés del ser humano en las interacciones de las moléculas con las radiaciones electromagnéticas y los cambios que éstas producen en La Naturaleza.

Ya en el siglo XIX, Grotthus y Draper habían reconocido que cualquier efecto de la luz es consecuencia de la energía lumínica que absorbe el sistema en cuestión. Formalmente, la absorción de un fotón de luz suministra la energía necesaria para producir que una molécula pase de un estado basal o fundamental a un estado electrónico, ahora denominado estado excitado. Muchos compuestos experimentan reacciones químicas mucho más fácilmente si se encuentran en un estado electrónico excitado (Contreras R, 2007).

Precisamente, en las reacciones fotoquímicas, la energía de activación, barrera energética que debe ser cruzada a fin de que se produzca la reacción, es suministrada por la absorción de luz. El efecto inicial, como hemos dicho, consiste en el traslado de la energía lumínica ($E = h\nu$) hasta las moléculas del reactante, incrementado su energía a un nivel más alto en el cual aumenta su reactividad, a fin de poder disociarlo en fragmentos mucho más reactivos que el producto de partida. Obviamente, los fotones deben poseer la energía suficiente para llevar a cabo el proceso deseado.

En la actualidad, el interés por la fotoquímica ha crecido enormemente. Una de las mayores atracciones se ha centrado en las reacciones de fotosensibilización por medicamentos, sobre todo en los últimos diez años (Vargas & Martínez, 2000).

Las quinolonas, compuestos ampliamente utilizados para el tratamiento de afecciones originadas por bacterias gram-positivas y gram-negativas, han sido ampliamente estudiadas por esta ciencia, ya que su fotolabilidad ha sido comprobada, y sus productos de reacción han demostrado poseer una alta toxicidad sobre el cuerpo humano, especialmente sobre la piel (fototoxicidad y fotoalergia). Las fluoroquinolonas (FQ), son quinolonas de segunda generación, que incluyen átomos de flúor en su estructura, lo cual le otorga un aumento no solo el rango de acción sobre las bacterias, sino que le ha conferido también un aumento en sus efectos fototóxicos.

La fotosensibilización se refiere a un proceso de activación por luz que requiere la presencia de una sustancia que absorba la luz, llamada fotosensibilizador, que inicie un proceso físico, químico o biológico en un substrato que no reacciona con la luz (Vargas F, 2002). La fototerapia dinámica antibacteriana es una aplicación de este tipo de fotorreacción que tiene la ventaja de una selectividad dual. Por una parte, el fotosensibilizador puede ser dirigido a la célula destino o tejido infectado; y por la otra, la irradiación puede dirigirse especialmente a la lesión (Zoltan T, 2008).

En este Trabajo Especial de Grado, se realizó el estudio de una de las fluoroquinolonas más fototóxicas, la lomefloxacina (LOM), enfocándose en sus propiedades fotoquímicas y fotofísicas, para luego sintetizar dos nuevos derivados, productos de esterificación de esta fluoroquinolona y estudiar mediante diferentes pruebas fotoquímicas su estabilidad frente a la radiación, así como su actividad antibacteriana fotoinducida.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *La naturaleza cuántica de la luz y la materia.*

2.1.1 Teoría Cuántica de Planck (Chang R, 2002)

Las mediciones hechas en la última parte del siglo XIX, mostraron que la cantidad de energía radiante que emitía un objeto a una cierta temperatura, dependía de su longitud de onda. Sin embargo, la explicación de esta dependencia con la teoría ondulatoria establecida y con las leyes de la termodinámica no era del todo satisfactoria.

En 1889 Planck resolvió el problema con una suposición que se apartaba en forma radical de los conceptos establecidos. La física clásica asumía que los átomos y las moléculas emitían (o absorbían) cualquier cantidad arbitraria de energía radiante. En cambio, Planck proponía que los átomos y las moléculas emitían (o absorbían) energía solo en cantidades discretas, como pequeños paquetes o cúmulos. A la mínima cantidad de energía que se podía emitir (o absorber) en forma de radiación electromagnética, Planck la llamó cuanto. La energía E de solo un cuanto de energía está dada por:

$$E = h\nu \quad (1)$$

Donde h es la constante de Planck, cuyo valor es de $6,63 \times 10^{-34}$ J, y ν es la frecuencia de la radiación.

Cuando Planck presentó su teoría, no podía explicar por qué las energías debían ser finitas o cuantizadas.

La Teoría Cuántica no podía explicar el efecto fotoeléctrico (un fenómeno en el que los electrones son expulsados desde la superficie de ciertos metales que se han expuesto a la luz) pero en 1905, Einstein partió de una extraordinaria hipótesis al considerar que un rayo de luz es, en realidad, un torrente de partículas. Tomando como punto de partida la Teoría Cuántica de Planck, Einstein dedujo que cada una de esas partículas de la luz que ahora se conocen como fotones, debe poseer una energía E , de acuerdo con la ecuación **1**.

Los electrones se mantienen unidos al metal por fuerzas de atracción, y para emitirlos, se necesita una luz que tenga una frecuencia suficientemente alta (una energía suficiente). El rayo de luz que incide sobre una superficie metálica puede compararse con la de la descarga de un rayo de partículas (fotones) sobre los átomos del metal. Si la frecuencia de los fotones es de una magnitud tal que $h\nu$ es exactamente igual a la energía del enlace de los electrones en el metal, entonces la luz suministrará la energía suficiente para emitirlos.

En 1925 Erwin Schrödinger desarrolló una ecuación que describe al electrón en el átomo de hidrógeno con un comportamiento de onda/partícula. La solución de la ecuación de onda de Schrödinger demuestra que la energía de los niveles electrónicos donde se encuentran los átomos está cuantizada; lo que significa, que solo niveles de energía electrónicos específicos son permitidos (Wardle B, 2009).

2.1.2 El Espectro Electromagnético

Mediante los descubrimientos realizados por Planck y Einstein, se consideró que la luz era una manifestación de una onda electromagnética que contenía un campo eléctrico y un campo magnético oscilante, mutuamente perpendiculares y perpendicular a la dirección de propagación, que se desplazaba a la velocidad de la luz, c . Esta descripción permite describir la polarización de la luz. Si la descripción es que la oscilación de los campos eléctrico y magnético es en un solo plano, entonces la luz es una onda polarizada en el plano (Fontal B, 2005).

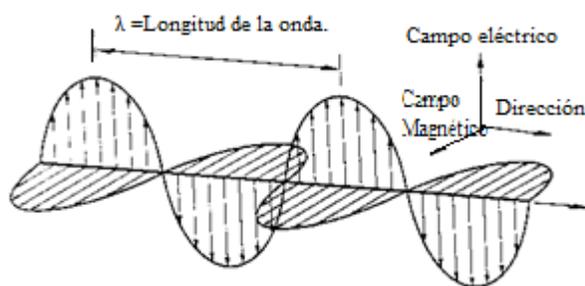


Figura 1. Onda electromagnética. Luz polarizada en el plano. Dirección del campo eléctrico y del campo magnético. $\lambda =$ Longitud de la onda.

El comportamiento dual onda-partícula es la mejor descripción de la radiación electromagnética actualmente. Dependiendo del tipo de experimento realizado, el

comportamiento de la luz se puede explicar como ondulatorio (ondas electromagnéticas) o como partículas (fotones).

James Clerk Maxwell demostró que la luz estaba compuesta por un mosaico de radiación electromagnética. Esta radiación contiene desde las ondas radiofónicas, la luz visible y los rayos-X hasta los rayos γ . Cuando consideramos la luz como una onda electromagnética, la firma espectral de un color puede identificarse a través de su longitud de onda (Chang R, 2002).

2.1.3 Regiones del espectro electromagnético (Fontal B, 2005)

El espectro electromagnético ha sido dividido en diferentes regiones cuyos límites son más o menos arbitrarios y dependen en buena medida en nuestra capacidad de poder producir o detectar esas regiones del espectro. El descubrimiento y especialmente el desarrollo de las aplicaciones prácticas de las diferentes regiones han dependido de la capacidad tecnológica de producir fuentes de radiación apropiadas y detectores o medidores sensibles apropiados para esas regiones.

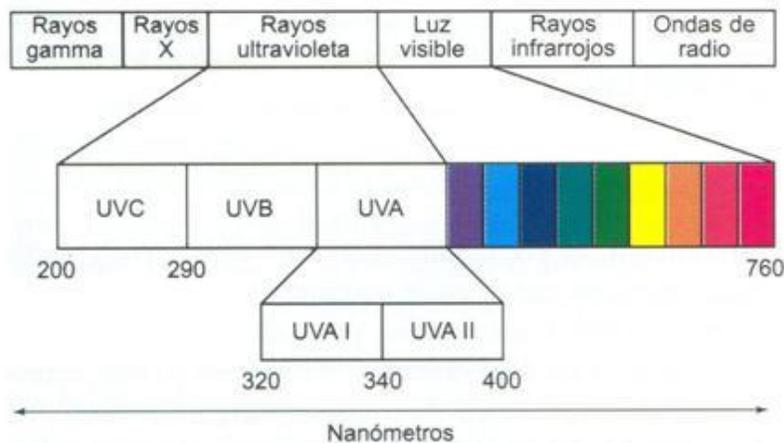


Figura 2. Regiones del espectro electromagnético.

En la figura 2 podemos observar que los rayos gamma (γ) corresponden a la región de fotones más energéticos del espectro electromagnético, con energías en MeV (106 eV) y pueden llegar a 1010 eV, o sea son 10.000 a 10.000.000 veces más energéticos que fotones de luz visible. Los rayos γ están asociados a los *rayos cósmicos*, que son partículas cargadas

altamente energéticas que chocan con la atmósfera terrestre y vienen desde los confines del Universo. Los rayos γ simplemente pasan a través de la mayoría de los materiales y no pueden ser reflejados por espejos como pueden ser los fotones ópticos y aun los fotones de rayos-X.

Los rayos X (o rayos Röntgen en honor a su descubridor) es otra región del espectro electromagnético cuya longitud de onda (λ) está en el rango de 10 nanómetros a 100 picómetros (10^{-8} a 10^{-11} cm) y energías entre 200 y 100.000 eV. Es una forma de radiación ionizante, por lo que puede ser peligrosa. Rayos X con longitudes de onda mayores que 0.1 nm se llaman *rayos X suaves*. Con longitudes de onda menores se llaman *rayos X duros*. Estos rayos X duros se solapan con los rayos γ de baja energía. La distinción entre los dos rayos depende de la fuente de radiación y no de la longitud de onda: los rayos X son generados por procesos electrónicos energéticos y los rayos γ por transiciones en los núcleos atómicos.

La radiación ultravioleta (UV) (que significa “más allá del violeta”), la luz visible (Vis) y el infrarrojo (IR) forman parte de la región óptica del espectro electromagnético. El UV tiene longitud de onda menor que la región visible, pero mayor que los rayos X suaves. El UV se subdivide en UV cercano (longitud de onda: 370-200 nm) y UV extremo o del vacío (200-10 nm). Al considerar los efectos de la radiación UV en la salud humana y el medio ambiente, el UV frecuentemente se subdivide en UVA (380-315 nm), también llamado de Onda Larga o “luz negra” (invisible al ojo), UVB (315-280 nm), también llamado Onda Media y UVC (< 280 nm), también llamado de Onda Corta o “germicida”. El espectro visible es una porción pequeña del espectro electromagnético. Cualquier energía producida en esta estrecha banda producirá la sensación de visión cuando estimula el ojo humano normal.

El *infrarrojo* (IR) es radiación electromagnética de una longitud de onda mayor que la luz visible, pero menor que las *microondas*. El nombre indica que está “por debajo” del rojo, que es el color visible de mayor longitud de onda. El IR se extiende desde 700 nm a 1 mm (1000 μ m). La zona de IR del espectro no se puede ver, pero si se puede detectar. El IR frecuentemente se subdivide en cuatro regiones: a) infrarrojo cercano (NIR, 780-3.000 nm); b) infrarrojo medio (MWIR, 3.000-6.000 nm); c) infrarrojo lejano (LWIR, 6.000- 15.000 nm); y d) infrarrojo extremo (0,015-1,0 mm).

Las *microondas* son ondas electromagnéticas con longitud de onda mayores que el infrarrojo, pero menores que las ondas de radio. Las microondas tienen longitud de onda aproximadamente en el rango de 30 cm (frecuencia = 1 GHz) a 1 mm (300 GHz). También se incluye el rango de 1 GHz a 1.000 GHz, aunque la mayoría de las aplicaciones van de 1 a 40 GHz. Los límites entre el infrarrojo lejano, las microondas y las ondas de radio de ultra alta frecuencia son bastante arbitrarios.

Radio frecuencia (RF) u Ondas de Radio se refiere a la porción del espectro electromagnético en el cual las ondas electromagnéticas (menores frecuencias y mayores longitudes de onda, de algunos milímetros a miles de kilómetros) son generadas por una *corriente alterna* (partículas cargadas moviéndose para atrás y para adelante, cambian de dirección o se aceleran) que se introduce en una *antena*. La atmósfera de la Tierra es transparente a longitudes de onda de unos pocos milímetros hasta 20 metros. Las ondas de radio viajan en línea recta, pero son reflejadas por la ionosfera, permitiendo que las ondas viajen alrededor del mundo.

2.2 Orbitales Atómicos (Wardle B, 2009)

Resolviendo la ecuación de onda de Schrödinger se obtiene una serie de funciones matemáticas llamadas funciones de onda, representadas por la letra ψ . El cuadrado de la función de onda ψ^2 , indica la probabilidad de encontrar un electrón en una región específica del espacio, con los orbitales atómicos convenientemente dibujados como superficies de enlace (regiones del espacio donde existe una probabilidad del 90 % de encontrar un electrón dentro de un volumen encerrado).

En este modelo de la Mecánica Cuántica del átomo de hidrogeno, se usan tres números cuánticos para describir un orbital atómico:

- El Número Cuántico Principal, **n**, que puede tener valores de 1, 2, 3, etc., a medida que n se incrementa, el orbital atómico es asociado a energías mayores.
- El Número Cuántico del Momento Angular, **l**, que define la forma del orbital atómico y puede tener valores de 0 a n-1 por cada valor de n. El valor por un orbital en

particular es designado por las letras s, p, d y f, de acuerdo a los valores de 0, 1, 2 y 3 respectivamente.

- El Número Cuántico Magnético, m_l , que describe la orientación del orbital atómico en el espacio y tiene valores que varían entre -1 y +1 pasando por 0.

Para entender cómo los electrones de los átomos se acomodan en los orbitales disponibles, es necesario definir un cuarto número cuántico:

- El Número Cuántico de Espín, m_s , que puede tener dos valores posibles, +1/2 o -1/2. Este valor es interpretado como las dos direcciones en las cuales el electrón puede estar orientado, \uparrow y \downarrow .

El número total de espín, S , de un número de electrones puede ser calculado mediante la suma de los números cuánticos de espín de todos los electrones involucrados, y su estado puede ser especificado por su multiplicidad de espín:

$$S = \sum m_s$$

$$\text{Multiplicidad de espín} = 2S + 1$$

El átomo de helio en su estado fundamental tiene dos electrones apareados en el orbital $1s$ ($1s^2$). Los electrones apareados (de espines opuestos) ocupan el orbital de energía más bajo (el Principio de Exclusión de Pauli prohíbe que dos electrones con el mismo número cuántico de espín estén presentes en el mismo orbital).



$$S = \frac{1}{2} - \frac{1}{2} = 0$$

$$\text{Multiplicidad de espín } (2S + 1) = 1$$

Estas especies se refieren a un estado fundamental singlete y es designado como S_0 .

2.3 Orbitales Moleculares (Wardle B, 2009)

Algunos aspectos de los enlaces en las moléculas son explicados por un modelo llamado Teoría de Orbitales Moleculares. De manera análoga a la utilizada en los orbitales atómicos el modelo de la Mecánica Cuántica es aplicado a las moléculas permitiendo solo ciertos estados de energía que un electrón puede tener. Esos estados cuantizados de energía son descritos usando funciones de onda llamadas orbitales moleculares.

Para poder examinar los orbitales moleculares de la manera más simple, se debe considerar el caso de las moléculas diatómicas. La interacción de las funciones de onda de dos orbitales atómicos idénticos, da lugar a funciones de onda distintas de los orbitales moleculares de la molécula (figura 3).

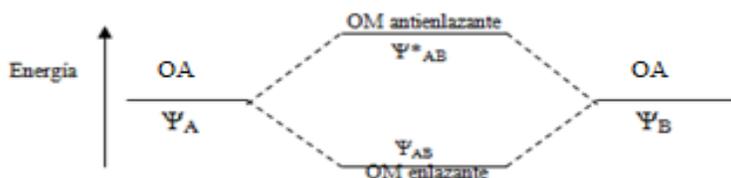


Figura 3. Formación de orbitales moleculares (OM) por la interacción de dos orbitales atómicos (OA) idénticos.

Los **orbitales moleculares enlazantes** de menor energía son el resultado de la combinación de dos funciones de onda de igual simetría y similar energía. Los átomos se mantienen unidos por la atracción entre el núcleo y los electrones en los orbitales moleculares enlazantes, y $\psi_{AB} = \psi_A + \psi_B$.

Los **orbitales moleculares antienlazantes** poseen mayor energía, y se forman cuando las funciones de onda de los dos orbitales atómicos se cancelan en la región del núcleo (simetría opuesta), repeliendo los electrones desde la región donde $\psi^*_{AB} = \psi_A - \psi_B$. Los orbitales moleculares antienlazantes por lo tanto representan una situación que tiende a separar los átomos antes de mantenerlos enlazados.

Si los dos orbitales atómicos son orbitales s, los orbitales moleculares resultantes se denominan σ (sigma) al orbital molecular enlazante, y σ^* al orbital molecular antienlazante (figura 4).

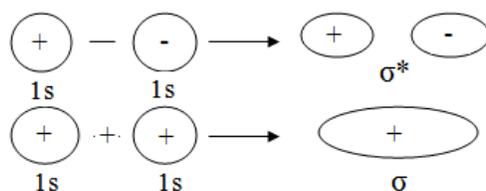


Figura 4. Superficie de enlace del orbital enlazante σ y antienlazante σ^* .

Los orbitales moleculares formados por la mezcla de dos orbitales p paralelos son llamados π (pi) si es enlazante y π^* si es antienlazante (figura 5).

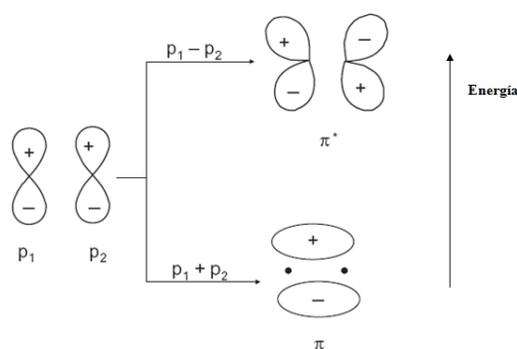


Figura 5. Superficies de enlaces de los orbitales π (enlazante) y π^* (antienlazante).

Adicionalmente a los orbitales moleculares enlazantes y antienlazantes es necesario considerar los orbitales moleculares no enlazantes (**n**). Estos orbitales contienen pares de electrones que no son enlazantes ni antienlazantes por lo tanto no forman parte del enlace entre dos átomos, y están localizados en solo un átomo. Los orbitales no enlazantes generalmente tiene una energía mayor que los orbitales enlazantes.

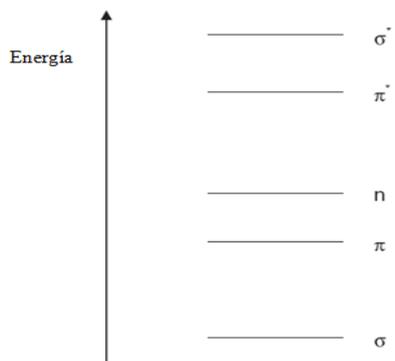


Figura 6. Representación esquemática de las energías de los orbitales moleculares en las moléculas orgánicas.

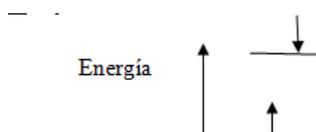
2.4 Absorción de la luz

2.4.1 Estados electrónicos excitados (Wardle B, 2009)

La excitación electrónica puede promover uno de los electrones del orbital 1s a un orbital de mayor energía, por lo tanto, un electrón se mantiene en el orbital 1s y el otro se encuentra en un orbital de mayor energía. Esta excitación resulta en la formación de un átomo de helio electrónicamente excitado.

En el estado de excitación pueden existir dos posibilidades de configuración de espín:

1. Los dos electrones tienen espines opuestos:

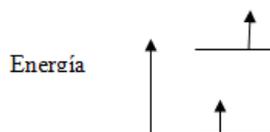


$$S = \frac{1}{2} - \frac{1}{2} = 0$$

$$\text{Multiplicidad de espín} = (2S + 1) = 1$$

Dicha especie se refiere a un **estado excitado singlete**.

2. Los dos electrones con la misma configuración de espín:



$$S = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} = 1$$

$$\text{Multiplicidad de spin} (2S + 1) = 3$$

En este caso se refiere a un **estado excitado triplete**.

El estado fundamental singlete se designa como S_0 con S_1, S_2, \dots usados para designar estados singletes excitados de mayor energía. Similarmente T_1, T_2, \dots son usadas para designar los estados triplete excitados con incremento de energía.

Las propiedades físicas y químicas de las moléculas son determinadas por la distribución electrónica dentro de las moléculas. Sin tomar en cuenta la configuración de espín de las moléculas, las siguientes ideas son las más importantes:

- Un estado excitado triplete siempre tiene menos energía que su correspondiente estado excitado singlete. Esto encaja en las *Reglas de Hund*: cuando dos electrones desapareados ocupan diferentes orbitales, hay menor energía de repulsión entre ellos que cuando están apareados.

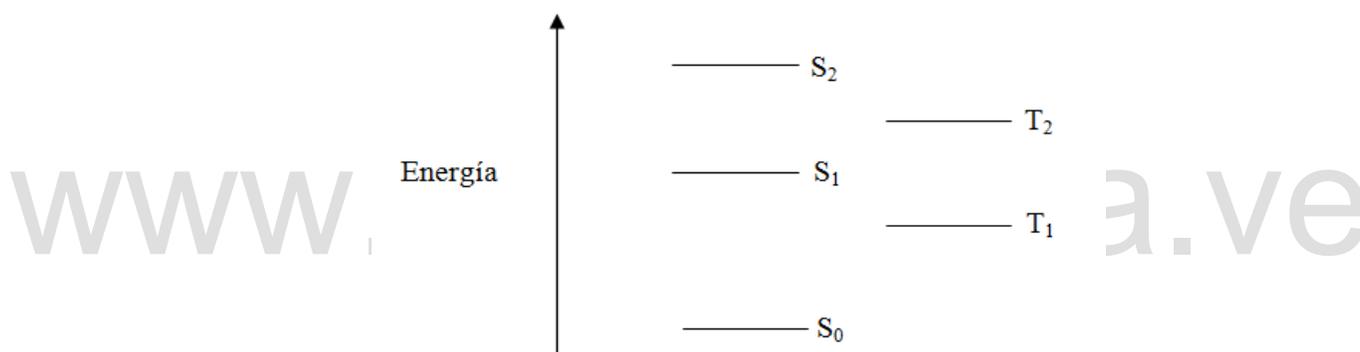


Figura 7. Representación de las diferencias de energías de los estados electrónicos.

- Cuando una molécula en su estado fundamental es excitada, existe una tendencia de mantener la multiplicidad de spin. Las transiciones $S_0 \rightarrow T_1$ son llamadas transiciones prohibidas; esto es, pueden ocurrir pero son mucho menos probables que las transiciones $S_0 \rightarrow S_1$. Los estados excitados triplete son generalmente transformados al estado siguiente del S_1 solo si la molécula o el medio favorece el proceso de cruce entre sistemas, donde una molécula en el estado S_1 es convertida a un estado triplete.

2.4.2 Transiciones electrónicas (Contreras R, 2007).

Usando la teoría de orbitales moleculares para discutir la absorción de la luz de moléculas orgánicas, nos concentramos en dos orbitales moleculares en particular. El Orbital Molecular Ocupado de Mayor Energía (HOMO, por sus siglas en inglés) que es el orbital molecular de mayor energía en el estado fundamental de la molécula con electrones en él, y el Orbital Molecular Desocupado de Menor Energía (LUMO) que es el orbital molecular de menor energía sin electrones en él. Por lo tanto la transición de menor energía en una molécula orgánica sería la transición HOMO \rightarrow LUMO (figura 8).

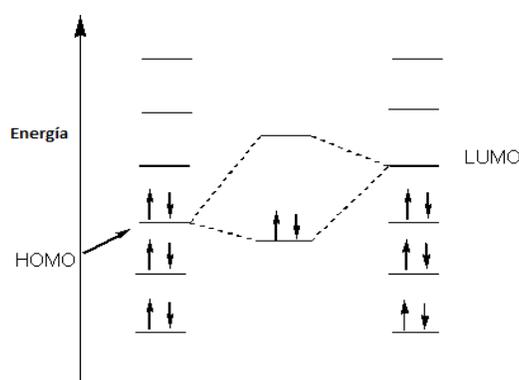


Figura 8. Representación de los orbitales involucrados en la absorción de luz, transición HOMO \rightarrow LUMO.

Las bandas de absorción en moléculas orgánicas son el resultado de transiciones entre orbitales moleculares.

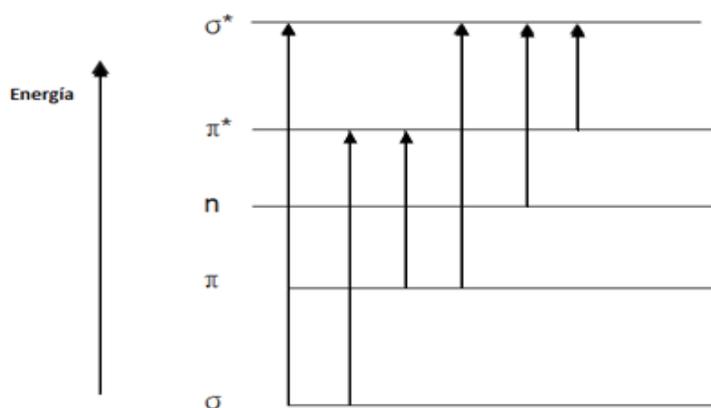


Figura 9. Representación de los niveles de energía de los orbitales moleculares y de las transiciones electrónicas posibles entre ellos.

La figura 9 muestra que existen, en principio, seis tipos de transiciones electrónicas, designadas $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\sigma \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$ y $n \rightarrow \pi^*$. La transición $\sigma \rightarrow \sigma^*$, corresponde a la absorción en el ultravioleta lejano, $\sigma \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \sigma^*$ se ocultan tras las $\pi \rightarrow \pi^*$ que tienen absorciones más fuertes. De las transiciones electrónicas más estudiadas en la fotoquímica orgánica, son las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y las $n \rightarrow \pi^*$ las que producen estados electrónicos excitados $\pi\pi^*$ y $n\pi^*$ respectivamente.

2.4.3 Ley de Lambert-Beer (Wardle B, 2009)

El grado de absorción de luz, varía notablemente de una sustancia a otra, la probabilidad de absorción viene indicada por el coeficiente de absorción molar (ϵ). Cuando la luz es absorbida, la intensidad de luz que entra en la sustancia, I_0 es mayor que la intensidad de la luz emitida, I_1 , y existe una relación exponencial entre la absorción relativa (I_0/I_1) y la concentración (C) y el camino óptico (l) de la sustancia absorbente:

$$I_0/I_1 = 10^{-\epsilon Cl}$$

Tomando logaritmo en base 10 obtenemos

$$\text{Log}(I_0/I_1) = -\epsilon Cl$$

Por lo tanto:

$$-\text{Log}(I_0/I_1) = \epsilon Cl$$

El lado izquierdo de la ecuación es la absorbancia, A , y la relación lineal entre la absorbancia, concentración y camino óptico es conocida como la Ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon Cl$$

La ley de Lambert-Beer puede ser aplicada en todos los casos, excepto cuando la intensidad de la luz de irradiación es muy alta, como cuando se usan láseres. En estos casos, una proporción considerable de la especie irradiada estará en estado excitado y no en estado fundamental.

Ya que $A = \epsilon Cl$

$$\epsilon = A/Cl \quad (2)$$

Las unidades de ϵ utilizadas seria: $\text{cm}^{-1} (\text{mol L}^{-1})^{-1} = \text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Para una sustancia dada, el coeficiente de absorción molar varia con la longitud de onda de luz utilizada, Una gráfica de ϵ (o $\log \epsilon$) vs la longitud de onda, es llamado el espectro de absorción de una sustancia. El uso principal del espectro de absorción desde el punto de vista fotoquímico es que éste provee información sobre a qué longitud de onda $\lambda_{\text{máx}}$ un compuesto tiene su máximo valor del coeficiente de absorción molar ($\epsilon_{\text{máx}}$), Por esto, la irradiación del compuesto a esta longitud de onda permite la fotoexcitación óptima del compuesto. Adicionalmente, la Ley de Lambert-Beer es frecuentemente utilizada en determinaciones analíticas de concentraciones de las medidas de la absorbancia.

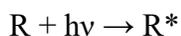
2.5 Fotoquímica.

La fotoquímica estudia el efecto de la energía radiante en las reacciones químicas y de las velocidades y mecanismos de las reacciones iniciadas por la acción de la luz (Vargas & Martinez, 2000).

La producción de estados electrónicamente excitados por la absorción de un fotón es la característica principal de la fotoquímica, y es lo que la separa de las otras ramas de la química.

En algunos casos la excitación electrónica resulta en cambios químicos, como la fotosíntesis en las plantas. En otras ocasiones, los estados electrónicamente excitados pueden resultar en la desactivación por un gran número de procesos fotofísicos, resultando en la emisión de luz (luminiscencia) o la conversión del exceso de energía en calor, de cualquier manera el estado fundamental de la molécula se transforma. Los estados electrónicamente excitados pueden también interactuar con moléculas en su estado fundamental, resultando en la transferencia de energía o reacciones de transferencia de electrones (Wardle B, 2009).

Todos los procesos fotoquímicos y fotofísicos son iniciados por la absorción de un fotón de luz visible o ultravioleta dando como resultado la formación de un estado electrónicamente excitado.



Para una interacción efectiva entre el fotón y el material absorbente se debe cumplir:

- Debe haber una correspondencia entre la energía del fotón y la energía de los niveles electrónicos del par de electrones en el absorbente.
- La absorción más fuerte ocurre cuando la función de onda inicial y final (ψ y ψ^*) se asemejan más entre sí.

2.6 Leyes de la Fotoquímica (Vargas & Martínez, 2000)

Existen dos principios fundamentales o leyes relacionadas con la absorción de la luz que son la base para el entendimiento de las transformaciones fotoquímicas.

a) Principio de la Activación Fotoquímica o Primera Ley de la Fotoquímica:

Enunciada por T. Von Grotthus en 1817. Según ella “sólo aquellas radiaciones absorbidas por un sistema son efectivas para conducir a una reacción fotoquímica”. La ley de Grotthus fue más tarde, en 1843, completada por J.W. Draper, y por ello también es conocida como Ley de Grotthus-Draper. Este último descubrió que “**la velocidad de una reacción es proporcional a la intensidad de la luz que provoca**”. Además, esta ley es la que explica que la determinación del espectro de absorción sea el primer paso que se debe dar en el estudio fotoquímico de una molécula, puesto que de esta manera se puede saber que longitudes de onda son capaces de producir una reacción química.

b) Principio de la Activación por Fotones, Ley de la Equivalencia Fotoquímica o Segunda Ley de la Fotoquímica:

Enunciada por Albert Einstein (1912-1913). Según ella, “cada molécula activada por la luz sólo requiere la absorción de un cuanto de luz o fotón ($h\nu$) para que pueda ocurrir el proceso fotoquímico”. Es decir, hay una correspondencia uno a uno en moléculas excitadas/fotones absorbidos.

2.6.1 Rendimiento cuántico (Zoltan T, 2008)

Los resultados de un proceso fotoquímico se expresan frecuentemente, mediante la Eficiencia Cuántica o el Rendimiento Cuántico de una reacción; éste se define como el número de moles de sustancia absorbente de luz, que reaccionan por cada Einstein (unidad de energía fotoquímica, que indica la cantidad de moles de fotones necesarios para excitar un mol de moléculas, su nombre proviene del autor de la 2^{da} Ley de la Fotoquímica Albert Einstein (Vargas & Martinez, 2000)) de radiación absorbida. Una definición diferente, pero equivalente a la dada, reza que **“el Rendimiento Cuántico es la relación entre el número de moléculas que reaccionan y la cantidad de cuantos de radiación absorbida”**.

Como Einstein enunció en la segunda ley de la fotoquímica, cada molécula es activada por la absorción de un fotón. En consecuencia, es posible afirmar que cada reacción tiene su propio rendimiento cuántico.

El rendimiento cuántico Φ (fi) se puede describir como:

$$\Phi = \frac{\text{N}^\circ \text{ de moles de moléculas que han reaccionado}}{\text{N}^\circ \text{ de Einstein absorbidos}}$$

también:

$$\Phi = \frac{\text{N}^\circ \text{ de moléculas que han reaccionado}}{\text{N}^\circ \text{ de cuantos absorbidos}}$$

De otra manera, si se llama X_i al producto final del proceso primario:

$$\Phi = \frac{\text{N}^\circ \text{ de moléculas de } X_i \text{ producidas}}{\text{N}^\circ \text{ total de fotones absorbidos}}$$

Los rendimientos cuánticos pueden medirse de modo experimental. Para ello hay que determinar por medio de análisis la energía luminosa absorbida, que la da el denominador, y la cantidad de especies X_i formadas. Como las “especies” (tripletes, singletes vibracionales excitados, etc.) son de vidas muy cortas y no identificables normalmente por medios químicos, se emplea frecuentemente, la espectroscopia.

2.7 Secuencias Fotoquímica (Wardle B, 2009)

Una reacción fotoquímica, por su gran complejidad, tiene asociada una gran cantidad de procesos que constituyen una secuencia.

Esta secuencia consta fundamentalmente de tres etapas:

a) *Procesos primarios:*

1.- **Excitación:** Durante esta etapa la molécula absorbe un fotón y se excita. Según las características de la radiación incidente, se puede excitar al primer o segundo estado electrónico excitado.

2.- **Desactivación:** la molécula excitada, por ser inestable, debe desactivarse, y puede hacerlo a través de diversos mecanismos; ya sea por medio de choques con otra u otras moléculas, en los cuales puede sufrir reacción química (procesos fotoquímicos propiamente dichos), o bien, antes de chocar puede experimentar un proceso unimolecular de desactivación, por medio de diferentes mecanismos (simple remisión, fluorescencia, fosforescencia, otros) que reciben el nombre de procesos fotofísicos.

b) *Procesos secundarios:*

3.- Las especies presentes, como consecuencia de las etapas antes descritas, pueden, a su vez, reaccionar entre sí.

2.7.1 Procesos fotoquímicos y fotofísicos

Los estados electrónicamente excitados de las moléculas están dotados de un exceso de energía debido a que se forman por la absorción de un fotón. Estos estados excitados tienen tiempos de vida cortos, perdiendo su exceso de energía en un periodo de tiempo muy corto a través de varios procesos de desactivación y volviendo a su configuración de estado fundamental. Si la molécula regresa a su estado original entonces el proceso de relajación es un proceso físico, pero si se forma una nueva especie molecular entonces el proceso de relajación viene acompañado de un cambio químico.

Los procesos de relajación fotofísicos pueden ser clasificados en (Wardle B, 2009):

Procesos Intramoleculares:

- Transiciones no radiativas de un estado electrónico a otro de energía equivalente.

Estas pueden ocurrir entre estados electrónicos que posean la misma multiplicidad de espín, conocidas como conversión interna, o entre estados electrónicos con diferente multiplicidad de espín, conocidas como cruzamiento entre sistemas.

- Transiciones radiativas, las cuales involucran la emisión de radiación electromagnética por parte de la molécula excitada a medida que regresa a estados energéticos inferiores. La fluorescencia y la fosforescencia son los dos tipos de transiciones radiativas. La fluorescencia constituye la emisión de radiación de un estado excitado con igual multiplicidad de espín que el estado basal ($S_1 \rightarrow S_0$ o $T_1 \rightarrow T_0$). Debido a esto, se consideran transiciones cuánticamente permitidas y son considerablemente rápidas (10^{-12} a 10^{-6} s). Si la multiplicidad del estado excitado difiere de la correspondiente al estado basal ($S_1 \rightarrow T_0$ o $T_1 \rightarrow S_0$), el proceso de emisión se denomina fosforescencia y por su condición cuántica prohibida es relativamente más lento (10^{-6} a 100 s).

Procesos Intermoleculares:

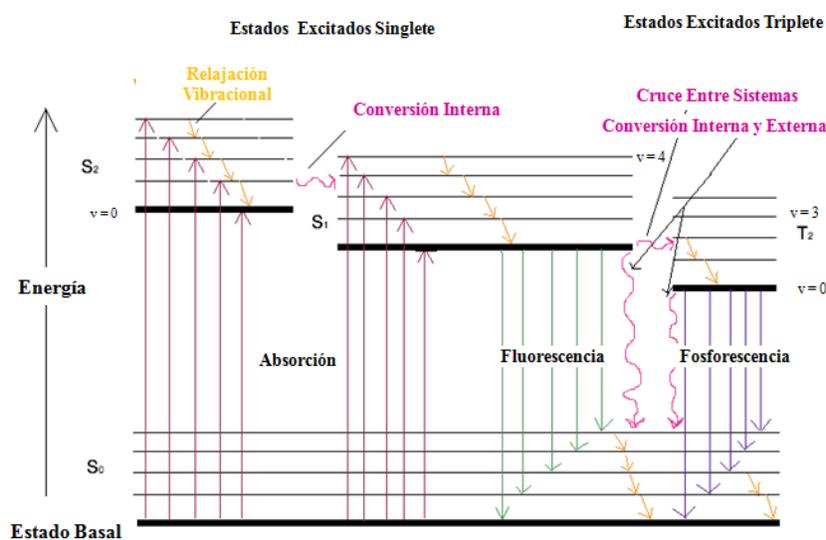
- Relajación vibracional, donde las moléculas que tienen exceso de energía vibracional, colisionan con otras, generando moléculas con niveles vibracionales más bajos de un estado electrónico particular.
- Transferencia de energía entre dos moléculas, en donde el estado electrónicamente excitado de una molécula (donador) es llevado a un estado electrónico más bajo al transferirle energía a otra molécula (aceptor) que a su vez se promueve a un estado electrónico superior. El donador se conoce como sensibilizador y el receptor como “quencher”.
- Transferencia electrónica, en la que una molécula fotoexcitada (donador) interactúa con otra (aceptor) en su estado basal formándose un par de iones que pueden, posteriormente, sufrir una transferencia de electrones resultando en “quenching” del donador excitado.

Como se ha visto hasta ahora, una molécula en estado excitado es capaz de volver a su estado basal por una variedad de rutas, intramoleculares o intermoleculares, que pueden traer como consecuencia una serie de transformaciones químicas conocidas como procesos fotoquímicos. Estos pueden ser de primer orden (monomoleculares) y de segundo orden (bimoleculares).

Tabla 1. Tipos de procesos fotoquímicos.

| Clase | Reacción |
|---|--|
| MONOMOLECULARES | |
| 1.- Disociación en Radicales libre | $A \rightarrow B\cdot + C\cdot$ |
| 2.- Disociación en moléculas | $A \rightarrow B + C$ |
| 3.- Isomerización | $ABC \rightarrow ABC$ |
| 4.- Fotoionización | $A \rightarrow A^+ + e^-$ |
| 5.- Transferencia interna de electrones | $AB \rightarrow A^+ + B^-$ |
| BIMOLECULARES | |
| 1.- Abstracción de hidrógeno | $A + RH \rightarrow AH\cdot + R\cdot$ |
| 2.- Fotoadición (p. ej., dimerización) | $AB + AB \rightarrow (AB)_2$ |
| 3.- Transferencia externa de electrones | $A + D \rightarrow A^+ + D^-$ (o $A^- + D^+$) |

Las propiedades de los estados excitados y su relajación son convenientemente representadas por el diagrama de Jablonski.

**Figura 10.** Diagrama de Jablonski.

El diagrama de Jablonski muestra (Wardle B, 2009):

- Los estados electrónicos de una molécula y sus energías relativas. Los estados electrónicos singletes son denotados como S₀, S₁, S₂, etc. y los estados electrónicos triplete como T₀, T₁, T₂, etc.

- Los niveles vibracionales asociados a cada estado son denotados como $v = 0$, $v = 1$, $v = 2$, etc. en orden creciente de energía.
- Las transiciones radiativas se representan como flechas rectas y las no radiativas como flechas onduladas.
- Si un estado electrónicamente excitado se forma como una molécula excitada “vibrationally-hot” ($v > 0$), entonces ocurrirá la relajación vibracional del nivel de energía electrónico hasta que alcance $v = 0$. La relajación vibracional de cada nivel electrónicamente excitado se representa como una flecha vertical ondulada.
- Las transiciones no radiativas (cruce entre sistemas y conversión interna) entre los estados electrónicos son procesos isoenergéticos y se representan como flechas onduladas desde el nivel $v = 0$ del estado inicial hasta un nivel “electronically-hot” ($v > 0$) del estado final.

La diferencia de energía entre los estados excitados para cada multiplicidad, es menor que la existente entre el estado fundamental (S_0) y el primer estado excitado. Esto da lugar, a que los estados vibracionales más altos de los estados electrónicos excitados, tengan energía similar, a la de los estados vibracionales más bajos de los estados electrónicos excitados más altos. Por ejemplo, como se nota en la figura 10, el nivel $v = 3$ del S_1 tiene energía similar al nivel $v = 0$ de S_2

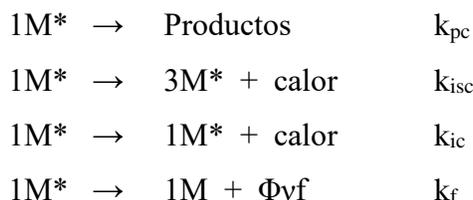
2.8 Cinética de los procesos fotofísicos y fotoquímicos (Zoltan T, 2008)

En términos cinéticos, cuando una molécula orgánica M es excitada, ésta generalmente pasa a un estado excitado singlete



Donde k_{ex} es la intensidad dependiente de la velocidad de excitación. El estado singlete excitado M^* , puede descomponerse, como se mencionó anteriormente, mediante varios procesos independientes, tanto de forma intramolecular como intermolecular, siendo los procesos intramoleculares los que llevan a procesos fotoquímicos, con una constante de velocidad k_{pc} , los cruzamientos entre sistemas con una constante de velocidad k_{isc} , las conversiones internas con k_{ic} como constante de velocidad y por fluorescencia k_f .

Las vías por las cuales puede ocurrir la descomposición de dicha molécula excitada, pueden ser representadas por los siguientes procesos:



En un esquema cinético común, estos procesos son independientes y el estado singlete decae exponencialmente con una constante de velocidad expresada como:

$$k_s = k_{pc} + k_{isc} + k_{ic} + k_f$$

La cual, es el inverso de la medida del tiempo de vida fluorescente. El estado triplete es entonces, generado directamente por los procesos de cruzamiento entre sistemas. El rendimiento cuántico Φ_T para la producción del estado triplete en este esquema viene dado por:

$$\Phi_T = \frac{k_{isc}}{k_s}$$

Dependiendo de la frecuencia de la radiación incidente y del estado inicial en el estado de absorción logrado en el evento inicial, pueden encontrarse múltiples estados vibracionales asociados con el primer estado electrónico excitado (S_1) o con el estado singlete superior (S_n). Los procesos de desactivación no radiantes, los cuales tienen valores de constante de velocidades muy altas, compiten con el cruzamiento entre sistemas y con la fotoquímica de los estados singletes altamente excitados.

Con el diagrama de Jablonski, mostrado en la figura 11, es posible explicar de manera cinética los procesos (descritos anteriormente) que sufre una molécula cuando absorbe un fotón de luz.

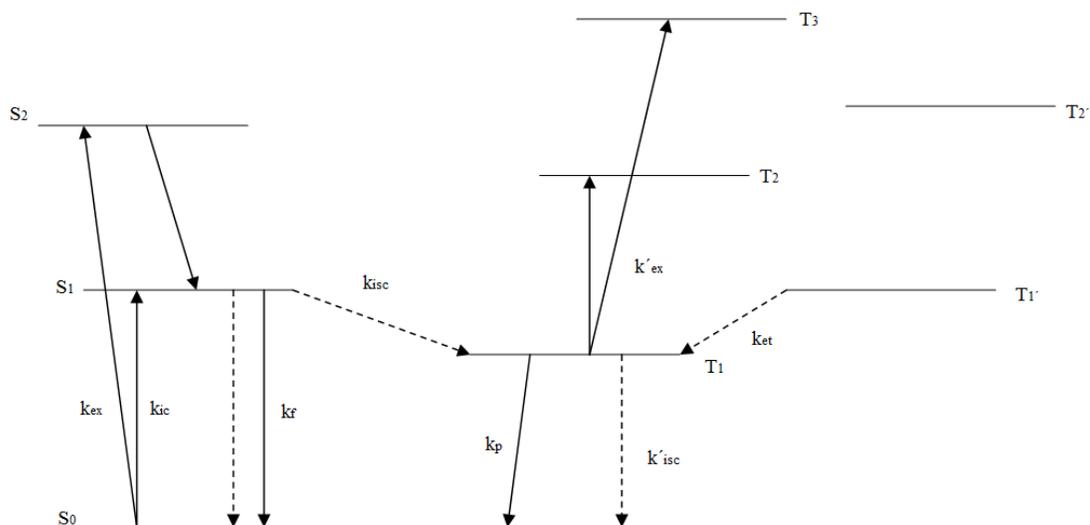
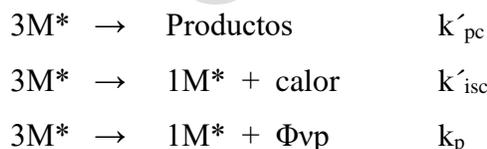


Figura 11. Diagrama de Jablonski en función de las constantes de velocidad entre los procesos de los estados electrónicos.

La figura 11 muestra una ilustración de los canales de desintegración disponibles en los estados tripletes. Los estados tripletes antes formados, pueden sufrir procesos similares a los sufridos por los estados singletes. Los procesos intramoleculares son entonces fotoquímicos con una constante de velocidad k'_{pc} , un cruzamiento entre sistemas k'_{isc} , y una fosforescencia, k_p .



La desintegración intramolecular usualmente observada, es exponencial y tiene una constante de velocidad definida por:

$$k_s = k'_{pc} + k'_{isc} + k_p$$

2.9 Quinolonas

Las quinolonas son antimicrobianos de amplio uso en la actualidad, debido a su gran eficacia clínica en el tratamiento de infecciones en el tracto respiratorio, urinario, tejidos blandos y enfermedades de transmisión sexual (Fernandez E, 2005). Son compuestos que presentan una alta fotolabilidad, alta actividad antibacteriana, pero que presentan poca fotoestabilidad.

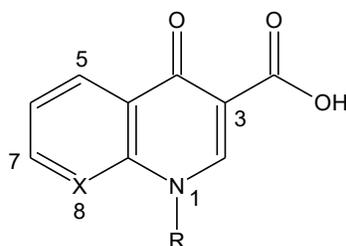


Figura 12. Estructura general de las quinolonas.

Durante los años ochenta, se introdujo un átomo de flúor en la posición 6 y un anillo de piperazina en el carbono 7, originándose nuevas estructuras (6, 7, 9 y 10 de la figura 13), las cuales presentaron mejoras tanto en actividad biológica como en propiedades farmacocinéticas (buena absorción oral y amplia distribución tisular); convirtiendo a esta generación de quinolonas en fármacos de primera línea frente a numerosas infecciones y constituyendo un nuevo grupo de agentes antimicrobianos llamados piperazinil fluoroquinolonas o simplemente fluoroquinolonas (Leyva S, 2008).

Los antibióticos quinolonas que contienen flúor como sustituyente son comúnmente llamados fluoroquinolonas, la gran actividad terapéutica que presentan estos compuestos, han alentado al desarrollo de tres generaciones de FQ. El compuesto químico de partida es el ácido nalidíxico, Algunos derivados mantienen el núcleo naftiridinocarboxílico, pero en otras es reemplazado por el ácido quinolinecarboxílico, en ambos casos el núcleo es substituido con átomos de halógeno en 2 o más posiciones tal como en la lomefloxacin (Quintero B, 2000).

En años recientes casi todas las quinolonas usadas como agentes antibacterianos, tanto los de la primera generación (1, 2, 3 de la figura 13) como los de la segunda (4, 5, 6, etc., de la misma figura) han mostrado un alto índice de fototoxicidad. Se ha estudiado la fotoestabilidad y las actividades biológicas de éstos compuestos farmacológicos, especialmente los de los análogos flúor-sustituidos.

El máximo de absorbancia de este tipo de compuestos, que corresponde a la transición $n \rightarrow \pi^*$ del grupo carbonilo, se encuentra localizado entre 265 y 285 nm. Una segunda banda menos intensa pero significativa se observa entre 320 y 420 nm y todos estos compuestos muestran una moderada fluorescencia entre 370 y 418 nm cuando son excitados a su máxima

absorbancia. Estas características espectroscópicas han sido útiles en los estudios de las cinéticas de fotodegradación (Vargas, Rivas, Fernandez, Florez, & Padrón, 2006).

En general las quinolonas sufren pérdida del grupo carbonilo como paso principal de su fotodegradación (Vargas, Rivas, & Machado, 1991). En el caso del ácido pipemídico (2), norfloxacin (6), ciprofloxacina (7) y lomefloxacina (10) (ver figura 13) la decarboxilación puede favorecerse por la influencia del par de electrones desapareados en el átomo de nitrógeno proporcionando aromaticidad al anillo piperazínico que crea una extensa resonancia por deslocalización.

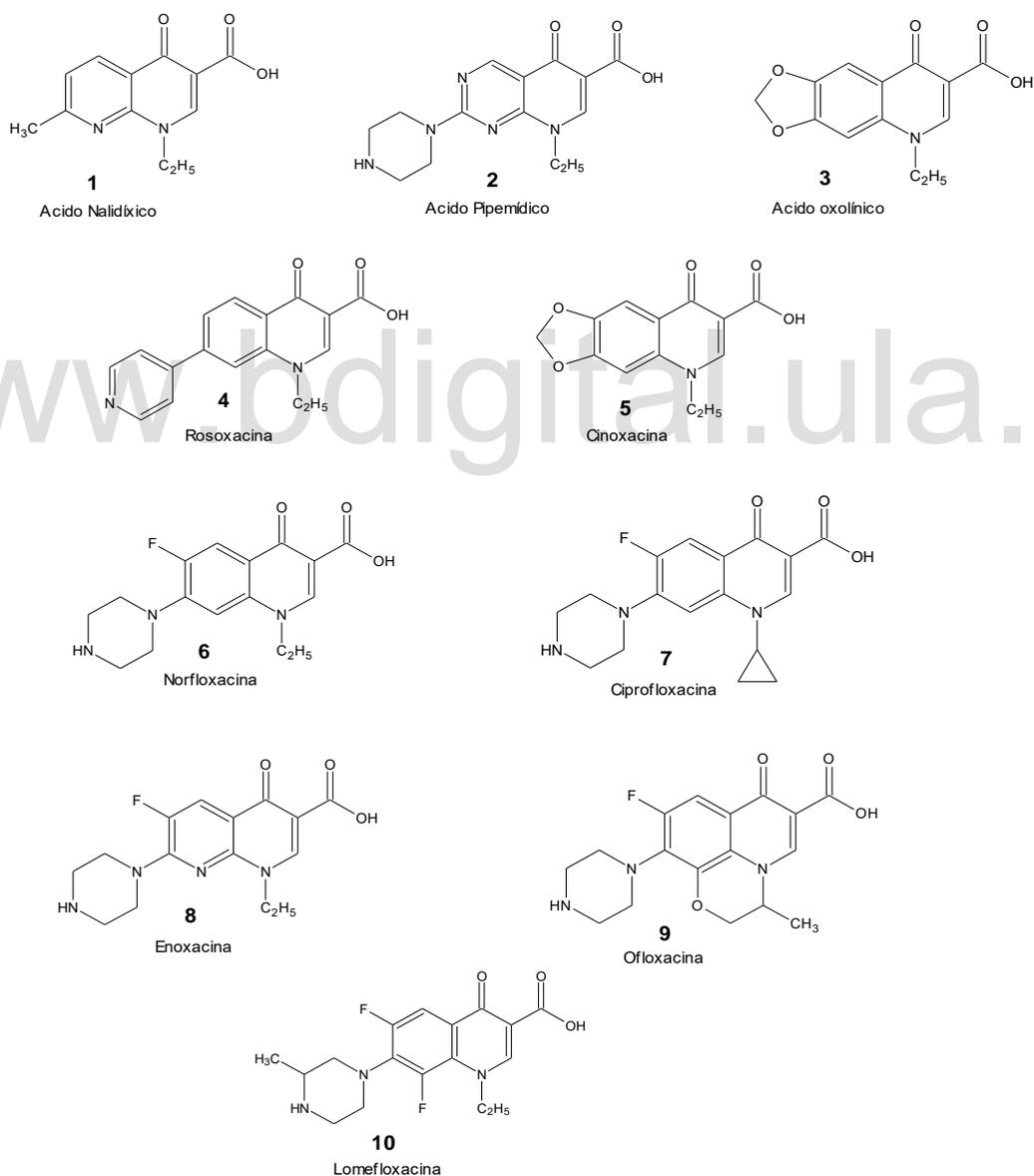


Figura 13. Representación estructural de algunas quinolonas conocidas.

A continuación se muestra en la figura 14 un mecanismo postulado general de la fotólisis de las quinolonas antibacterianas (Vargas, Rivas, Fernandez, Florez, & Padrón, 2006). Es importante resaltar el papel que juega el oxígeno en este proceso. Este es un factor importante en la formación de productos oxigenados y los intermediarios peróxidos involucrados en la actividad fototóxica de estos compuestos.

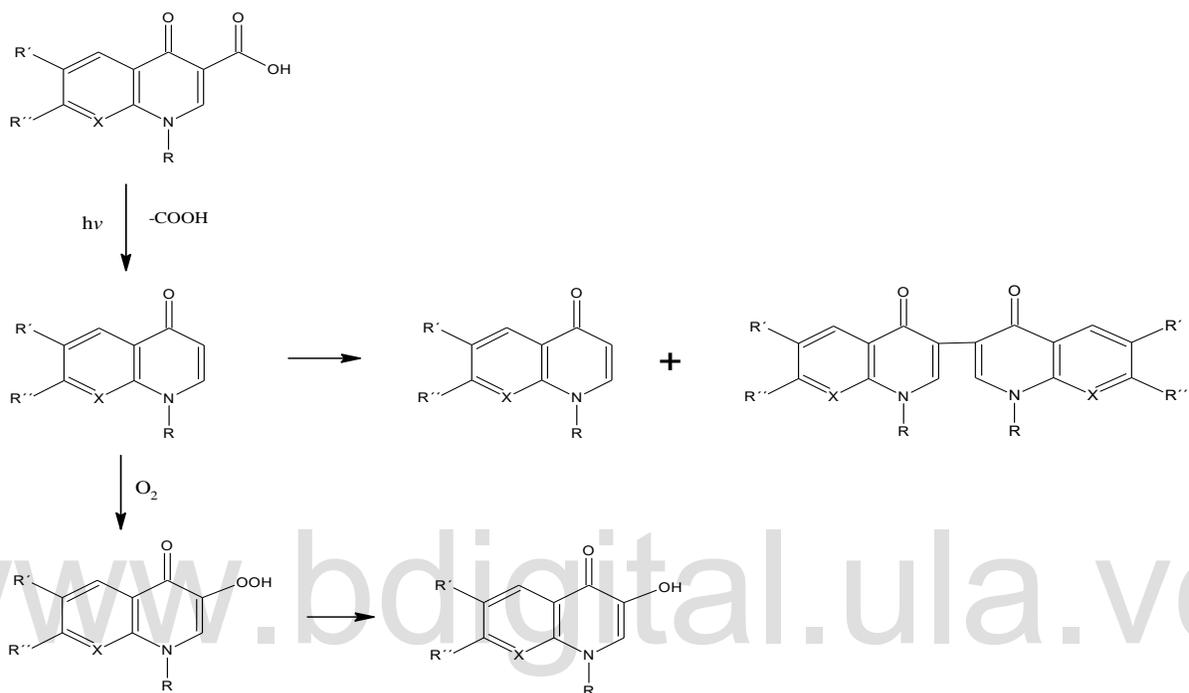


Figura 14. Mecanismo postulado para la fotólisis de las quinolonas.

2.9.1 Reacciones químicas importantes para las propiedades medicinales de las quinolonas (Leyva S, 2008)

- **Quelación**

La estructura de ácidos carboxílicos forman quelatos con iones metálicos, en soluciones que van de condiciones neutras a básicas. La proximidad del grupo carbonilo en la posición 4, origina una fuerte donación electrónica que permite la formación de un anillo (figura 15). La quelación ocurre con iones metálicos como aluminio (III), magnesio (II), calcio (II), hierro (II y III) y cobre (II), originándose complejos insolubles en agua, que pueden interferir en los niveles de sangre del fármaco cuando se ha administrado oralmente. Esto no solamente

produce inconvenientes para la formulación, sino que también se forman interacciones fármaco-alimento o interacciones fármaco-fármaco, que llevan a niveles pobres de quinolona en sangre, particularmente cuando se administra la fluoroquinolona junto con antiácidos, siendo este problema aligerado cuando la administración del medicamento es en un medio ácido.

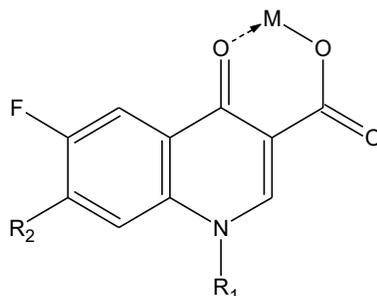


Figura 15. Quelatos de las fluoroquinolonas con metales.

- **Carácter ácido-base (Fasani, Mella, & Albini, 2004).**

La presencia de dos sitios susceptibles de ser protonados en la estructura química influye en las propiedades fisicoquímicas de las quinolonas, como son la solubilidad y el coeficiente de partición del fármaco bajo diferentes condiciones de pH.

Se debe tomar en cuenta que las FQs son aminoácidos y la adición de nucleótidos o bases cambian las formas iónicas presentes (figura 16). La conversión fotoquímica de la lomefloxacin en el compuesto 1 ocurre con un rendimiento cuántico máximo bajo condiciones de pH neutro cuando está presente en su forma zwitteriónica LOM-H, y se mantiene como especie dominante en la reacción bajo un medio ácido (a pesar de que el catión LOM-H₂⁺ esté presente) aunque con una eficiencia menor. Experimentos preliminares demuestran que el flúor también es liberado bajo condiciones de medio básico desde el anión LOM⁻.

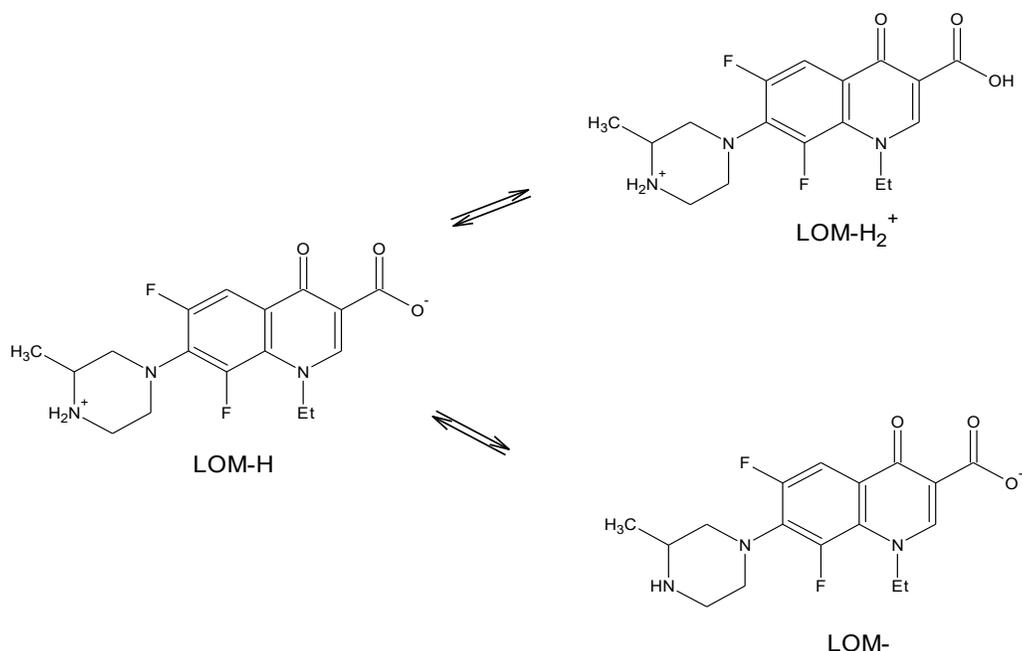


Figura 16. Estructura de la lomefloxacin a diferentes pH.

- **Variaciones estructurales y actividad biológica.**

En general, de los sustituyentes encontrados sobre el nitrógeno del anillo quinolónico, el mejor sustituyente dentro del grupo de los alifáticos es el etilo. Incrementos en la cadena, ramificaciones y grupos polares ocasionan una disminución en la actividad biológica. Las quinolonas con un grupo N-etilo son ligeramente más potentes.

Los estudios de relación estructura-actividad realizados en las fluoroquinolonas han indicado el gran impacto en potencia, espectro, solubilidad, farmacocinética que tiene la naturaleza del sustituyente de la posición 7.

Estudios previos han demostrado que el proceso fotoquímico principal bajo condiciones de pH neutras es la desfluorinación. La presencia de un átomo halógeno en la posición 8 en el anillo central de la quinolona (10) refuerza altamente su carácter fototóxico. Este hecho acoplado a la formación de intermediarios muy reactivos como el catión radical arilo en el proceso de desfluorinación, sugiere que el efecto biológico adverso puede relacionarse a reacciones irreversibles que involucran enlaces covalentes de esta especie a algún componente celular.

- **Fotoquímica de las quinolonas.**

Las fluoroquinolonas presentan un cierto riesgo de provocar reacciones de fototoxicidad, lo que hace recomendable evitar la exposición al sol de los pacientes tratados durante periodos largos. Las primeras quinolonas utilizadas en la práctica clínica, como el ácido nalidíxico, que no contienen un átomo de halógeno sobre C-6 ni una amina heterocíclica sobre C-7, experimentan reacciones como decarboxilación, oxidación y/o dimerización. Muchas quinolonas, particularmente aquellas con sustituyentes halogenados, absorben luz en la región de 350 a 425 nm y son transformadas en estados singletes o tripletes. La distribución de productos en la fotodescomposición depende de las características del medio y de la estructura molecular de la fluoroquinolona.

El daño ocasionado por la fotodegradación de estos compuestos se conoce como fotosensibilidad inducida por drogas o fotosensibilidad medicamentosa.

2.10 Fotosensibilidad inducida por drogas o fotosensibilidad medicamentosa

(Vargas & Martínez, 2000)

Se presume que el daño ocasionado por las drogas fotolábiles ocurre cuando la luz penetra en la piel e interacciona con el principio activo de la droga, generándose como consecuencia, reacciones fotoquímicas en el organismo que dan lugar a sustancias con propiedades tóxicas. Por esta razón los procesos de fotosensibilización son más apreciables a nivel cutáneo, aunque también pueden existir otros efectos adversos no tan visibles, pero potencialmente más perjudiciales en otras zonas del cuerpo, debido a que los fotoproductos de dichas reacciones se distribuyen en el organismo a través del sistema circulatorio, y éstos también podrían ser tóxicos.

Para que una droga produzca daños cutáneos, es necesaria la existencia de ciertas condiciones. En primer lugar, que la droga absorba la luz y genere una especie electrónicamente excitada que pueda causar daños biológicos. Esta condición se ve afectada por algunos factores concernientes a las propiedades ópticas de la piel, la distribución de la droga *in vivo* y su biodisponibilidad; además, la habilidad de producir fotorreacciones o transferencia de energía, la falta de mecanismos de reparación biológica y la metabolización.

Una vez que la luz penetra la piel y alcanza las células que contienen la droga, algunos componentes pueden ser dañados por fotorreacciones, tales como la membrana celular o el ADN localizado en el núcleo.

Las reacciones de fotosensibilidad se dividen en dos grupos:

- a) Reacciones fotoalérgicas
- b) Reacciones fototóxicas. Las cuales a su vez se subdividen en:
Reacciones no fotodinámicas, y reacciones fotodinámicas.

Ambos procesos son capaces de inducir daños en la piel. Sin embargo, existen algunos rasgos característicos de los mismos que los diferencian notablemente.

a) Características de las reacciones fotoalérgicas:

- Luego de la segunda o subsiguientes exposiciones a la radiación proveniente de la luz solar aparece una manifestación alérgica (dos o tres días después de la irradiación) lo cual sugiere que existe un período de incubación.
- Es indispensable la presencia del fotosensibilizador para que la fotoalergia haga su aparición por primera vez.
- La persona afectada puede quedar fotosensibilizada de por vida, es decir, a sucesivas exposiciones a la luz se podría esperar la reacción alérgica sin necesidad de estar presente el xenobiótico.
- Los efectos alérgicos ocurren en zonas no irradiadas y la curación es lenta, pudiendo tardar años.

b) Características de las reacciones fototóxicas:

- La manifestación cutánea ocurre instantáneamente, y aparece independientemente de la presencia de una sustancia exógena.
- En caso de que el fotosensibilizador se encuentre presente, la reacción dependerá directamente de la dosis de la sustancia y de las radiaciones que les sean suministradas al afectado.
- Las dolencias que resultan de estas reacciones, se restringen a la zona irradiada y no hay diseminación de las lesiones.
- Una vez suprimido el fotosensibilizador, desaparece la lesión.

2.10.1 Pruebas para la determinación de fototoxicidad de la droga (Vargas & Martínez, 2000)

La información para la determinación de los mecanismos de fototoxicidad inducida por fármacos, tienen origen en:

- La determinación del rendimiento cuántico de su fotodegradación.
- Elucidación de las especies intermediarias que conllevan a la formación de fotoproductos estables.
- La interacción de su estado excitado con oxígeno, de igual forma un estudio de sus metabolitos.
- El estudio fotoquímico e investigación de la fotolabilidad a la luz de un fármaco.

La fototoxicidad de agentes se puede determinar utilizando modelos *in vitro*. Estos modelos tienen dos funciones: primero, puede proveer un método seleccionado para encontrar la fototoxicidad potencial de sustancias extrañas tales como drogas, materiales de plantas, fragancias, perfumes y constituyentes de cosméticos, antisépticos y otros agentes químicos. Segundo, puede proveer alguna visualización del mecanismo celular envuelto en las reacciones adversas.

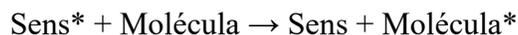
Modelos de ensayos:

- a) Test sobre *Candida albicans*, desarrollado por Daniels.
- b) Test de fotohemólisis.
- c) Oxidación de la histidina.
- d) Fotosensibilización del macrófago del ratón.
- e) Test de fototoxicidad sobre linfocitos y neutrófilos.
- f) Test de asociación a proteínas.

2.11 *Fotosensibilización y fotosensibilizadores (García D, 2005)*

La fotosensibilización supone la generación, mediante absorción de luz, del estado excitado de una molécula, llamada fotosensibilizador, de manera que ésta, durante el tiempo de vida de su estado excitado, sea capaz de ceder o transferir su exceso de energía a otra molécula

presente en el medio circundante, obteniéndose un estado excitado de la misma, una descripción de dicho proceso se muestra a continuación:



La nueva molécula excitada, durante su tiempo de vida, puede reaccionar con otras especies químicas (Q) existentes en el medio, dando lugar a productos de reacción o, en caso de que no lo haga, terminará regresando a su correspondiente estado fundamental tras la liberación de su exceso de energía (ΔE) al medio circundante, representándose esto como:



Es de destacar que los procesos de fotosensibilización se dan generalmente en los estados excitados tripletes del fotosensibilizador.

2.11.1 Mecanismos fotoquímicos (Vargas F, 2002)

El fotosensibilizador, una vez en su estado triplete excitado, puede regresar a su estado fundamental mediante dos mecanismos fotoquímicos, denominados tipo I y tipo II, los cuales se muestran en la figura 17.

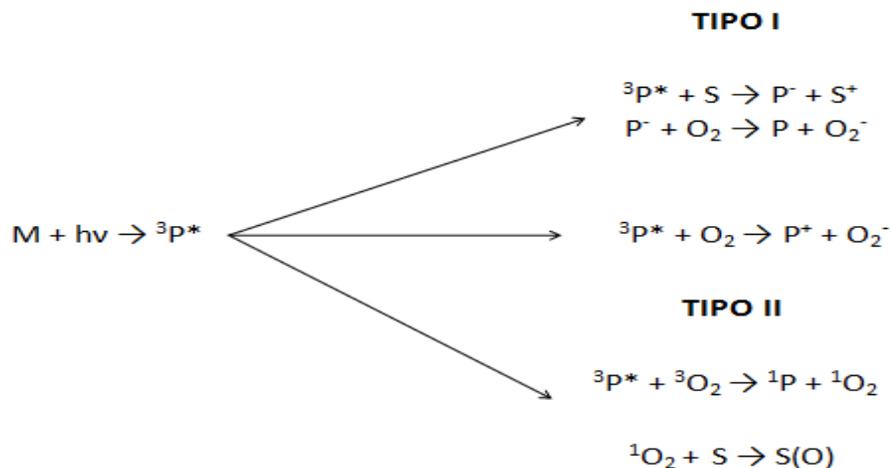


Figura 17. Esquema de los mecanismos fotoquímicos.

Las reacciones tipo I involucran la transferencia directa de electrones (o hidrógenos) del fotosensibilizador al sustrato (o solvente). En medios libres de oxígeno, el fotosensibilizador excitado (PS^*) puede reaccionar directamente con sustratos orgánicos mediante intercambios electrónicos, con la subsecuente formación de sustratos oxidados (S^+) y fotosensibilizadores reducidos (PS^-). En medios con oxígeno presente, la formación del fotosensibilizador reducido puede estar seguida de su reacción con oxígeno molecular para producir especies radicalarias de oxígeno altamente reactivas, tales como aniones superóxido (O_2^-) y radicales hidroxilos (OH^\cdot) entre otras.

Por otra parte, en las reacciones tipo II, las cuales ocurren generalmente en medios altamente oxigenados, se produce una transferencia energética entre el fotosensibilizador excitado ($^3P^*$) y el oxígeno molecular en su estado triplete basal (3O_2), generando una especie excitada altamente reactiva de oxígeno denominada oxígeno singlete (1O_2), el cual puede formar aductos con sustratos orgánicos $[S(O)]$.

Ambos procesos pueden ser competitivos y, dependiendo de las características del fotosensibilizador, un mecanismo puede prevalecer sobre el otro.

2.11.2 Fotosensibilizadores (García D, 2005)

Como se acaba de ver, a la hora de producir oxígeno singlete eficazmente, el método más recomendable, por su simplicidad y rapidez, es la fotosensibilización. Este método requiere la utilización de colorantes, orgánicos o inorgánicos, en general accesibles comercialmente.

2.11.3 Fotogeneración de oxígeno singlete (García D, 2005)

El oxígeno singlete es el estado excitado de menor energía del oxígeno molecular O_2 . El oxígeno en estado fundamental, es decir, con su configuración electrónica de mínima energía, tiene dos electrones desapareados o de espines paralelos, por lo que se trata de un estado de multiplicidad triplete. Por otro lado, su estado excitado de menor energía, el oxígeno singlete (1O_2), posee dos electrones apareados o de espines contrarios y un exceso de energía de $94,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ respecto al estado fundamental, como se muestra en la figura 18 (Bezman, Burtis, TPJ, & Thayer, 1978) (Dahl, 1987).

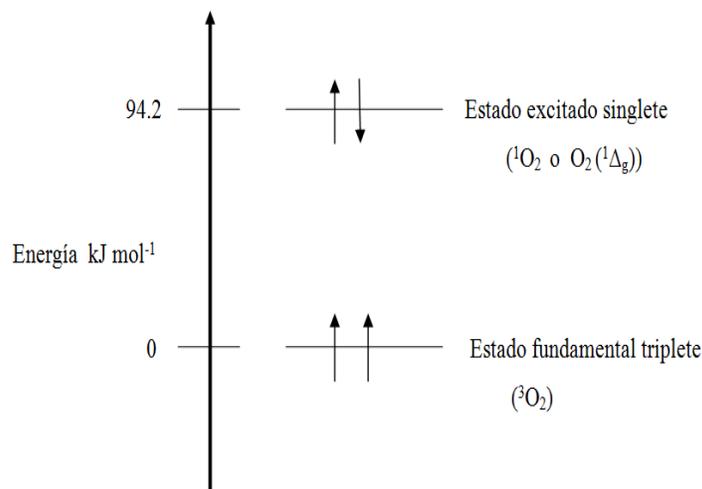


Figura 18. Estado fundamental (triplete) y excitado (singlete) de la molécula de oxígeno.

El oxígeno singlete no se puede generar mediante absorción directa de luz por la molécula de oxígeno, por lo que la fotosensibilización, constituye el método de elección para la preparación de oxígeno singlete. Este método es aplicable tanto a pequeña como a gran escala, puesto que no hace uso de reactivos sofisticados, sino que se requieren colorantes comerciales o de fácil preparación, así como luz visible y no son necesarios montajes experimentales de especial complejidad.

El proceso de fotosensibilización, mediante el cual tiene lugar la fotogeneración de oxígeno singlete, se detalla a continuación (figura 19).

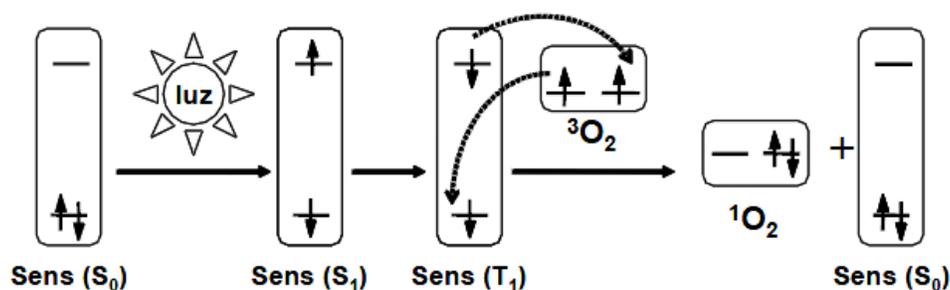


Figura 19. Proceso de fotosensibilización para la fotogeneración de oxígeno singlete.

Podemos describir de forma más detallada el proceso de fotogeneración de oxígeno singlete; inicialmente una molécula de fotosensibilizador absorbe un fotón de luz ultravioleta o visible,

generándose inmediatamente su estado excitado singlete. Dicho estado evoluciona rápidamente hasta un estado excitado triplete más estable y de tiempo de vida más largo, el cual puede colisionar con una molécula de oxígeno en estado fundamental. En dicha colisión, mediante un proceso de transferencia de energía por intercambio electrónico, se genera de nuevo el fotosensibilizador en estado fundamental y oxígeno singlete. En el proceso global el exceso de energía de excitación de la molécula del colorante fotosensibilizador se transfiere al oxígeno presente en el medio, mediante una colisión que ocurre durante el tiempo de vida del estado excitado del fotosensibilizador, resultando así la formación de oxígeno singlete.

Todo el proceso tiene lugar en una millonésima de segundo, aproximadamente, por lo que es extremadamente rápido y puede ocurrir tanto en medios líquidos como en medios gaseosos, siempre que haya un fotosensibilizador, luz y oxígeno presentes en el medio. Además, el proceso es fotocatalítico pues únicamente se consumen luz y oxígeno, ya que el fotosensibilizador se recupera sin modificación alguna al final de proceso.

2.11.4 Requisitos de un fotosensibilizador de oxígeno singlete

Los requisitos que debe poseer todo fotosensibilizador para producir oxígeno singlete eficientemente son los siguientes (Bezman, Burtis, TPJ, & Thayer, 1978):

- Intensa absorción de luz UV-Vis (preferentemente en la región visible entre 400 y 750 nm) con coeficientes de absorción molar (ϵ) superiores a $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.
- Poseer una elevada eficiencia de paso del estado excitado singlete (S_1) al estado excitado triplete (T_1) del fotosensibilizador (Φ_{ISC}), próxima al 100 %, así como una energía del estado triplete (T_1) del fotosensibilizador superior a la del oxígeno singlete ($> 95 \text{ kJ mol}^{-1}$) para que exista una transferencia de energía eficiente desde el fotosensibilizador al oxígeno.
- Largos tiempos de vida del estado excitado (δ), en el orden del μs o superior, con objeto de permitir que haya tiempo suficiente para la colisión entre las moléculas de fotosensibilizador y las moléculas de oxígeno presentes en el medio.
- Alto rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) en distintos medios. El número de eventos que ocurren de producción de oxígeno singlete

dividido por el número de fotones absorbidos por el fotosensibilizador y por unidad de tiempo debe de ser lo más alto posible. En general, los buenos fotosensibilizadores tienen valores de Φ_{Δ} próximos a la unidad.

- Buena estabilidad térmica y fotoquímica. A fin de evitar la descomposición de las moléculas de fotosensibilizador, incluso por el propio oxígeno singlete fotogenerado.
- Capacidad de ser inmovilizados en soportes poliméricos de modo asequible, de cara a facilitar el desarrollo de aplicaciones.

Uno de los grandes inconvenientes, por lo inevitable, que todos los materiales fotosensibilizadores tienden a presentar, a medida que aumenta el tiempo de utilización, es la fotodegradación del fotosensibilizador debida a reacciones de fotodescomposición del mismo, que son competitivas con la fotogeneración de oxígeno singlete. Este efecto provoca disminuciones importantes en el espectro de absorción del fotosensibilizador o en el de reflectancia del material con el tiempo de irradiación. Para minimizar esta limitación hay que usar fotosensibilizadores lo más fotoestables que sea posible y, en el caso de que la fotodegradación provenga de reacciones con el propio oxígeno singlete fotogenerado, utilizar polímeros que sean muy permeables al oxígeno, para facilitar la difusión del oxígeno singlete hacia el medio a tratar (García D, 2005)

2.11.5 Aplicaciones de los fotosensibilizadores

- **Fototerapia clásica y fototerapia dinámica (Vargas & Martínez, 2000)**

La fototerapia, consiste básicamente en el uso de radiación de diferentes longitudes de onda, dependiendo del efecto terapéutico deseado. Este tipo de terapia, es utilizada en un grupo específico de patologías que son de alta incidencia, tomando como ejemplo problemas dérmicos.

En los tratamientos terapéuticos en los que está involucrado el uso de la luz podemos conseguir dos vertientes. La primera conocida como fototerapia clásica, en la cual existe una interacción directa de la fuente de radiación con la zona o tejido afectado. La segunda, conocida como fototerapia dinámica, está basada en la interacción de la luz con moléculas

fotosensibles, previamente administradas al paciente, y que actúan de manera específica con el tejido, siendo esta interacción la responsable directa del tratamiento terapéutico. De esta forma se puede definir la fototerapia dinámica como una modalidad de fototerapia, en la cual se emplean drogas o moléculas xenobióticas activadas por luz.

Se ha descrito que los mecanismos de los procesos fotoquímicos asociados al uso de fotosensibilizadores están íntimamente relacionados con la presencia de oxígeno. De hecho se ha reportado (Mosinger & Micka, 1997), (Korineck, y otros, 2007) que el mecanismo de las reacciones fotodinámicas en solución, incluyen la formación de un estado triplete excitado de la droga (o fotosensibilizador) y una transferencia directa de energía (o electrónica) al oxígeno disuelto en el medio, el cual se encuentra en su estado triplete fundamental, produciéndose así especies altamente oxidantes de oxígeno, siendo éstas las responsables de los efectos terapéuticos.

El uso de fotosensibilizadores (no tóxicos) en la terapia fotodinámica combinada con irradiación de baja intensidad (320-600 nm) en presencia de oxígeno para producir especies citotóxicas, tiene la ventaja de una selectividad dual. Por una parte el fotosensibilizador puede ser dirigido a la célula destino o tejido específico, y además, la irradiación puede dirigirse especialmente a la lesión (Vargas, Rivas, Fernandez, Florez, & Padrón, 2006).

Para los fines de ésta investigación discutiremos sobre uno de los usos específicos de los fotosensibilizadores sobre bacterias.

- **Fototerapia dinámica antibacteriana (Vargas F, 2002)**

La fototerapia dinámica antibacteriana se basa en la utilización de un fotosensibilizador no tóxico que es llevado al sitio de la infección microbiana. Cuando interacciona con el agente patógeno, la iluminación del fotosensibilizador a una longitud de onda adecuada puede llevar a la inactivación del agente patógeno a través de la producción de especies de radicales libres altamente reactivas, que inducen daño oxidativo a los lípidos, proteínas y al ADN/ARN, y/o a la formación de un aducto entre el fotosensibilizador y la bacteria. Actualmente el mayor uso de la terapia fotodinámica antibacteriana es en la desinfección de productos sanguíneos, particularmente en la inactivación de virus, también se han desarrollado protocolos clínicos

basados en esta técnica, por ejemplo para el tratamiento de las infecciones orales. Se ha demostrado que ésta técnica es efectiva en ensayos *in vitro* contra bacterias (incluyendo aquellas que presentan resistencia a las drogas), levaduras, virus y parásitos. Esta terapia es conocida como una terapia de gran potencial y un bajo costo, debido a que el tratamiento se hace localizadamente en el área infectada.

www.bdigital.ula.ve

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Entre 7 quinolonas que se sometieron a estudios, se encontró que la lomefloxacin (LOM) es la segunda fluoroquinolona más tóxica, ésta es activa contra un amplio rango de bacterias gram-positivas y gram-negativas y es usada en el tratamiento de infecciones respiratorias, tracto urinario, articulaciones, piel, boca, oído, nariz, garganta, ojos y en infecciones obstétricas y ginecológicas (Shah, Rathod, Savale, & Patel, 2002).

La LOM absorbe radiación en la región entre 320 y 330 nm, mostrando que cuando es expuesta a la luz UVA se descompone. La fotodescomposición de la droga constituye un importante tema de investigación dado que el proceso de fotodegradación puede resultar en una pérdida de la eficacia de la droga y así como también puede generar efectos adversos debido a la formación de productos fototóxicos de degradación (El-Bary, Soliman, Ali, El-Wahed, & El-Menshawee, 2005).

La fototoxicidad de fluoroquinolonas es inhibida por la adición de catalasa y aumentada por la adición de superóxido dismutasa, esto sugiere que las especies reactivas de oxígeno especialmente el radical hidroxilo, sean las responsables de la fototoxicidad (Araki & Kitahoka, 1998).

La fotoestabilidad de una fluoroquinolona es influenciada por sus sustituyentes, por lo tanto estas moléculas deben poseer características que sean capaces de contrarrestar estos efectos adversos. Luego de muchos estudios se ha demostrado que la incorporación de grupos ésteres aromáticos a estas moléculas aumenta su fotoestabilidad (Vargas, y otros, 2009). En tal sentido, en el Laboratorio de Fotoquímica del IVIC se plantea realizar modificaciones en la estructura de la lomefloxacin, específicamente en el grupo carboxilato, para incrementar su fotoestabilidad y estudiar su actividad antibacteriana fotoinducida.

5. ANTECEDENTES

Las quinolonas han sido el centro de numerosos estudios de interés científico y clínico desde su descubrimiento en la década de los 60. Muchas de las investigaciones se basaban en el potencial de esta clase de droga, en específico el ácido nalidíxico que fue la primera quinolona creada (Andeson & MacGowan, 2003).

Los primeros reportes de los efectos fototóxicos del ácido nalidíxico fueron realizados en 1964, mediante la aparición de recurrentes erupciones en la piel por un paciente que estaba siendo tratado por una infección en el tracto urinario con esta quinolona (Zelickson AS, 1964).

Numerosas investigaciones sobre los efectos adversos en la salud ocasionados por el uso de esta clase de antibacterianas han sido reportadas (Halkin H, 1988) desde la aparición de estos compuestos, así como también la fotoquímica de estos productos, incluyendo estudios que pudieran dar a conocer la estructura de los fotoproductos formados, causantes de estos efectos fototóxicos (Ferguson, Phillips, McEwan, Moreland, & Johnson, 1988).

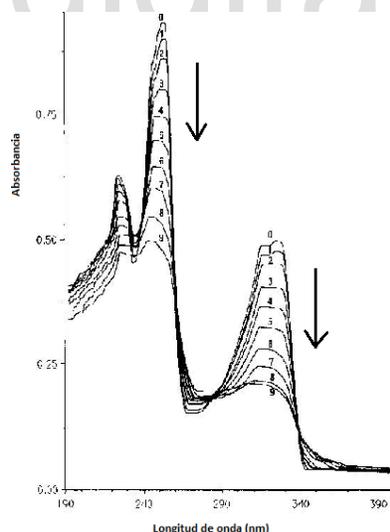


Figura 20. Monitoreo de la fotodegradación del ácido nalidíxico mediante la variación de sus espectros de absorción.

En 1987 se reportó el primer estudio de degradación fotolítica para un compuesto farmacéutico que ya se encontraba en el mercado para ese año, el ibuprofeno (Castell, Gomez, Miranda, & Morera, 1987), siguiendo a ésta, muchas investigaciones sobre los

fármacos que se conocían causaban daños en la salud al ser consumidos y de alguna manera ocurría la exposición a la radiación de la luz.

Vargas y colaboradores (Vargas, Rivas, & Machado, 1991) realizaron la fotodegradación del ácido nalidíxico mediante la observación del cambio en su espectro de absorción cada 20 minutos al ser irradiado durante 24 horas (figura 21).

Para los autores, mediante el cambio observado en el espectro, se puede concluir que el proceso de fotodegradación de la molécula sigue un proceso de decarboxilación. La formación del fotoproducto incluye la reacción del intermediario radical con el oxígeno presente en el medio y el rompimiento del hidropéroxido formado, como se ha sugerido anteriormente en los estudios de las drogas anti-inflamatorias no esteroideas (Castell, Gomez, Miranda, & Morera, 1987) (Bosca, Miranda, & Vargas, 1990).

En la figura 21 se puede observar el mecanismo de decarboxilación propuesto por los autores para la formación del fotoproducto **2** caracterizado.

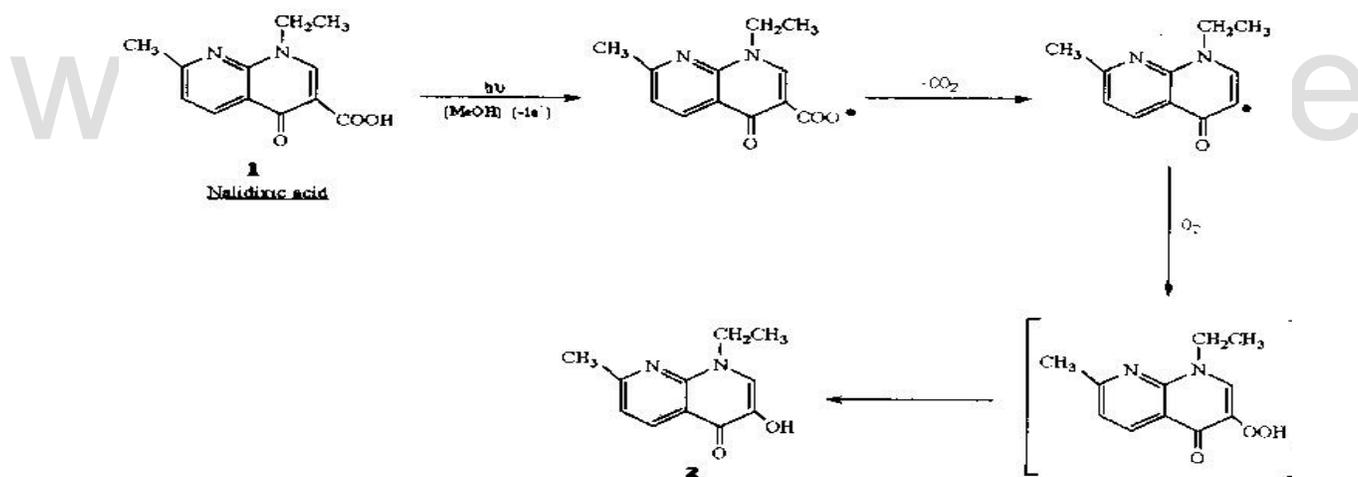


Figura 21. Mecanismo propuesto para la fotodegradación del ácido nalidíxico en medio oxigenado (Vargas, Rivas, & Machado, 1991).

Matsumoto y colaboradores (Matsumoto, Kojima, Nagano, Matsubara, & Yokota, 1992) realizaron un estudio sobre el comportamiento de varias fluoroquinolonas en solución, al ser irradiadas en dosis variables de luz UVA de entre 0,3 y 3 J/cm^2 . Los fotoproductos fueron analizados por HPLC, comprobando un cambio en la estructura de los compuestos de partida y se comprobó que hubo una pérdida de la actividad antibacteriana, acompañada de un incremento en la citotoxicidad.

En ese estudio, la irradiación con luz UVA indujo cambios en los espectros de los antibióticos fluoroquinolonas obtenidos del mercado (figura 22).

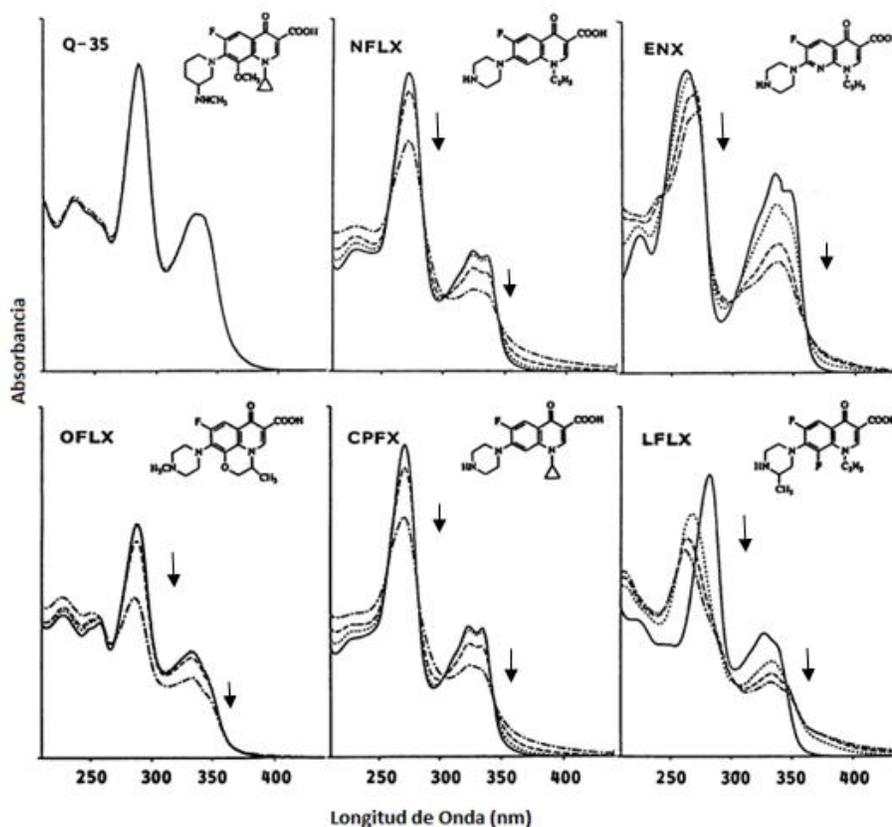


Figura 22. Efecto de la irradiación UVA en algunas fluoroquinolonas conocidas. Una solución conteniendo 20 $\mu\text{g/mL}$ de fluoroquinolonas fue irradiada con UVA y sus espectros tomados a diferentes tiempos de la irradiación.

Con esos estudios, los autores concluyeron que con los cambios en los espectros de absorción mediante la irradiación se puede determinar la transformación, y en este caso la completa degradación de los compuestos de partida.

En el trabajo realizado por Martínez y colaboradores (Martinez, Sik, & Chignell, 1998) se muestra una compilación de los trabajos de fototoxicidad y fotocarcinogenicidad realizados hasta ese año por diferentes autores para demostrar el potencial del daño fototóxico que poseen diferentes quinolonas, mediante diferentes tipos de ensayo *in vivo*.

Tabla 2. Fototoxicidad relativa y potencial fotocarcinogénico/mutagénico de algunas fluoroquinolonas.

| Ensayo | Efecto | Orden de potencial |
|--------------------------------------|-------------------|---|
| Ratón albino | Fototóxico | LOM > ENX, NA > OFLX, CPMX |
| Células 3T3 de ratón albino | Fototóxico | LOM > ENX > CPMX > OFLX |
| Ratón | Fototóxico | LOM > FLER > ENX > NOR, OFLX, CPMX |
| Ratón albino | Fototóxico | LOM > ENX > OFLX, CPMX, NOR |
| Conejillos de Indias | Fototóxico | LOM > ENX > OFLX > NA > NOR > CPMX |
| Humano | Fototóxico | FLER > LOM, PEFX >> CPMX > ENX, NOR, OFLX |
| Skh ratón sin pelo | Fotocarcinogénico | LOM > FLER > OFLX > CPMX, NA |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA 104 | Fotomutagénico | LOM, FLER >> CPMX |

Luego se estudió el rendimiento cuántico de $^1\text{O}_2$ y el efecto quenching de algunas fluoroquinolonas sobre el $^1\text{O}_2$ mediante medidas de luminiscencia a 1.270 nm. Adicionalmente se midió la generación del radical superóxido (O_2^-) mediante resonancia paramagnética electrónica (EPR).

Tabla 3. Rendimientos cuánticos de oxígeno singlete para algunas fluoroquinolonas en PBS a pH 7,5 y en metanol.

| Compuesto‡ | Φ_{Δ}^{**} | Φ_{Δ}^{\dagger} |
|------------------|----------------------|---------------------------|
| FLER | 0,029 | 0,016 |
| LOM | 0,072 | 0,016 |
| PEFX | 0,045 | 0,028 |
| CPMX | 0,092 | 0,040 |
| ENX | 0,061 | 0,009 |
| NOR | 0,081 | 0,017 |
| OFLX | 0,076 | 0,007 |
| CINOXACIN | 0,16 | 0,73 |

** En 50 mM D_2O buffer fosfatado a pH 7,5.

† En metanol.

‡ Ordenados por orden decreciente de fototoxicidad en humanos.

Los autores demostraron que la fotodegradación de los quinolonas estudiadas se ven influenciadas por el medio de reacción tanto por el pH como por la polaridad del solvente que se utilice para el estudio.

En el mismo año, Fasani y colaboradores (Fasani, Profumo, & Albini, 1998) realizaron un estudio sobre la reactividad de cuatro antibióticos fluoroquinolonas para comparar la fotosensibilidad de cada una de ellas, analizando estructuralmente la variación de la fotolabilidad y del potencial fototóxico de los intermediarios, mediante la variación de las condiciones del medio en el que se encontraban las fluoroquinolonas durante la irradiación.

Tabla 4. Comparación entre las propiedades fotoquímicas de algunas fluoroquinolonas.

| Substrato | $\Phi (^1O_2)^{**}$ | $\Phi (F^{\cdot}) \ddagger$ |
|--------------|---------------------|-----------------------------|
| Norfloxacin | 0,081 | 0,0035 |
| Enoxacina | 0,061 | 0,01 |
| Lomefloxacin | 0,072 | 0,38 |
| Ofloxacin | 0,076 | 0,0005 |

** En solución de PBS deuterado, determinado por fosforescencia. † En DMSO, y determinada por EPR

‡ En soluciones de PBS con flujo de argón.

Tabla 5. Fotodescomposición de fluoroquinolonas.

| Substrato | Condiciones ** | | Rendimiento cuántico | % de liberación de flúor† |
|--------------|----------------|-------|----------------------|---------------------------|
| Norfloxacin | Agua | Argón | 0,06 | 100 |
| | | Aire | 0,01 | 98 |
| | Buffer | Argón | 0,0042 | 89 |
| | | Aire | 0,007 | 49 |
| Enoxacina | Agua | Argón | 0,13 | 99 |
| | | Aire | 0,08 | 100 |
| | Buffer | Argón | 0,01 | 100 |
| | | Aire | 0,02 | 73 |
| Lomefloxacin | Agua | Argón | 0,55 | 100 |
| | | Aire | 0,49 | 100 |
| | Buffer | Argón | 0,4 | 95 |
| | | Aire | 0,3 | 80 |
| Ofloxacin | Agua | Argón | 0,0012 | 80 |
| | | Aire | 0,0016 | 87 |
| | Buffer | Argón | 0,0015 | 35 |
| | | Aire | 0,0025 | 50 |

** Buffer= 0,067 M buffer fosfatado pH 7,4. Argón: corriente de argón purificado por 1 hora.

† Porcentaje de liberación de flúor con respecto al reactante.

Los análisis realizados por HPLC a los fotoproductos obtenidos de la irradiación de los dos compuestos (lomefloxacin y su derivado éster) demostraron que la estructura del derivado no varió a lo largo de la irradiación.

En 2006 Ray y colaboradores (Ray, Agrawal, Misra, Farooq, & Hans, 2006) publicaron un trabajo donde se demuestra la influencia de la variación de la longitud de onda incidente sobre la fotogeneración de las especies reactivas de oxígeno singlete y radical superóxido por cuatro diferentes fluoroquinolonas.

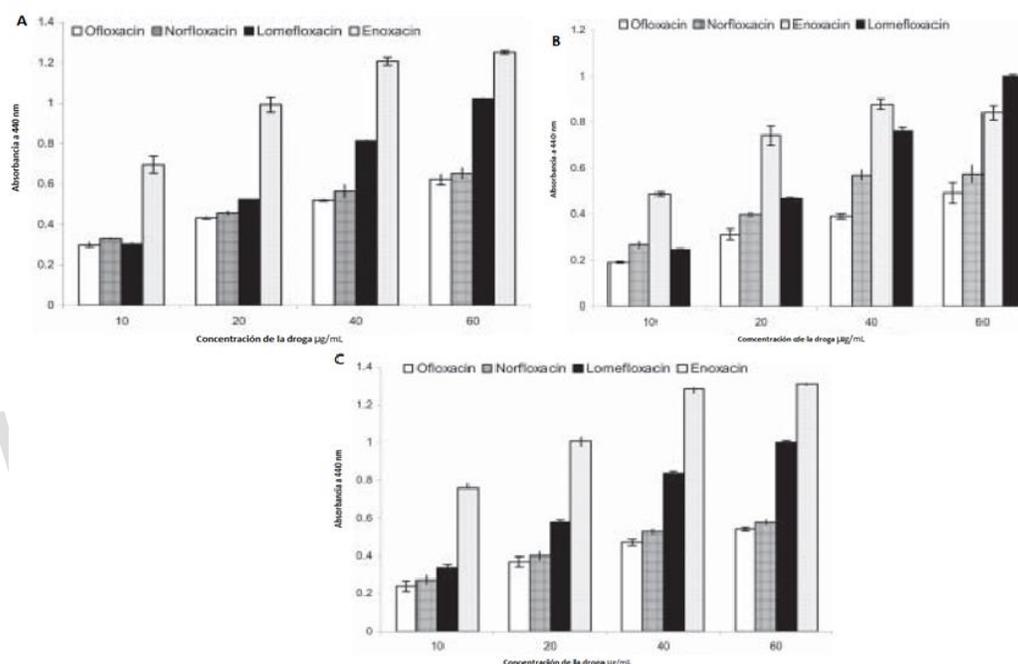


Figura 24. (A) Producción fotoquímica de 1O_2 por algunas fluoroquinolonas al ser irradiadas con UVA. (4,32 J/cm²). (B). Producción fotoquímica de 1O_2 por algunas fluoroquinolonas al ser irradiadas con UVB (2,16 J/cm²). (C) Producción fotoquímica de 1O_2 por algunas fluoroquinolonas al ser irradiadas con luz solar por 60 minutos.

Tabla 7. Porcentaje de 1O_2 generado por diferentes drogas mediante irradiación con UVA, UVB y luz solar con varios quencher.

| Droga (100 $\mu\text{g/mL}$) | <u>UVA (4,32 J/cm²)</u> | | <u>UVB (2,16 J/cm²)</u> | | <u>Luz solar (60 min)</u> | |
|----------------------------------|------------------------------------|-----------------|------------------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|
| | NaN ₃ (10mM) | DABCO (25mM) | NaN ₃ (10mM) | DABCO (25mM) | NaN ₃ (10mM) | DABCO (25mM) |
| Enoxacina | 42,8 | 53,74 | 40,23 | 52,84 | 40,45 | 76,0 |
| Lomefloxacina | 81,33 | 53,7 | 83,2 | 65,25 | 87,0 | 71,7 |
| Ofloxacina | 37,79 | 70,32 | 36,0 | 73,54 | 28,78 | 86,8 |
| Norfloxacina | 36,66 | 83,7 | 36,0 | 82,4 | 37,3 | 89,0 |

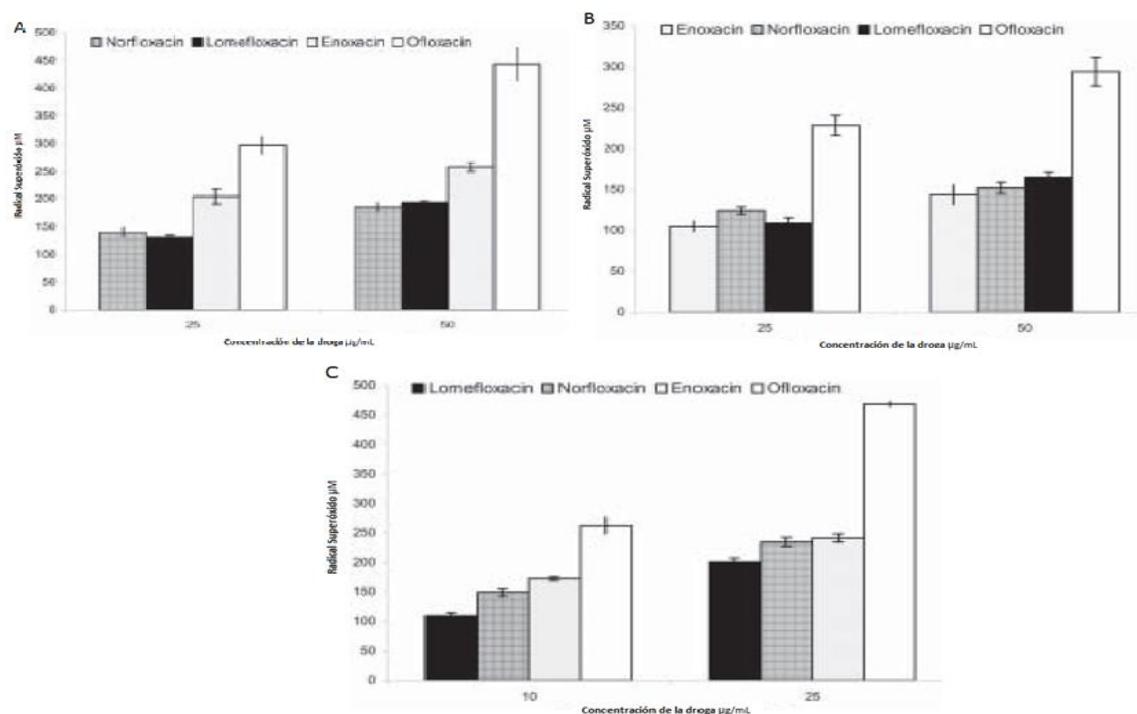


Figura 25. (A) Producción fotoquímica de O_2^- por algunas fluoroquinolonas a diferentes concentraciones al ser irradiadas con UVA. (1,44 J/cm²). (B) Producción fotoquímica de O_2^- por algunas fluoroquinolonas a diferentes concentraciones al ser irradiadas con UVB (0,70 J/cm²). (C) Producción fotoquímica de O_2^- por algunas fluoroquinolonas a diferentes concentraciones al ser irradiadas con luz solar por 20 minutos.

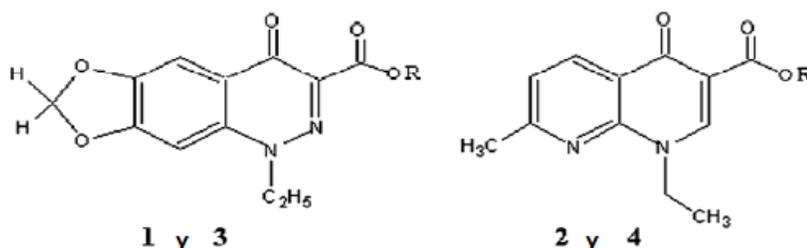
Tabla 8. Porcentaje de generación del anión superóxido mediante irradiación a diferentes longitudes de onda.

| Droga (50 $\mu g/mL$) | UVA (1,44 J/cm ²) | UVB (0,70 J/cm ²) | Luz solar (20 min) |
|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| Enoxacina | 84,8 | 91,0 | 86,3 |
| Lomefloxacina | 78,9 | 78,2 | 85,9 |
| Ofloxacina | 84,7 | 87,2 | 86,37 |
| Norfloxacina | 77,0 | 75,0 | 89,6 |

También se demostró el efecto de diferentes “quenchers” sobre la generación de las diferentes especies reactivas de oxígeno, notando un aumento de la fotogeneración de estas especies en presencia de DABCO (1,4-diazobicyclooctano), este compuesto es un iniciador de radicales libres.

Los autores concluyeron que la exposición a la luz durante el consumo de este tipo de antibióticos debe ser mínimo, ya que los efectos de las especies generadas tienen una fuerte reacción con las biomoléculas del cuerpo.

En el trabajo presentado por Vargas y colaboradores (Vargas, y otros, 2008) se sintetizaron dos derivados éster naftílicos de dos quinolonas conocidas y se determinó su habilidad para generar especies reactivas de oxígeno tales como $^1\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$ y H_2O_2 a través de la fotólisis con luz UVA,



1 y 2 : R = H (Cinoxacina y ácido nalidíxico)

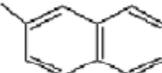
3 y 4 : R = 

Figura 26. Estructuras de las quinolonas estudiadas y sus derivados ésteres naftílicos.

Se realizaron los estudios de fotoestabilidad bajo irradiación de los compuestos sintetizados, mostrando una variación casi imperceptible en los espectros de absorción luego de 2 horas de irradiación con luz UVA.

La generación de cantidades cuantificables de oxígeno singlete, $\cdot\text{OH}$ y H_2O_2 fueron determinada mediante la prueba de la oxidación de la histidina y la quimioluminiscencia del luminol respectivamente.

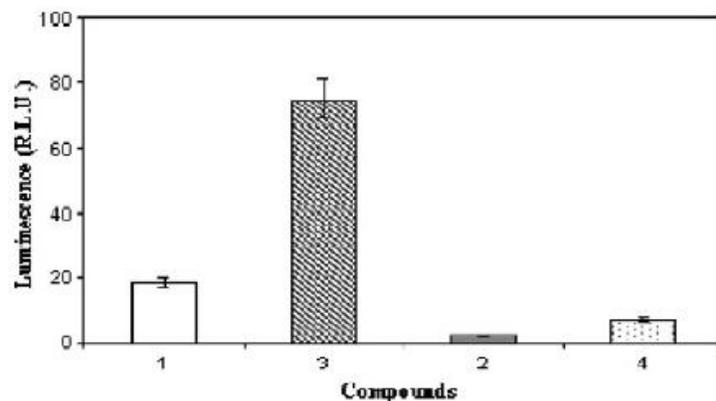


Figura 27. Generación de especies peroxídicas determinadas por quimioluminiscencia.

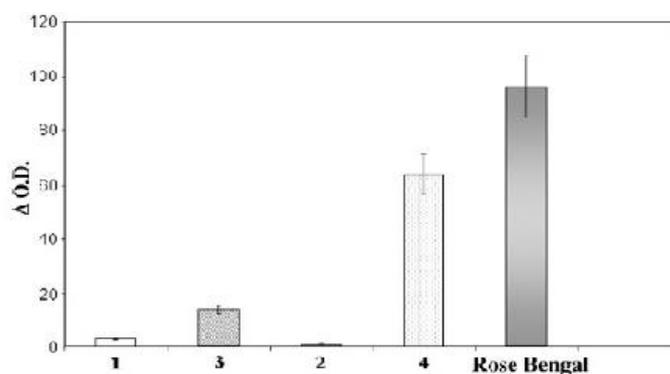


Figura 28. Influencia de la irradiación de los compuestos 1 a 4 en el ensayo de la oxidación de la Histidina a 440 nm. La Rosa de Bengala fue usada como patrón.

Los autores observaron que la habilidad para generar especies peroxídicas de los derivados sintetizados (figura 28) fueron $3 > 4$ (figura 27), en contraste, su habilidad para generar oxígeno singlete (figura 28) fue $4 > 3$, y al ser comparados con los compuestos de partida, se observó un incremento en la generación de ambas especies (figuras 29 y 30).

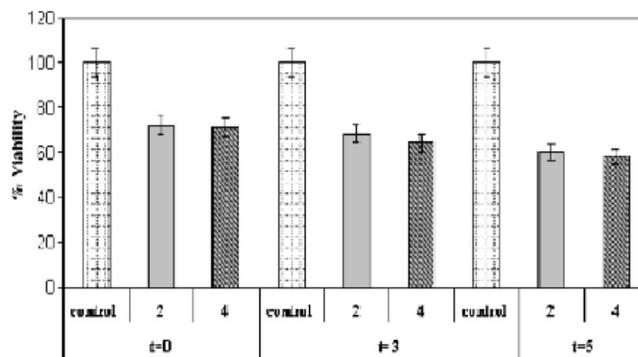


Figura 29. Ensayo de la viabilidad celular microbiana basado en la cuantificación de ATP presente medido por quimioluminiscencia en 5 horas de incubación de la *E. coli* con los compuestos 2 y 4.

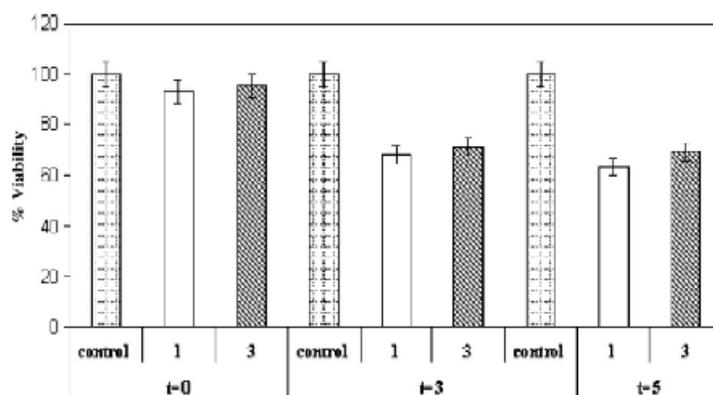


Figura 30. Ensayo de la viabilidad celular microbiana basado en la cuantificación de ATP presente medido por quimioluminiscencia en 5 horas de incubación de la *E. coli* con los compuestos 1 y 3.

Con esta investigación los autores demostraron que los productos sintetizados mostraron mejores capacidades de fotosensibilizadores que los compuestos de partida. La actividad antibacteriana de los compuestos sintetizados sin irradiar y bajo irradiación fueron probados sobre *Escherichia coli* y comparados con los compuestos de partida, observando un aumento en la actividad antibacteriana fotoinducida en la irradiación de los derivados ésteres naftílicos sintetizados.

6. HIPOTESIS PRELIMINAR

“El producto derivado de la reacción de la esterificación de la lomefloxacinina será un compuesto que presente gran estabilidad al ser irradiado con luz UVA y UVB y poseerá actividad antibacteriana fotoinducida de amplio espectro”.

7. OBJETIVOS

7.1 *Objetivo general*

Sintetizar, caracterizar química y fotoquímicamente los ésteres derivados de lomefloxacinina, y estudiar su actividad antibacteriana.

7.2 *Objetivos específicos*

- Sintetizar derivados de Lomefloxacinina mediante la esterificación con alcoholes aromáticos tales como fenol y β -naftol.
- Optimizar diversas variables del método de esterificación validado en el Laboratorio de Fotoquímica del IVIC.
- Caracterizar estructuralmente mediante técnicas espectroscópicas convencionales los derivados obtenidos de la reacción de esterificación ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, I.R y Espectrometría de Masas).
- Estudiar la fotoestabilidad de dichos derivados frente a irradiación UVA y UVB mediante espectrofotometría UV-Visible.
- Determinar el rendimiento cuántico de fluorescencia de estos compuestos esterificados.
- Determinar el rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete de los compuestos sintetizados.
- Determinar la eficiencia de los compuestos sintetizados para producir radicales libres oxigenados
- Estudiar la actividad antibacteriana que poseen los ésteres derivados de Lomefloxacinina frente a la bacteria blanco Escherichia coli (E. coli)

8. PARTE EXPERIMENTAL

7.1 Purificación del Clorhidrato de Lomefloxacin (LOM.HCl) (Fasani, Barberis, Mella, Monit, & Albini, 1999)

Para la obtención de la base libre de Lomefloxacin (LOM-H) se preparó una solución 0,02 M en agua. La fase orgánica fue extraída con 25 mL de cloroformo por cada 50 mL de solución acuosa, repitiéndose la extracción por triplicado.

7.2 Síntesis de los ésteres derivados de Lomefloxacin (Vargas, y otros, 2008)

La síntesis se llevó a cabo modificando el método reportado por Vargas y Colaboradores, mediante la reacción de la Lomefloxacin con Fenol y β -naftol, en medio ácido.

Una solución de Lomefloxacin 0,02 N y el alcohol correspondiente en cloroformo acidificada con HTPSA (Ácido p-toluensulfónico) se sometieron a agitación constante durante 2 días, haciendo pasar Ácido Clorhídrico gaseoso generado in situ mediante la reacción entre el ácido sulfúrico concentrado y Cloruro de sodio en un flujo de argón hasta observar la aparición de un precipitado en la solución.

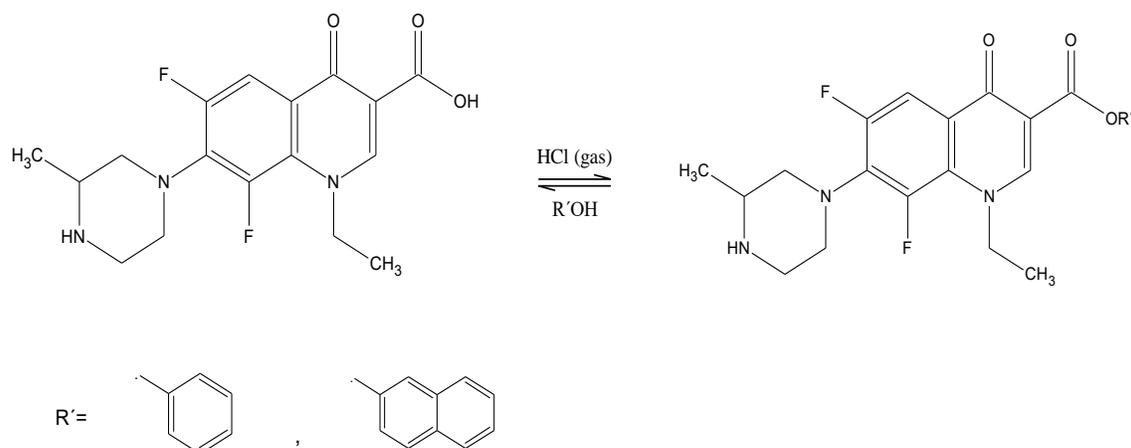


Figura 30. Reacción general de síntesis.

Para la síntesis de los derivados esterificados se optimizaron las condiciones de reacción a través de la modificación de variables experimentales, tales como, la relación estequiométrica de los reactivos de partida, los tiempos de reacción y los solventes empleados. Todas las reacciones se llevaron a cabo bajo condiciones de presión ambiental.

El precipitado obtenido fue lavado con diclorometano y cloroformo. La pureza de los productos fue comprobada por cromatografía de Capa Fina en Sílica gel teniendo como fase móvil una mezcla de cloroformo: metanol 9:1

7.3 *Caracterización mediante técnicas espectroscópicas*

- **Espectroscopia de Absorción en el Infrarrojo (IR-TF).** Los espectros IR se realizaron en un espectrofotómetro con Transformada de Fourier Perkin Elmer, Spectrum 100 Series, todos en estado sólido sobre pastillas de KBr.
- **Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear unidimensional (^1H RMN y ^{13}C RMN) y bidimensional (COSY y HMQC).** Los espectros de RMN unidimensionales se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance con un barrido de 300 MHz empleando Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) como solvente y los bidimensionales en el espectrómetro Bruker Avance de 500 MHz con el mismo solvente.
- **Espectrometría de Masas.** Los espectros de masas se realizaron en un espectrómetro Thermo Finnigan TSQ Quantum Ultra AM, aplicando la técnica de ionización de Electro-Spray (ESI, por sus siglas en inglés) utilizando metanol como solvente.
- **Espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis).** Los espectros de absorción UV-Visible fueron realizados en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Lambda 35, empleando soluciones de los compuestos sintetizados de concentración conocida en Agua y Buffer fosfatado pH 7,2 (PBS). A partir de ellos se determinaron las absorptividades molares (ϵ) mediante la ecuación 2 de cada una de las bandas características observadas.
- **Espectroscopia de Fluorescencia.** Los espectros de fluorescencia se realizaron en un espectrómetro Perkin Elmer modelo LS45. Se midieron los barridos espectrales de excitación y emisión en soluciones de concentración conocida en Agua y PBS pH 7.2 de cada uno de los compuestos sintetizados.

7.4 *Caracterización Fotoquímica de los esteres derivados.*

Los estudios de irradiación se realizaron empleando dos reactores fotoquímicos Rayonet, los cuales poseen una serie de lámparas fluorescentes UVA (320 - 400nm, 3,3mW/cm²) y UVB (280 - 320 nm, 3,3 mW/cm²) a lo largo de la pared cilíndrica del reactor que rodean la celda y un ventilador para mantener la temperatura de la muestra a temperatura ambiente y minimizar la excitación térmica de la solución.

7.4.1 **Estudio de la Fotoestabilidad frente a irradiación UVA y UVB**

Para el estudio de las posibles variaciones estructurales que pudieran sufrir las moléculas al ser expuestas a radiación incidente de longitud de onda específica, se prepararon soluciones de concentración conocida en diferentes solventes (agua y PBS pH 7,2) a los cuales se les tomó el espectro UV-Visible inicial, y fueron sometidas a irradiación contenidas en una celda de cuarzo en los reactores Rayonet por 1 hora, su espectro fue tomado cada 1 minuto para observar si existen disminuciones y/o corrimientos en las bandas características de los espectros iniciales.

7.4.2 **Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia (Zoltan T, 2008).**

El Rendimiento cuántico de fluorescencia fue calculado mediante la relación del máximo de fluorescencia de los compuestos a analizar y el máximo de fluorescencia de un fotosensibilizador patrón cuyo rendimiento cuántico de fluorescencia es conocido. El patrón utilizado fue Rodamina B cuyo rendimiento cuántico de fluorescencia es 0,31 (en agua y en PBS pH 7,2) (Magde, Rojas, & Seybold, 1999). Para calcular el Rendimiento cuántico de fluorescencia fue necesario hacer una curva de calibración con el patrón, ya que las concentraciones a las cuales el patrón emitía diferían de las concentraciones a las cuales los compuestos emitieron fluorescencia.

La ecuación utilizada para calcular el rendimiento cuántico de los esteres derivados fue:

$$\Phi_f^x = \left(\frac{I_x}{I_R} \right) \Phi_f^R \quad (2)$$

Donde:

Φ_f^x = Rendimiento Cuántico de Fluorescencia del analito.

Φ_f^R = Rendimiento cuántico de fluorescencia de la referencia (Rodamina B).

I_x = Intensidad máxima de emisión de fluorescencia del analito.

I_R = Intensidad máxima de emisión de fluorescencia de la referencia (Rodamina B).

7.4.3 Determinación del rendimiento cuántico de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) (Zoltan, Vargas, & Izzo, 2007).

Para determinar el rendimiento cuántico de oxígeno singlete se utilizó una metodología validada en el Laboratorio de Fotoquímica del IVIC. Esta metodología consistió en un método indirecto, relativo a un patrón cuyo rendimiento cuántico de generación de $^1\text{O}_2$ fuese conocido. Como patrón se utilizó la Rosa de Bengala cuyo rendimiento cuántico de oxígeno singlete en agua es 0,76 y en PBS pH 7,2 es 0,75 (Redmond & Gamblin, 1999). El mismo se fundamenta en la reacción específica de la Histidina con el oxígeno singlete. En dicha reacción se genera un intermediario endoperóxido, el cual reacciona de manera específica con la *N,N*-*p*-dimetilnitrosoanilina, cuya banda a 440 nm disminuye como función de la producción de $^1\text{O}_2$. La reacción general de esta metodología se muestra a continuación:

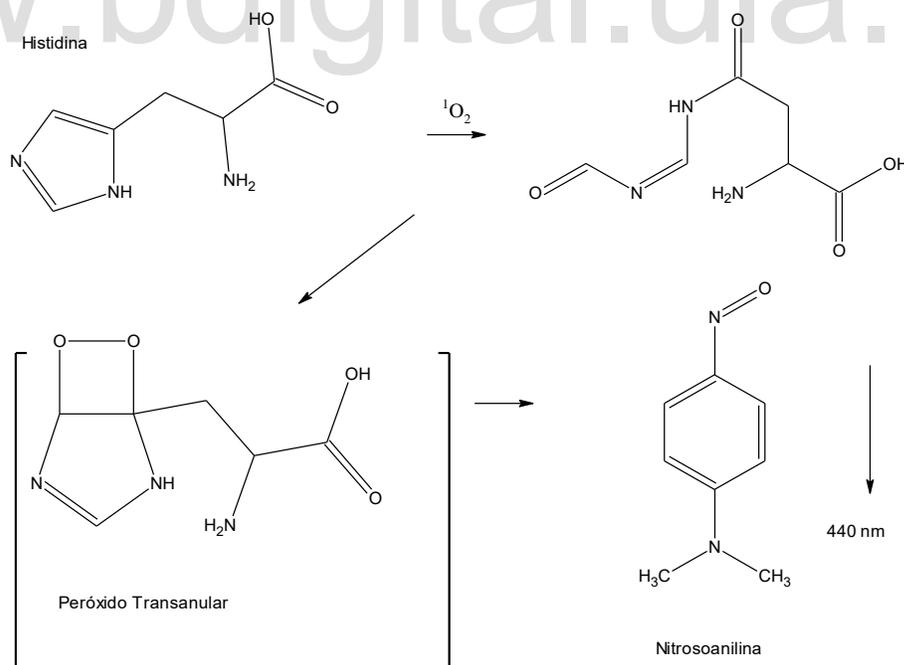


Figura 31. Reacción específica de la Histidina con el Oxígeno Singlete ($^1\text{O}_2$)

La metodología experimental consistió en colocar en una celda de cuarzo 1,5 mL de la quinolona, 1,5 mL de histidina y 0,750 mL de nitrosoanilina (las tres a una concentración de 0,1 mM). La mezcla se llevó a irradiación (equipo Rayonet) y el avance en la producción de oxígeno singlete fue seguido mediante la disminución de la banda característica de la nitrosoanilina a 440 nm. Este método también fue realizado sin irradiación para demostrar que la variación en 440 nm es una reacción inducida por luz.

Para calcular el rendimiento cuántico de oxígeno singlete se utilizó la relación entre la variación de la absorbancia del analito y de la referencia, en un tiempo de 20 minutos para el agua y 9 minutos para el PBS (tiempo en el cual la variación comienza a ser constante). La ecuación utilizada para determinar este rendimiento fue la siguiente:

$$\Phi_{1O_2}^x = \left(\frac{\Delta Abs_x}{\Delta Abs_R} \right) \Phi_{1O_2}^R \quad (3)$$

Donde:

$\Phi_{1O_2}^x$ = Rendimiento Cuántico de Oxígeno Singlete del analito.

$\Phi_{1O_2}^R$ = Rendimiento cuántico de Oxígeno Singlete de la Rosa de Bengala.

ΔAbs_x = Variación de la absorbancia a un tiempo determinado del analito.

ΔAbs_R = Variación de la absorbancia a un tiempo determinado de la Rosa de Bengala.

7.4.4 Determinación de producción de radicales libres oxigenados (Zoltan T, 2008)

La reacción de la adenina nicotinamida dinucleótido reducido (NADH por sus siglas en inglés: Nicotinamida Adenina Dinucleotide), genera, en presencia de radicales libres oxigenados (ROS) (Figura 323), peróxido de hidrógeno. De esta forma y en función de la reacción del H₂O₂ (producido por el NADH en presencia del fotosensibilizador) (ver Figura 334) con el luminol, la eficiencia de esta reacción puede ser medida en función de la radiación emitida, siendo la intensidad de radiación directamente proporcional a la cantidad de radicales libres producidos por el sistema.

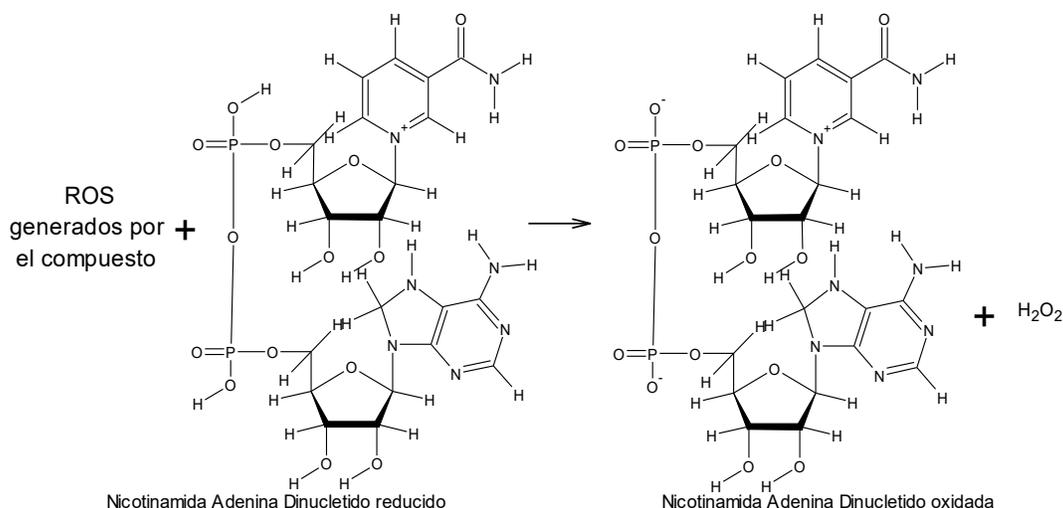


Figura 32. Reacción enzimática del NADH con radicales libres oxigenados (ROS).

Como el sistema con NADH no discrimina entre los tipos de radicales libre oxigenados producidos, se utilizó la reacción enzimática de la Superóxido Dismutasa (SOD), la cual reacciona de manera específica con el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), generando peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. De esta forma, y a fin de tener una idea de la proporción de radicales oxigenados producidos, se realizó un segundo experimento idéntico al descrito a continuación, pero en presencia de SOD. La proporción fue obtenida tomando en cuenta que cuando al sistema se le suministra SOD (en presencia del NADH y los compuestos estudiados) una disminución de la señal lumínica obtenido, nos presenta una idea cualitativa de la presencia o no de radicales tipo anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), debido a que la producción de oxígeno molecular disminuye la concentración total de peróxido de hidrogeno.

La producción de radicales libres se estudió mediante estudios de quimioluminiscencia, basada en la reacción lumínica de luminol con peróxido de hidrógeno según:

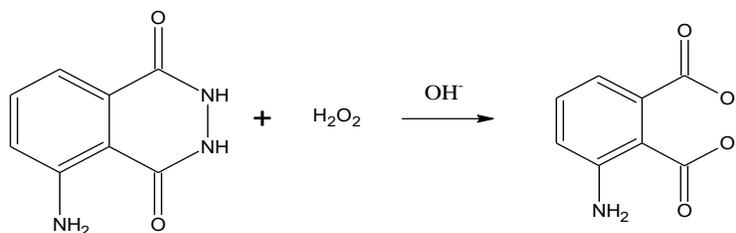


Figura 33. Reacción del luminol.

La radiación producida en esta reacción fue medida en un luminómetro (Thermo Labsystems Luminoskan Ascent model # 392).

La metodología experimental se llevó a cabo en una placa de 96 pozos, en las que se colocaron 50 μL del compuesto sintetizado y 50 μL de NADH (ambos a una concentración de 0,1 mM) y se determinó la producción de radicales libres, en función del tiempo de irradiación (fibra óptica, Cole Palmer), mediante la medida de radiación producida como consecuencia de la reacción con el luminol (50 μL 0,1 mM añadido de manera automática por el luminómetro) como una función del tiempo de irradiación. Los controles de la reacción de realizaron mediante la sustitución del compuesto a estudiar por agua, mientras que la eficiencia de la fotorreacción fue determinada mediante la verificación del sistema en ausencia de radiación.

Para los estudios en presencia de SOD, se procedió de igual manera que en el sistema anterior, simplemente añadiendo al sistema 50 μL (100 μM : 294,45 unidades) de dicha enzima.

7.5 Determinación de la actividad antibacteriana fotoinducida (Zoltan T, 2008)

La actividad antibacteriana de los fotosensibilizadores fue determinada utilizando *Escherichia coli* como bacteria blanco.

Para la determinación de la viabilidad celular de las bacterias enfrentadas a los fotosensibilizadores, se usó el “kit” para determinación de respiración celular (bactiter Glo, Promega, específico para bacterias) por quimioluminiscencia. Este “kit” está basado en la reacción enzimática de la luciferasa (en presencia de luciferina para producir oxiliferina más luz) con el ATP producido por el sistema in vitro, siendo dicha producción proporcional a la cantidad de bacterias vivas en el sistema.

De esta forma, la intensidad de luz producida (medida en un luminómetro) es una evaluación directa de la viabilidad de las células en el sistema bajo estudio, basada en la reacción mostrada a continuación:

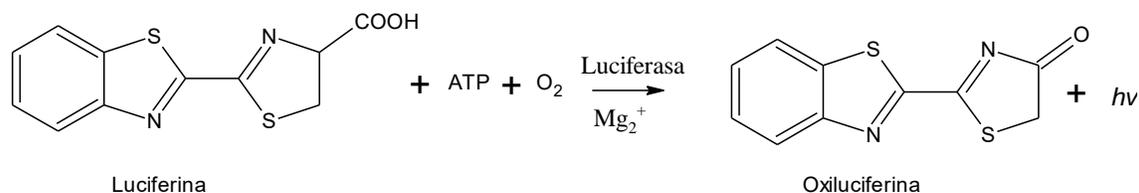


Figura 34. Reacción enzimática de la luciferasa.

Para dicho ensayo se utilizaron cultivos de *E. coli* frescos que se encontraban en fase exponencial, este crecimiento fue monitoreado por turbidimetría por UV a 660 nm, como función del tiempo de incubación a 37°C. Los cultivos fueron centrifugados lavados y diluidos con PBS, hasta una absorbancia (a 660 nm) de aproximadamente 0,1 A. Volúmenes fijos de este cultivo (50 µL), fueron enfrentados al mismo volumen en diferentes concentraciones de los fotosensibilizadores a ser estudiados. La mezcla bacteria/compuesto fue irradiada (Equipo LuzChem) por un período de 1 hora. Luego del tiempo de irradiación la viabilidad relativa de las bacterias (en función de los cultivos en ausencia de los fotosensibilizadores) fue determinada utilizando el kit de respiración celular (50µL de la mezcla comercial sin diluir, añadida de manera automática por el Luminómetro) midiendo la radiación producida por cada una de las mezclas. Para los cálculos de la actividad antibacteriana se determinó como una función de bacterias control en ausencia de fotosensibilizador. El procedimiento control fue llevado a cabo de manera idéntica pero en ausencia de radiación.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Purificación del Clorhidrato de Lomefloxacin (LOM.HCl)

En la purificación se obtuvo un sólido blanco de la base libre de Lomefloxacin (LOM-H), el porcentaje de rendimiento de la purificación fue de 76 %.

9.2 Síntesis de los ésteres derivados de Lomefloxacin

En la síntesis de los ésteres derivados se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento del 78% para el éster fenílico y un sólido rosado claro con un 73% de rendimiento para el éster naftílico.

Para la obtención de estos productos fue necesario optimizar diferentes variables al método de esterificación reportado por Vargas y colaboradores (Vargas, y otros, 2008), observados en la Tabla 9:

Tabla 9. Variables para optimizar el rendimiento de reacción para el éster fenílico derivado.

| Solvente | Relación estequiométrica Lomefloxacin:alcohol (moles) | Tiempo de reacción (horas) | Rendimiento de reacción (%) |
|---------------|---|----------------------------|-----------------------------|
| Cloroformo | 1:1 | 24 | 36 |
| | 1:2 | 24 | 44 |
| | 1:3 | 24 | 53 |
| | 1:3 | 48 | 78 |
| Diclorometano | 1:3 | 10 | 40 |
| | 1:3 | 24 | 58 |
| | 1:3 | 48 | 75 |

La relación estequiométrica entre la Lomefloxacin y el alcohol elegido fue de 1 mol de Lomefloxacin por cada 3 moles del alcohol, con un tiempo de 48 horas de reacción, en cloroformo.

Ya que la reacción de esterificación es una reacción reversible (Figura 35), para obtener un buen rendimiento del éster, hay que desplazar el equilibrio hacia el lado del producto, por lo que se hace necesario emplear uno de los reactivos en exceso (Fessenden & Fessenden, 1991), el reactivo elegido para esto fue el alcohol por disponibilidad y precio. Al observar la

variación de los rendimientos con respecto al incremento de la relación estequiométrica de los reactivos (Tabla 9) podemos observar como el rendimiento aumenta, por lo que podemos inferir que si se logra desplazar el equilibrio en la reacción.

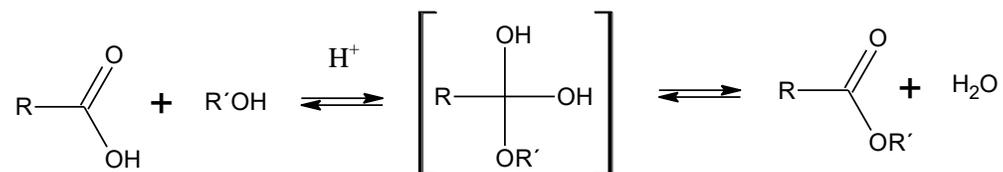


Figura 35. Resumen del mecanismo de esterificación (Fessenden & Fessenden, 1991).

A medida que aumenta el impedimento estérico en el intermediario, disminuye la velocidad de formación del éster, así como su rendimiento (Fessenden & Fessenden, 1991), la razón es que la esterificación es una reacción reversible, en la cual se favorecen las especies menos impedidas, en este caso los reactivos, razón por la cual podemos observar que a mayor tiempo se alcanza el equilibrio de reacción (Tabla 9).

Producto de los cambios en las afinidades entre el solvente y el compuesto sintetizado se obtuvieron rendimientos mayores en aproximadamente 5% ya que se disminuyó las pérdidas de producto en los procesos de lavado.

9.3 Caracterización mediante técnicas espectroscópicas

9.3.1 Espectroscopia de Absorción en el Infrarrojo (IR-TF).

9.3.1.1 Éster fenílico de Lomefloxacin

Los espectros de absorción en el infrarrojo fueron realizados para corroborar la existencia de los grupos funcionales en las moléculas sintetizadas. La asignación de las vibraciones características para cada grupo funcional es mostrada en las tablas 10 y 11 para el éster fenílico y el éster naftílico, respectivamente.

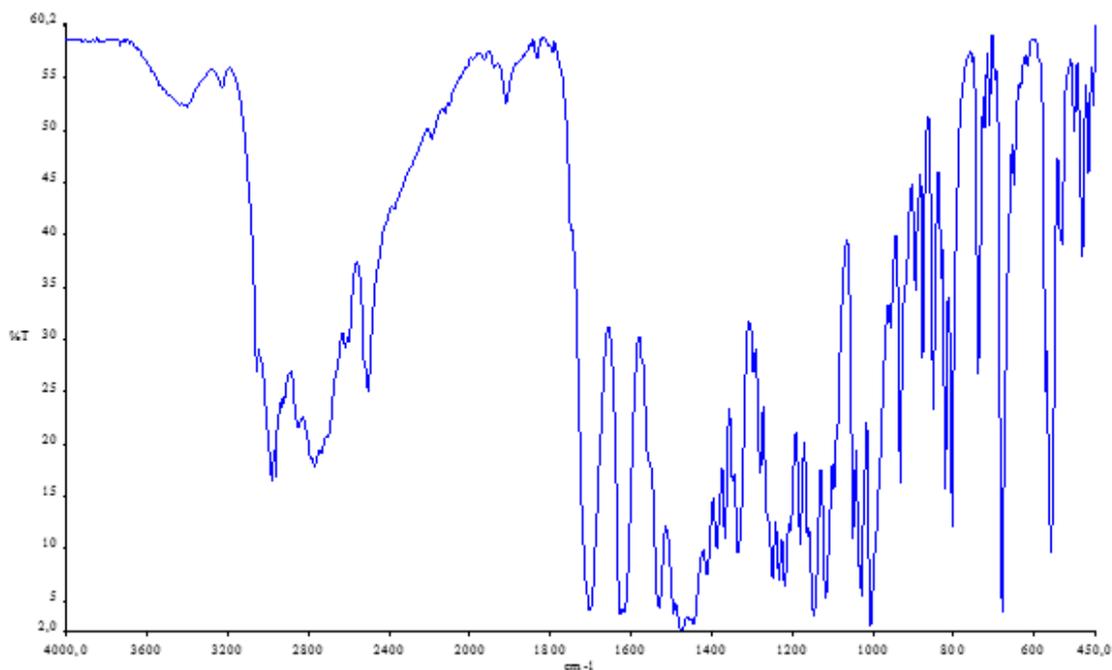


Figura 36. Espectro IR-FT obtenido para el éster fenílico derivado.

Tabla 10. Asignación de las señales del IR-FT para el éster fenílico.

| ν (cm ⁻¹) | Asignación |
|---------------------------|---|
| 3405,25 | Vibración de tensión N-H amina secundaria |
| 3080,00 | Vibraciones de tensión del C-H |
| 2771,18 | Vibración tensión C-H alcano |
| 1910,06 | Sobretono aromático |
| 1703,63 | Vibración de tensión C=O ésteres aromáticos |
| 1628,10 | Vibración tensión C=O cetona alifática |
| 1532,63 | Vibración deformación N-H en el plano |
| 1475,83 | Vibración tensión C=C |
| 1413,92 | Vibración deformación C-H |
| 1281,44 | Vibraciones de tensión asimétrica C-O-C |
| 1234,89 | Vibración tensión simétrica C-O-C |
| 1148,67 | Vibración tensión C-O-C |
| 1050,96 | Vibración tensión C-O |
| 934,83 | Vibración tensión C-N |
| 852,68 | Vibraciones de flexión fuera del plano del C-H aromáticos monosustituidos |
| 740,05 | Vibraciones de flexión fuera del plano del C-H aromáticos monosustituidos |
| 683,38 | |

9.3.1.2 Éster naftílico de Lomefloxacin

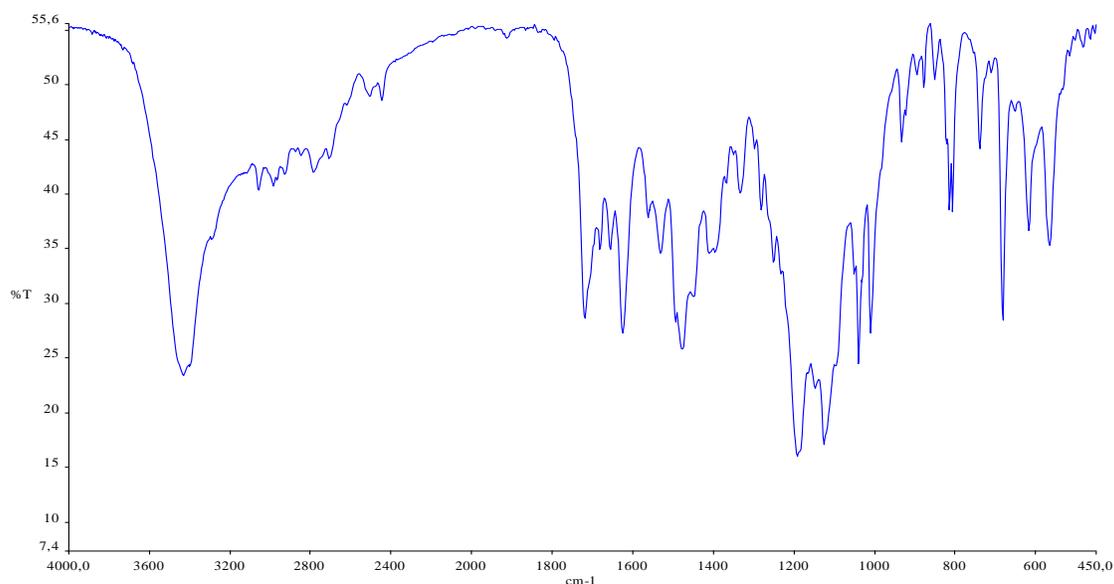


Figura 37. Espectro IR-FT obtenido para el éster naftílico derivado.

Tabla 11. Asignación de las señales del IR-FT para el éster naftílico.

| Señal (cm ⁻¹) | Asignación |
|---------------------------|--|
| 3453,53 | Vibración de tensión N-H amina secundaria |
| 3060,50 | Vibraciones de tensión del C-H |
| 2788,10 | Vibración tensión C-H alcano |
| 1913,86 | Sobretono aromático |
| 1720,64 | Vibración de Tensión C=O esterres aromáticos |
| 1681,74 | Vibración tensión C=O cetona alifática |
| 1656,43 | Vibración de tensión C=O forma enólica |
| 1625,96 | Vibración Deformación N-H en el plano |
| 1478,92 | Vibración Tensión C=C |
| 1411,94 | Vibración Deformación C-H |
| 1192,65 | Vibraciones de tensión Asimétrica C-O-C |
| 1126,92 | Vibración Tensión Simétrica C-O-C |
| 1040,28 | Vibración Tensión C-O-C |
| 1011,59 | Vibración Tensión C-O |
| 933,76 | Vibración Tensión C-N |
| 852,08 | Vibraciones de flexión fuera del plano del C-H aromáticos mono sustituidos |
| 740,05 | |
| 683,38 | |

9.3.2 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear

9.3.2.1 Éster fenílico de Lomefloxacin

Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C (Figura 38 y Figura 41) confirman la inclusión del anillo aromático por las señales observadas en las zonas características para estos compuestos (7-8 ppm).

La aparición de la señal característica del Carbono del éster (175,42 ppm) (Figura 41) confirma la formación del producto.

Para la completa asignación de las señales de RMN ^1H y ^{13}C fue necesario realizar espectros bidimensionales: COSY ^1H - ^1H (experimento de correlación heteronuclear directa) (Figura 40) y HMQC (correlación heteronuclear múltiple cuántica ^1H - ^{13}C) (Figura 43).

En la tabla 12 podemos observar la asignación de los protones e identificación de cada uno de ellos sobre la molécula (Figura 39).

La asignación de los protones del anillo piperazínico se hicieron posibles mediante el espectro COSY, así como el protón que se encuentra sobre el nitrógeno del anillo.

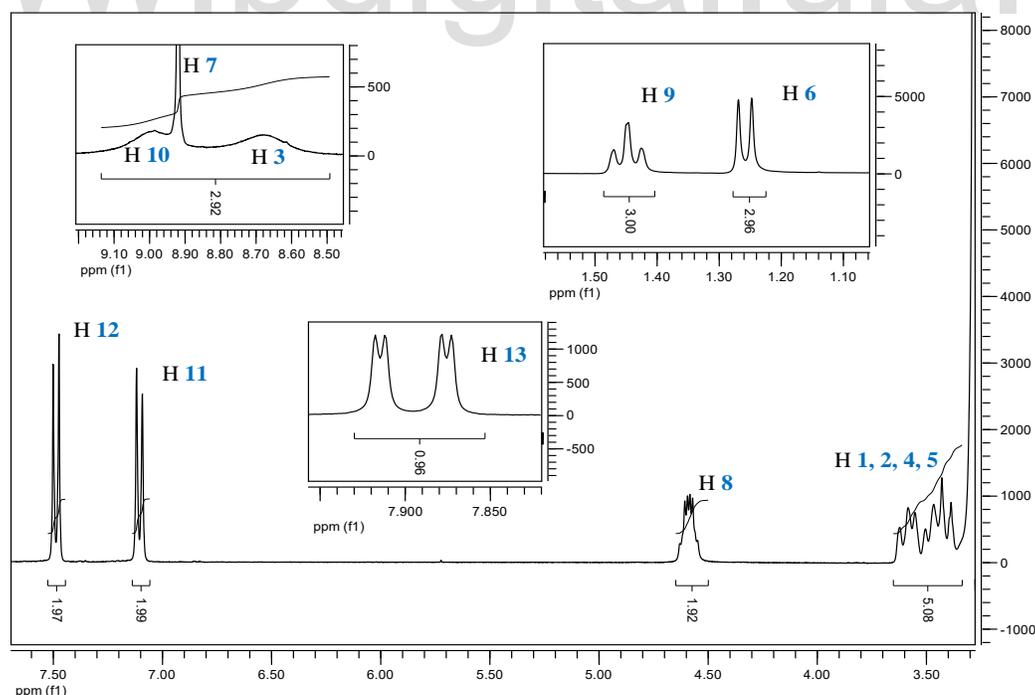


Figura 38. Espectro RMN ^1H del éster fenílico de Lomefloxacin en DMSO- D_6 .

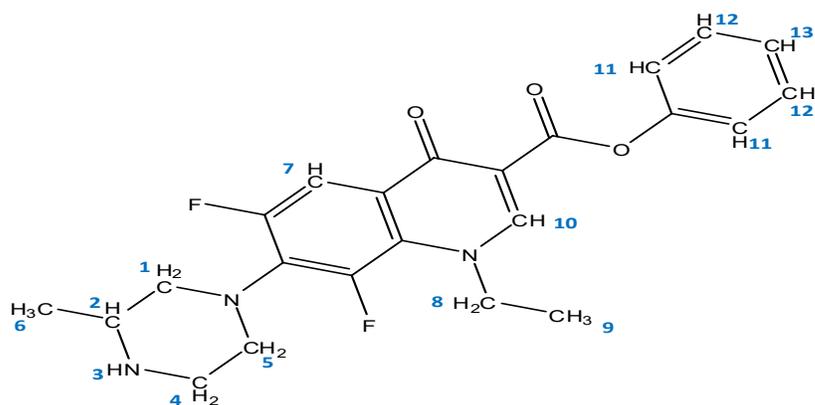


Figura 39. Identificación de los protones del éster fenílico de Lomefloxacin.

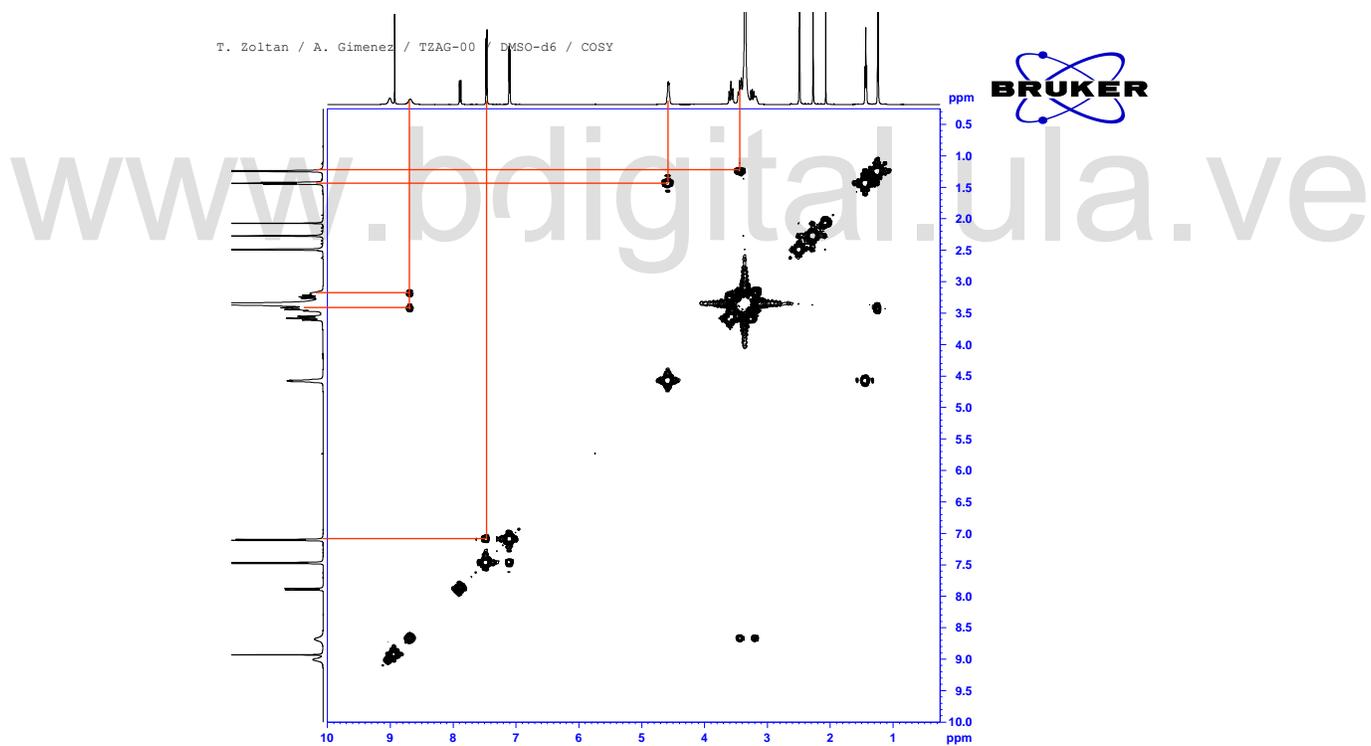
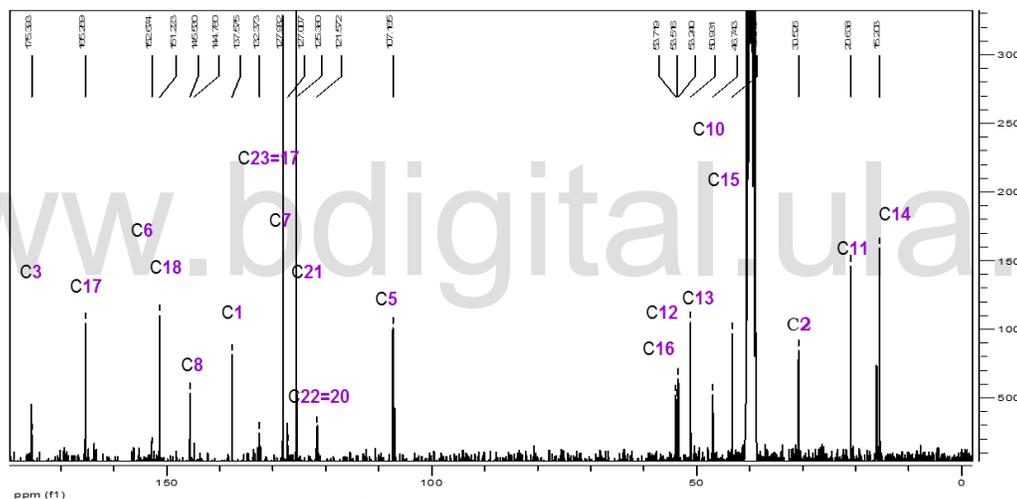
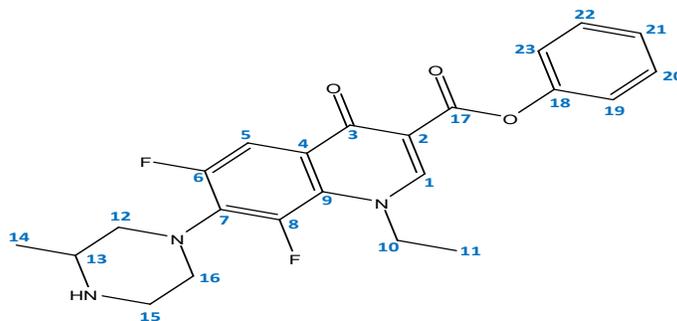


Figura 40. Espectro COSY del éster fenílico de Lomefloxacin en DMSO-D₆.

Tabla 12. Asignación de las señales del RMN ^1H del éster fenílico de Lomefloxacin.

| Desplazamiento (ppm) | Multiplicidad | N° de protones | Asignación numeración (ver figura 39) |
|----------------------|---------------|----------------|---------------------------------------|
| 9 | s | 1 | H 10 |
| 8,917 | s | 1 | H 7 |
| 8,677 | s | 1 | H 3 |
| 7,911 | d,d | 1 | H 13 |
| 7,499 | d | 2 | H 12 |
| 7,11 | d | 2 | H 11 |
| 4,589 | m | 2 | H 8 |
| 3,577 | t | 1 | H 2 |
| 3,460 | t | 2 | H 4 |
| 3,423 | d | 2 | H 1 |
| 3,271 | t | 2 | H 5 |
| 1,445 | t | 3 | H 9 |
| 1,267 | d | 3 | H 6 |

**Figura 41.** Espectro RMN ^{13}C del éster fenílico de Lomefloxacin en DMSO- D_6 .**Figura 42.** Identificación de los carbonos del éster fenílico de Lomefloxacin.

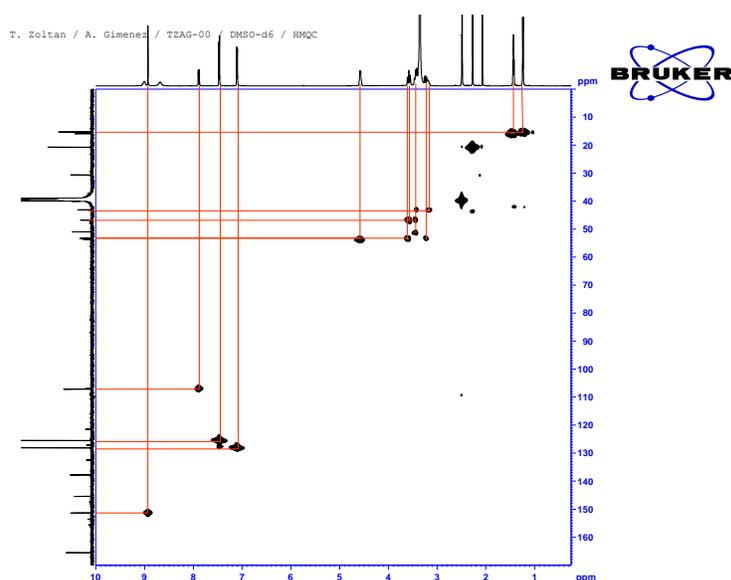


Figura 43. Espectro HMQC de éster fenílico de Lomefloxacin en DMSO-D₆.

Tabla 13. Asignación de las señales del espectro de ¹³C para el éster fenílico de Lomefloxacin.

| Desplazamiento (ppm) | Tipo de Carbono | Asignación (ver figura 42) |
|----------------------|------------------------------------|----------------------------|
| 175,427 | C=O | 3 |
| 164,991 | C-(C=O)-O-C | 17 |
| 152,803 | F-C(Ar*)-C-F | 6 |
| 151,223 | -O-C(Ar) | 18 |
| 145,530 | C(Ar)-F | 8 |
| 137,574 | N-C=C | 1 |
| 127,932 | Ar | 23 = 19 |
| 127,103 | N-C(Ar) | 7 |
| 125,379 | Ar | 21 |
| 121,456 | Ar | 22 = 20 |
| 107,165 | C(Ar)- C- F o O=C-C-C=O | 5 o 2 |
| 53,719 | Ar-N-C C | 16 |
| 53,239 | Ar-N-C C | 12 |
| 50,931 | N-CH-CH ₃ | 13 |
| 46,785 | N-CH ₂ -CH ₃ | 10 |
| 43,045 | N-C-C-N | 15 |
| 15,763 | N-CH ₂ -CH ₃ | 11 |
| 15,203 | N-CH-CH ₃ | 14 |

* Ar = Carbono perteneciente a un ciclo aromático.

9.3.2.2 Éster naftílico de Lomefloxacin

De manera análoga a la realizada para la asignación de los protones y carbonos del éster fenílico, se realizaron los espectros de resonancia magnética nuclear unidimensionales ^1H (Figura 44) y de ^{13}C (figura 47). Con la ayuda de los espectros bidimensionales se realizó la identificación de los protones y carbonos de este producto en (Figura 46 y Figura 49), y su respectiva asignación sobre la molécula se encuentran sobre las figuras 45 y 48.

| Desplazamiento (ppm) | Tipo de Carbono | Asignación (ver figura 48) |
|----------------------|------------------------------------|----------------------------|
| 175,46 | C=O | 3 |
| 165,37 | C-(C=O)-O-C | 17 |
| 152,05 | F-C(Ar*)-C-F | 6 |
| 151,31 | -O-C(Ar) | 18 |
| 145,48 | C(Ar) -F | 8 |
| 144,60 | N-C=C | 1 |
| 137,69 | Ar | 26 |
| 132,44 | F-C-C(Ar)-N | 9 |
| 128,03 | Ar | 20 |
| 127,12 | Ar | 21 |
| 127,04 | N-C(Ar) | 22 |
| 125,43 | Ar | 25 =24 |
| 124,59 | Ar | 7 |
| 122,32 | Ar | 23 |
| 121,40 | Ar | 4 |
| 118,69 | Ar | 19 |
| 107,15 | O=C-C-C=O ó O-C-C(Ar) | 2 o 27 |
| 106,84 | C(Ar) -C- F | 5 |
| 53,58 | Ar-N-C C | 16 |
| 53,27 | Ar-N-C C | 12 |
| 50,97 | N-CH-CH ₃ | 13 |
| 46,62 | N-CH ₂ -CH ₃ | 10 |
| 43,09 | N-C-C-N | 15 |
| 15,87 | N-CH ₂ -CH ₃ | 11 |

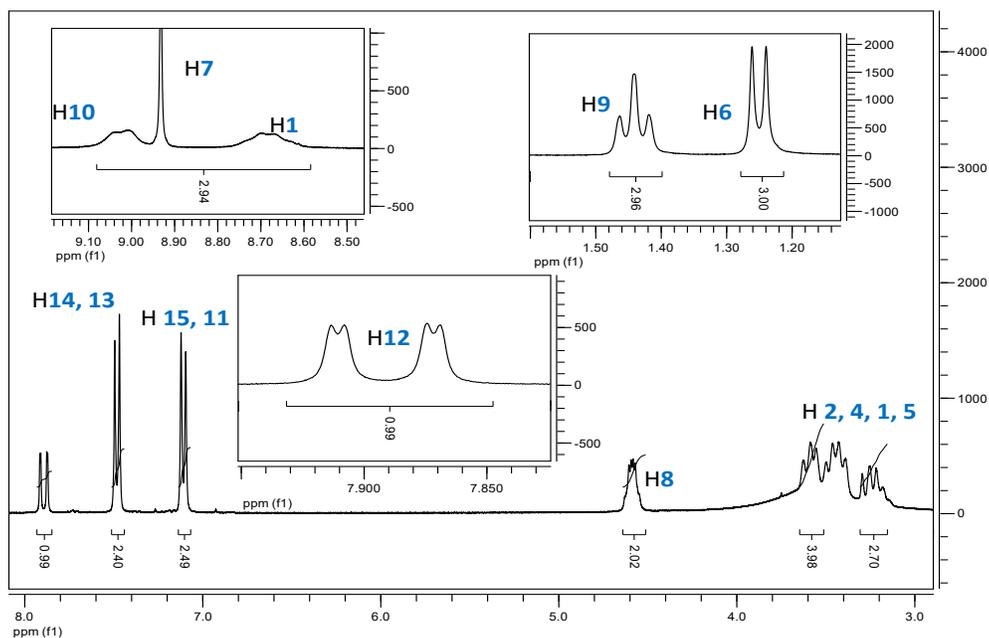


Figura 44. Espectro RMN ^1H del éster naftílico de Lomefloxacin.

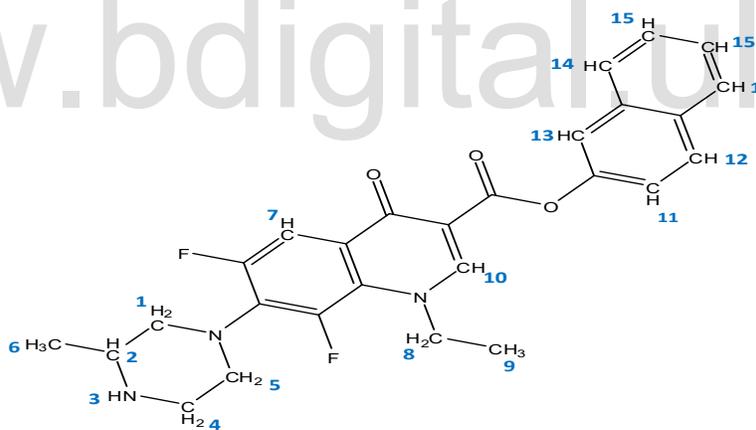


Figura 45. Identificación de los protones del éster naftílico de Lomefloxacin.

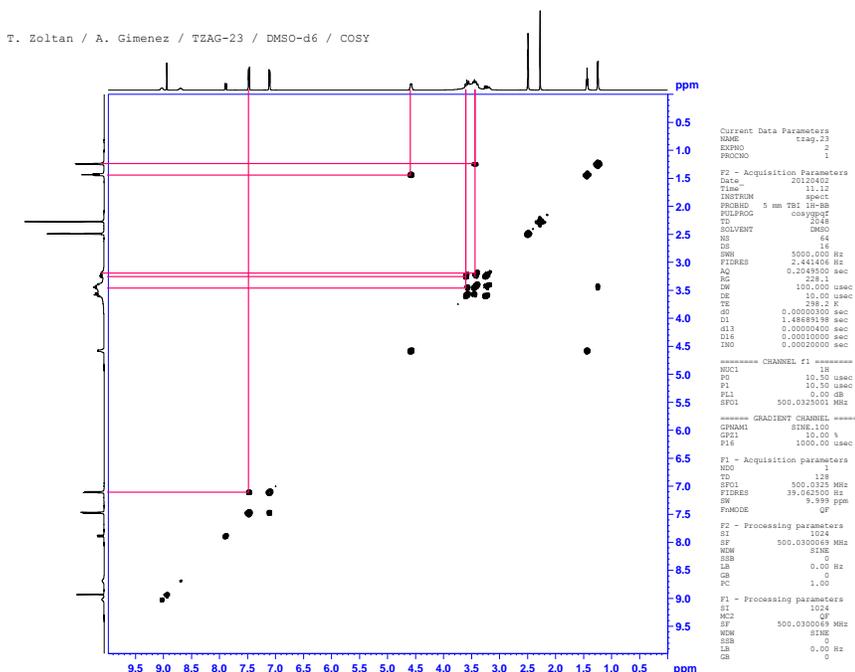


Figura 46. Espectro COSY del éster naftílico de Lomefloxacin.

Tabla 14. Asignación de las señales del RMN ¹H del éster naftílico de Lomefloxacin.

| Desplazamiento (ppm) | Multiplicidad | N° de protones | Asignación numeración (ver figura 45) |
|----------------------|---------------|----------------|---------------------------------------|
| 9 | s | 1 | H 10 |
| 8,917 | s | 1 | H 7 |
| 8,677 | s | 1 | H 3 |
| 7,911 | d,d | 1 | H 12 |
| 7,499 | d | 3 | H 14,13 |
| 7,11 | d | 3 | H 15, 11 |
| 4,589 | m | 2 | H 8 |
| 3,578 | t | 1 | H 2 |
| 3,449 | t | 2 | H 4 |
| 3,417 | d | 2 | H 1 |
| 3,246 | t | 2 | H 5 |
| 1,445 | t | 3 | H 9 |
| 1,267 | d | 3 | H 6 |

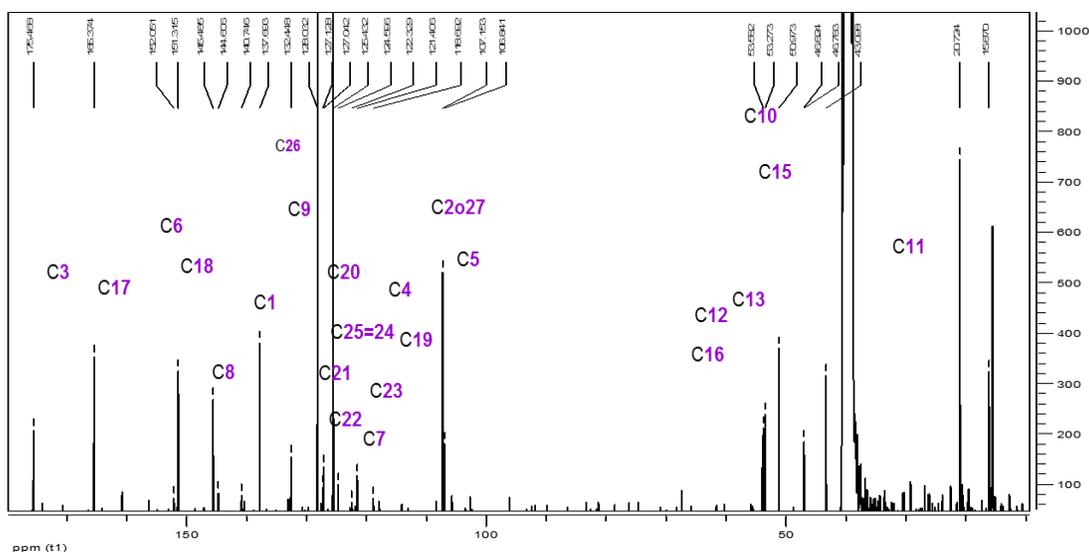


Figura 47. Espectro RMN ¹³C para el éster naftílico de Lomefloxacin.

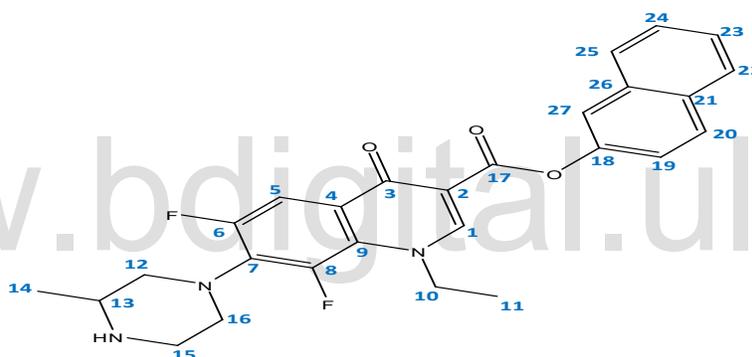


Figura 48. Identificación de los carbonos del éster naftílico de Lomefloxacin.

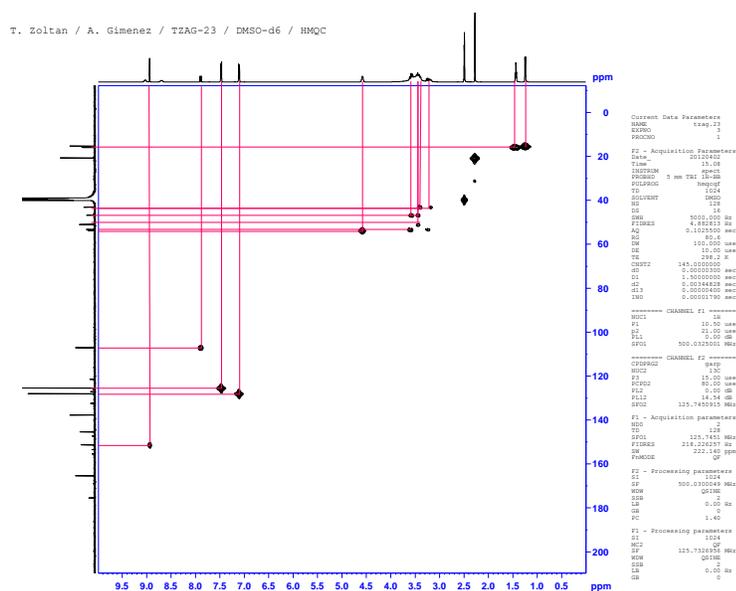


Figura 49. Espectro HMQC del éster naftílico de Lomefloxacin.

Tabla 15. Asignación de las señales del espectro de ^{13}C para el éster naftílico de Lomefloxacin.

| Desplazamiento (ppm) | Tipo de Carbono | Asignación (ver figura 48) |
|----------------------|------------------------------------|----------------------------|
| 175,46 | C=O | 3 |
| 165,37 | C-(C=O)-O-C | 17 |
| 152,05 | F-C(Ar*)-C-F | 6 |
| 151,31 | -O-C(Ar) | 18 |
| 145,48 | C(Ar)-F | 8 |
| 144,60 | N-C=C | 1 |
| 137,69 | Ar | 26 |
| 132,44 | F-C-C(Ar)-N | 9 |
| 128,03 | Ar | 20 |
| 127,12 | Ar | 21 |
| 127,04 | N-C(Ar) | 22 |
| 125,43 | Ar | 25 =24 |
| 124,59 | Ar | 7 |
| 122,32 | Ar | 23 |
| 121,40 | Ar | 4 |
| 118,69 | Ar | 19 |
| 107,15 | O=C-C-C=O ó O-C-C(Ar) | 2 o 27 |
| 106,84 | C(Ar)-C- F | 5 |
| 53,58 | Ar-N-C C | 16 |
| 53,27 | Ar-N-C C | 12 |
| 50,97 | N-CH-CH ₃ | 13 |
| 46,62 | N-CH ₂ -CH ₃ | 10 |
| 43,09 | N-C-C-N | 15 |
| 15,87 | N-CH ₂ -CH ₃ | 11 |

9.3.3 Espectrometría de Masas

9.3.3.1 Ester fenílico de Lomefloxacin

En la figura 50 se muestra el espectro de masas obtenido para el éster fenílico, pudiendo identificar los diferentes fragmentos que son asignados en la tabla 16. En la Figura 51 se puede observar el pico del ion molecular (correspondiente al peso molecular), que al ser de tan poca intensidad con respecto a las demás fragmentaciones observadas, no se ve en la figura 50.

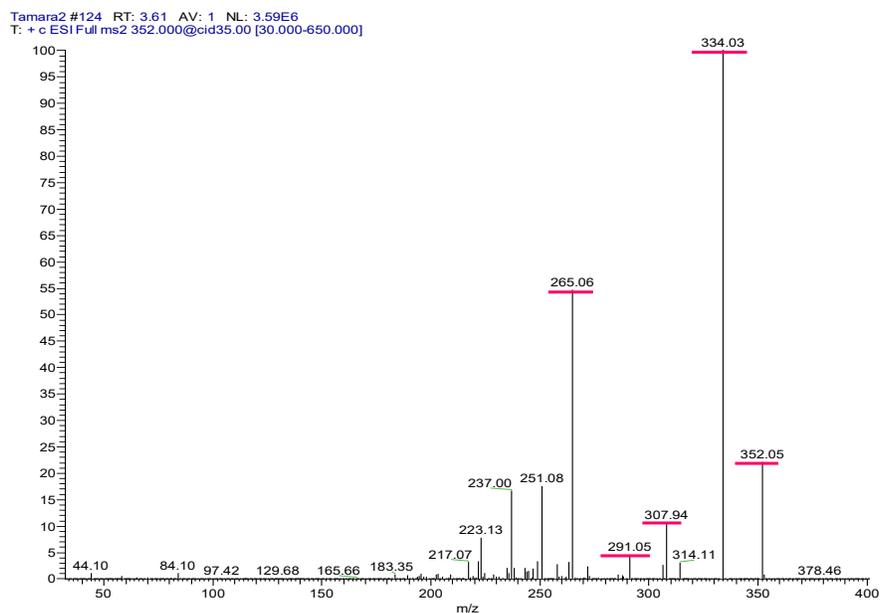


Figura 50. Espectro de Masa obtenido para el éster fenílico de Lomefloxacin.

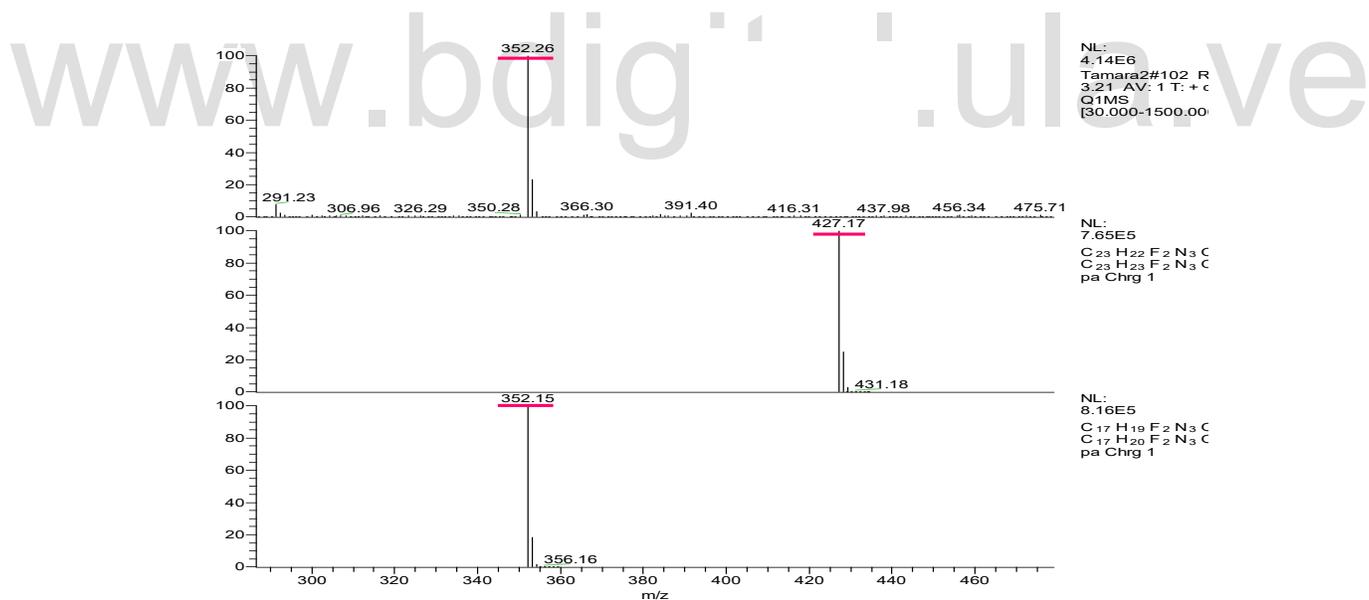


Figura 51. Pico obtenido para el ion molecular el éster fenílico.

Tabla 16. Identificación de las fragmentaciones observadas en las figuras 50 y 51.

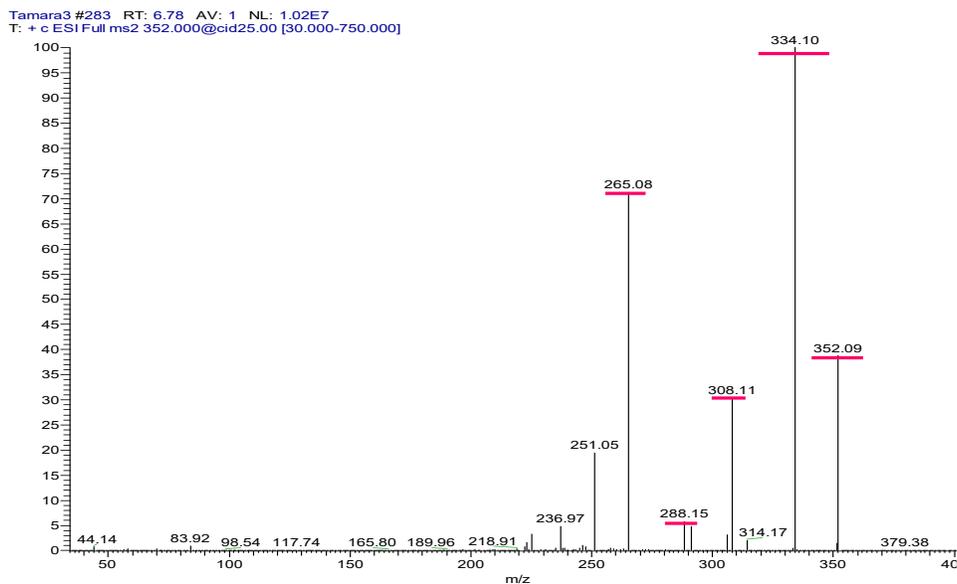
| Iones | Intensidad | Observación (m/z) |
|---------------------------|------------|-------------------|
| M ⁺ | d | 427,44 |
| M ⁻ -RO | f | 334,34 |
| M ⁻ -RO – CO | m | 308,33 |
| M ⁺ – R | m | 352,34 |
| M ⁺ -RO-CO-F-F | m | 268,35 |
| M ⁺ -RO-CO-F- | m→d | 288,34 |

RO= grupo fenólico; R= Ciclo aromático;

Podemos observar que la fragmentación que presenta la intensidad más fuerte (334,34 m/z) lo que nos indica mayor probabilidad de formación, esto es porque cuando el compuesto pierde el grupo fenólico, queda el carbanión más estable de la molécula, ya que la carga es estabilizada por resonancia con la carga del oxígeno lateral del grupo carbonilo.

9.3.3.2 Éster naftílico de Lomefloxacina

De manera análoga mediante la figura 52 se muestran las fragmentaciones obtenidas al realizar la espectrometría de masas para el éster naftílico, identificando los principales fragmentos en la tabla 17, y el ion molecular (peso molecular) es observado en la figura 53.

**Figura 52.** Espectro de Masas para el éster naftílico de Lomefloxacina.

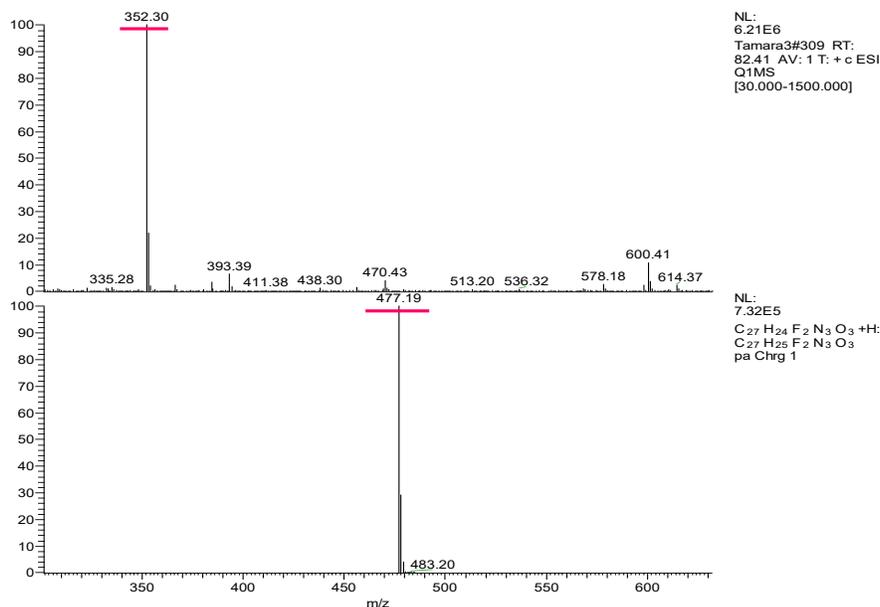


Figura 53. Pico obtenido para el ion molecular del éster naftílico de Lomefloxacin

Tabla 17. Identificación de las fragmentaciones observadas en las figuras 52 y 53.

| Iones | Intensidad | Observación (m/z) |
|---------------------------|------------|-------------------|
| M ⁺ | d | 477,50 |
| M ⁺ -RO | f | 334,34 |
| M ⁺ -RO - CO | m | 308,33 |
| M ⁺ - R | m | 352,34 |
| M ⁺ -RO-CO-F-F | m | 268,35 |
| M ⁺ -RO-CO-F- | m→d | 288,34 |

RO= grupo naftílico; R= doble ciclo aromático

En ambos casos observamos que el ion que presenta mayor intensidad (334,34 m/z) es aquel que se indica la formación del carbanión más estable, al fragmentarse el grupo aromático junto con el oxígeno dejando el carbono junto a un grupo carbonilo que estabiliza la carga por resonancia.

9.3.4 Espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis).

9.3.4.1 En agua

Los espectros de absorción fueron realizados a una concentración de 2×10^{-5} M, obteniendo una absorbancia menor a 1 para todos los espectros, para no infringir con las limitaciones de la ley de Beer.

Los espectros obtenidos para los tres compuestos (reactivo de partida y los dos productos de la esterificación) se muestran a continuación:

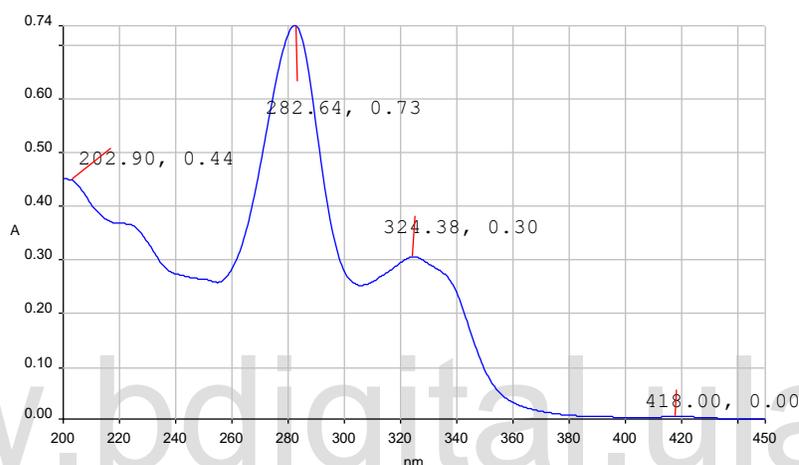


Figura 54. Espectro UV de Lomefloxacin en agua [2×10^{-5} M].

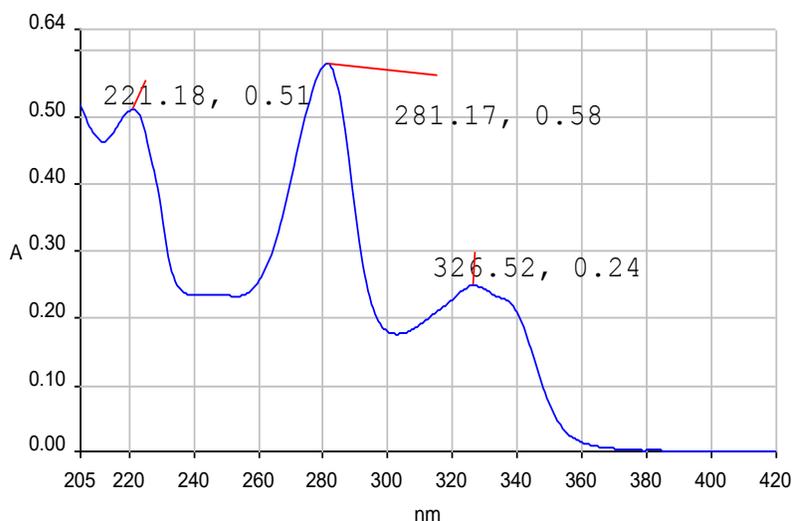


Figura 55. Espectro UV del éster fenílico de Lomefloxacin en agua [2×10^{-5} M].

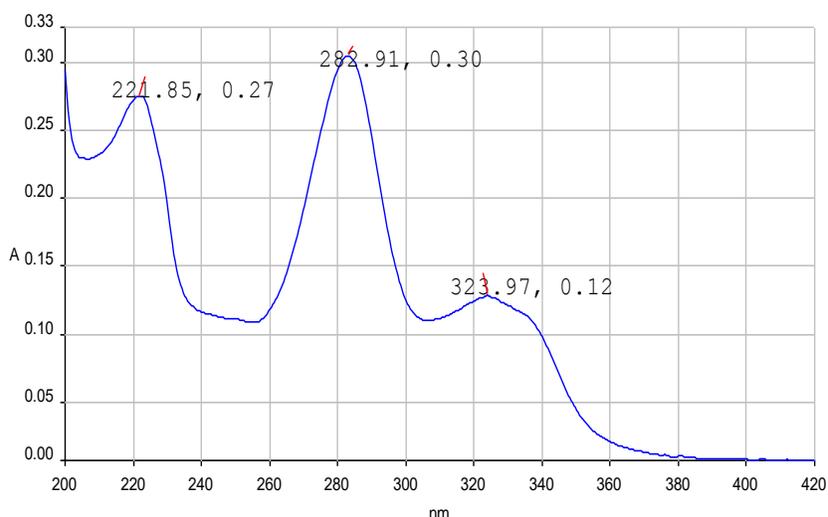


Figura 56. Espectro UV del éster naftílico de Lomefloxacin en agua [$1,9 \times 10^{-5}$ M].

Los coeficientes de extinción molar (ϵ) fueron calculados con la ecuación 2 para cada uno de los compuestos estudiados en la banda de absorción principal (λ_1) observadas en los espectros, los valores obtenidos se muestran en la Tabla 18.

Se puede observar la aparición de una nueva banda con mayor coeficiente de extinción molar en los espectros de los compuestos sintetizados en la región de los 200-220 nm, debido a la inclusión de los grupos aromáticos.

Se observa una disminución en los coeficientes de absorción molar con respecto al compuesto de partida (Tabla 18), pero aun así manteniéndose en el orden de los $10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, característica necesaria para ser utilizados como fotosensibilizadores.

Tabla 18 Coeficientes de Extinción Molar en Agua.

| Compuesto | Molaridad (mol L ⁻¹) | λ_1 (nm) | $\epsilon \times 10^4$ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹) | λ_2 (nm) | λ_3 (nm) |
|---------------------------------|----------------------------------|------------------|--|------------------|------------------|
| Lomefloxacin | (2×10^{-5} M) | 283,69 | 3,66 | 323,11 | 205,39 |
| Éster fenílico de Lomefloxacin | (2×10^{-5} M) | 281,20 | 2,89 | 326,56 | 221,16 |
| Éster naftílico de Lomefloxacin | ($1,98 \times 10^{-5}$ M) | 282,67 | 1,53 | 323,97 | 222,33 |

La tendencia observada para la variación del coeficiente de extinción molar es de:

Lomefloxacin > éster fenílico de Lomefloxacin > éster naftílico de Lomefloxacin.

La relación de los (ϵ) de la banda de los productos que aparece en 220 nm con respecto a la banda característica de 280 nm, aumentan debido a que ocurren un mayor número de transiciones electrónicas al aumentar el tamaño del grupo resonante incluido.

9.3.4.2 En PBS (solución de buffer fosfatado a pH 7,2)

De igual manera se realizaron los espectros de absorción en una solución de buffer fosfatado a pH 7,2 a una concentración de $2,5 \times 10^{-5}$ M, manteniendo los valores de absorbancia < 1 .

Los espectros obtenidos son mostrados a continuación:

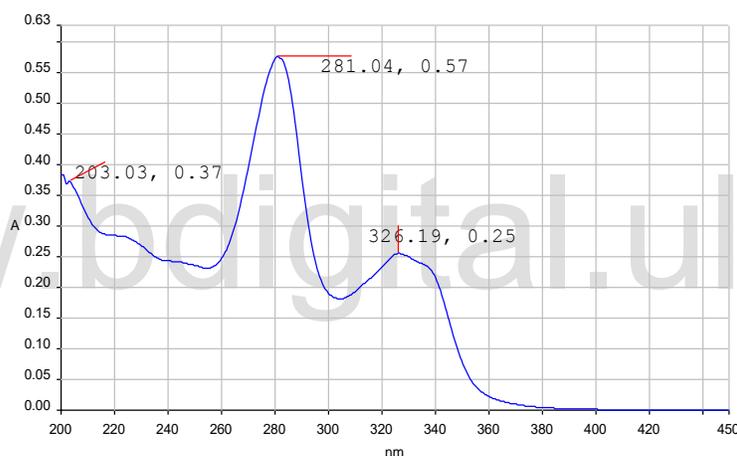


Figura 57. Espectro UV de Lomefloxacin en PBS [$2,48 \times 10^{-5}$ M].

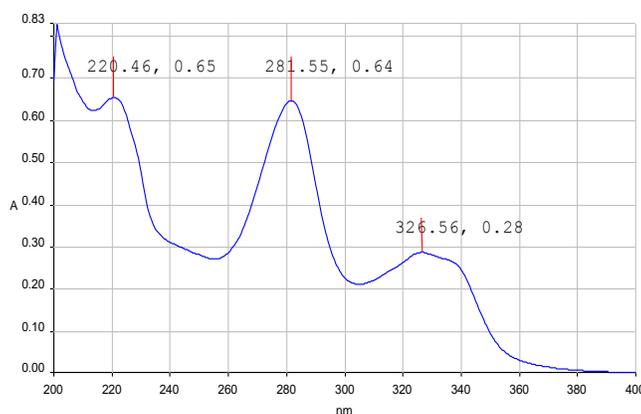


Figura 58. Espectro UV del éster fenílico de Lomefloxacin en PBS [$2,5 \times 10^{-5}$ M].

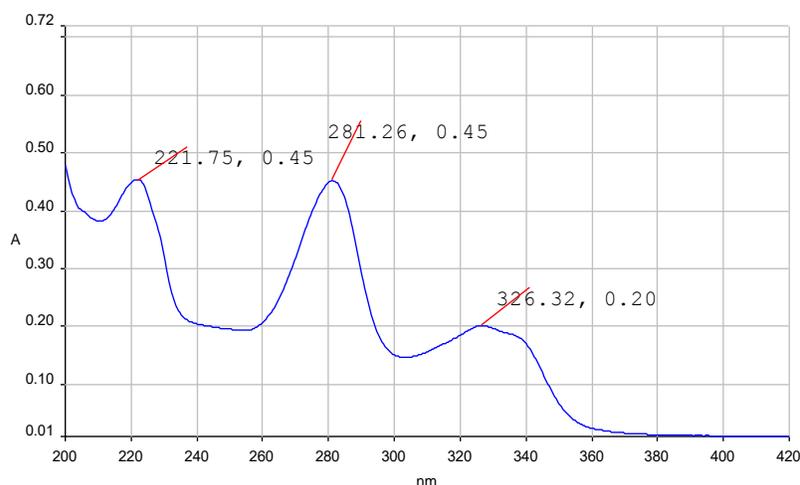


Figura 59. Espectro UV del éster naftílico de Lomefloxacin en PBS [$2,48 \times 10^{-5}$ M].

No se observan corrimientos significativos como efecto de la variación del pH ni de la presencia de sales disueltas en el medio, manteniendo el mismo comportamiento de las bandas y el valor de los coeficientes de absorptividad de los espectros realizados en agua.

Tabla 19. Coeficientes de Extinción Molar en PBS

| Compuesto | Molaridad (mol L ⁻¹) | λ_1 (nm) | $\epsilon \times 10^4$ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹) | λ_2 (nm) | λ_3 (nm) |
|---------------------------------|----------------------------------|------------------|--|------------------|------------------|
| Lomefloxacin | ($2,48 \times 10^{-5}$ M) | 281,53 | 2,76 | 326,88 | 203,23 |
| Éster fenílico de Lomefloxacin | ($2,5 \times 10^{-5}$ M) | 281,64 | 2,85 | 326,56 | 219,43 |
| Éster naftílico de Lomefloxacin | ($2,48 \times 10^{-5}$ M) | 281,72 | 1,82 | 326,39 | 222,33 |

9.4 Caracterización Fotoquímica de los ésteres derivados.

9.4.1 Estudio de la Fotoestabilidad frente a irradiación UVA y UVB

9.4.1.1 Fotoestabilidad en agua

Para poder comparar la estabilidad de los compuestos sintetizados con respecto al compuesto de partida, fue necesario estudiar los cambios espectrales sufridos por éste (Lomefloxacin) al ser irradiada con luz UVA y UVB. En el compuesto de partida se puede observar disminución y corrimientos en las tres bandas características del espectro de absorción (Figuras 60 y 61), junto con la formación de tres puntos de inflexión.

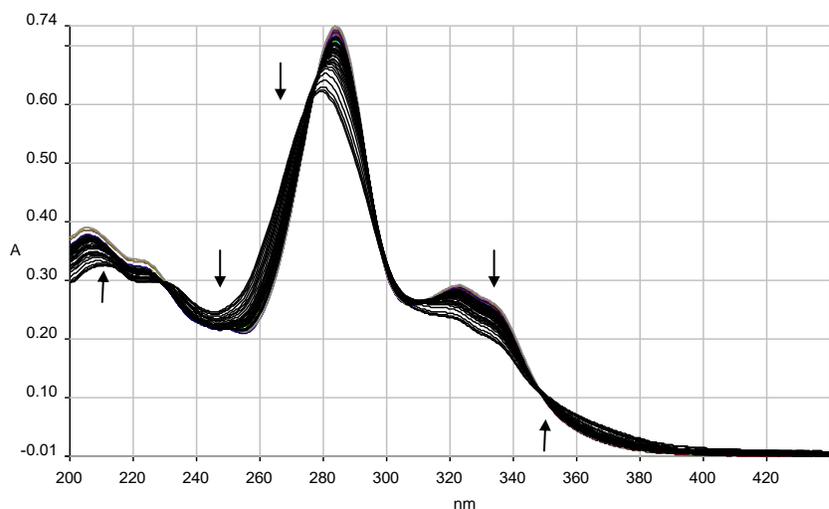


Figura 60. Fotodegradación de Lomefloxacin en UVA.

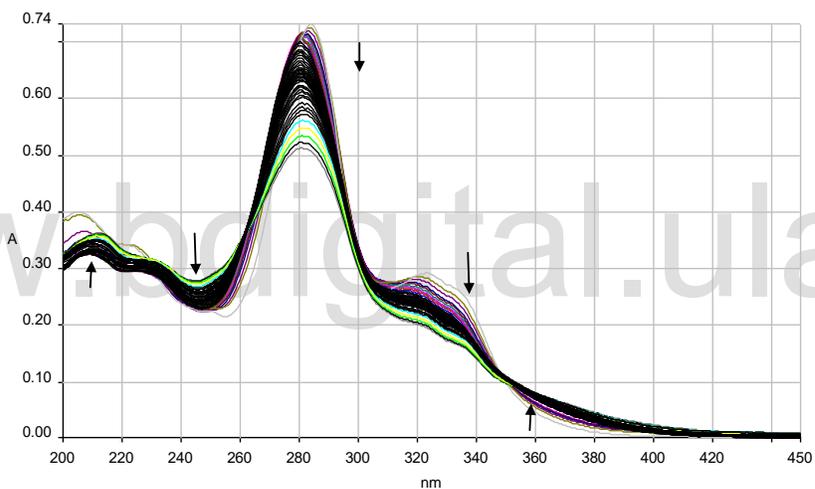


Figura 61. Fotodegradación de Lomefloxacin en UVB.

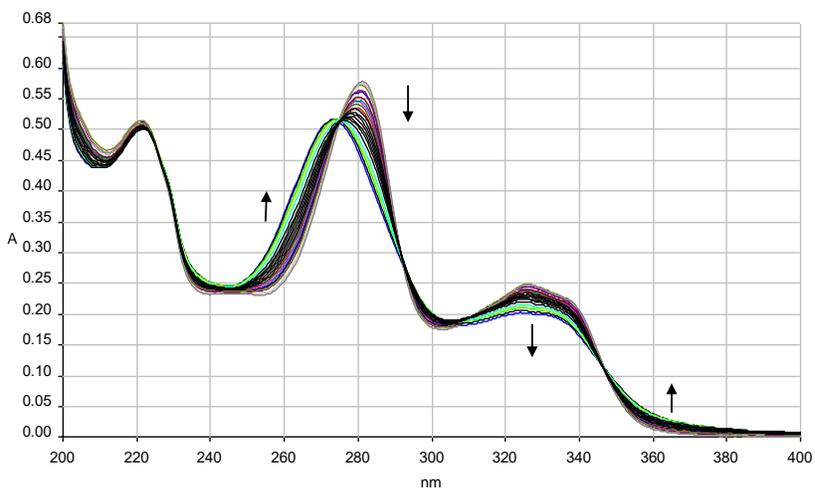


Figura 62. Fotodegradación del éster fenílico de Lomefloxacin en UVA.

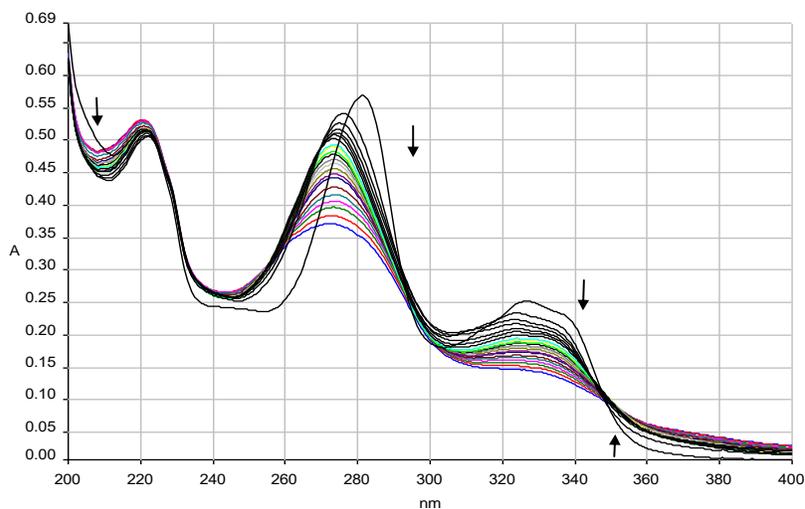


Figura 63. Fotodegradación del éster fenílico de Lomefloxacin en UVB.

Al comparar con los estudios de fotoestabilidad realizados con los compuestos sintetizados (figuras 62, 63, 64 y 65), observamos disminución y corrimiento en las bandas entre los 260-380 nm formándose solo dos puntos de inflexión en el espectro, observándose que la banda que aparece al realizar la esterificación (200-225 nm), se mantiene inalterada por lo que podríamos inferir que esta zona de la molécula se mantiene estable frente a la radiación.

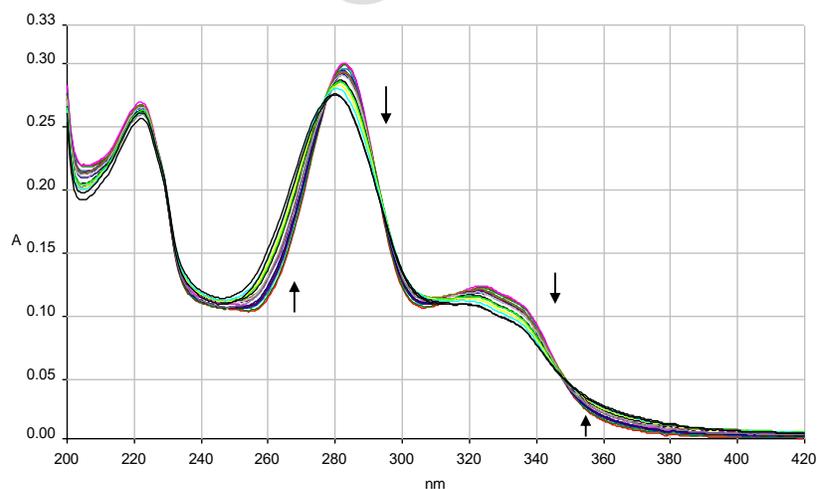


Figura 64. Fotodegradación del éster naftílico de Lomefloxacin en UVA.

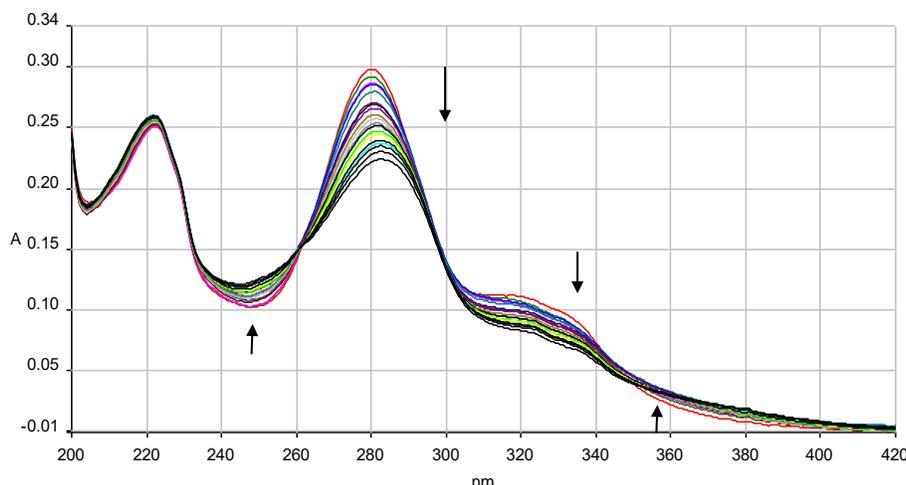


Figura 65. Fotodegradación del éster naftílico de Lomefloxacin en UVB.

En diferentes estudios de la fotólisis del Ácido Nalidíxico (quinolona de primera generación) se ha reportado que la descomposición fotoquímica de este compuesto y sus derivados era debido a la pérdida del grupo $-\text{COOH}$ en la posición 3 (Albini & Fasani, 1998). Este compuesto es el precursor de toda la gama de quinolonas utilizadas como antibióticos, entre las que están el compuesto estudiado en este trabajo, la Lomefloxacin. Para ésta, la principal vía propuesta para su fotodescomposición es por la liberación del flúor que se encuentra presente en el C-8, con un rendimiento cuántico de liberación de flúor reportado en 0,5 (Polischuk, Karaseva, Emelina, & Karasev, 2012), lo que origina el rompimiento del anillo piperazínico que se encuentra en la posición C-7 o la ciclación del grupo alquílico de la posición N-1 con el carbocatión dejado en la posición C-8 al ser liberado el flúor. Según estudios (Fasani, y otros, 1997) (Martinez, Li, & Chignell, 1997) se ha demostrado que la esterificación de la Lomefloxacin reduce la tasa de liberación de flúor seis veces, y diferentes estudios del éster metílico de este compuesto y el aislamiento y caracterización de sus productos de fotodegradación, han demostrado que la cantidad de fotoproductos obtenidos disminuye (Fasani, Mella, & Albini, 2004). Para comprobar que el paso principal de la fotodegradación de los compuestos sintetizados es la liberación del flúor en el C-8, se haría necesario el estudio de los compuestos obtenidos en la fotodegradación, mediante su aislamiento y caracterización estructural.

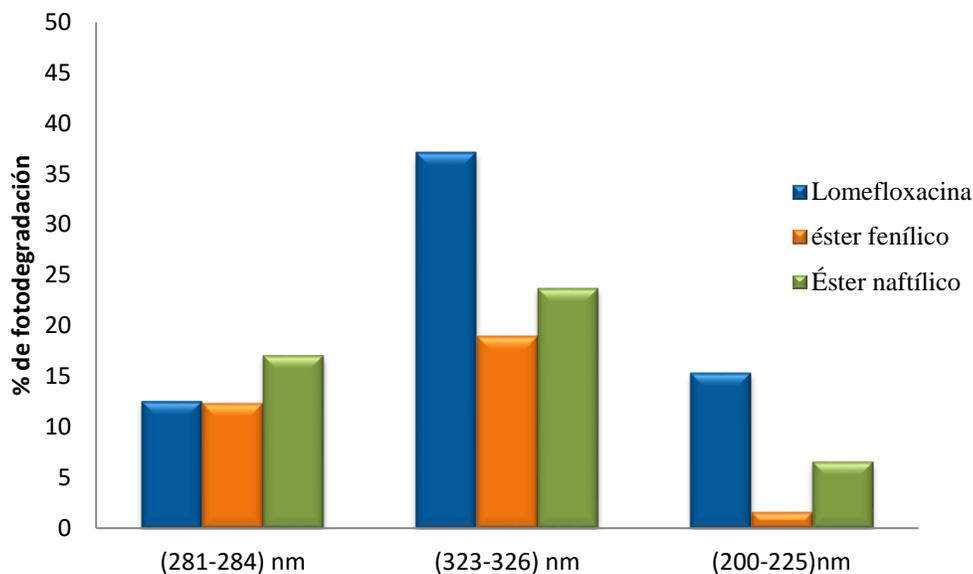


Figura 66. Porcentaje de fotodegradación de las principales bandas de los compuestos en UVA.

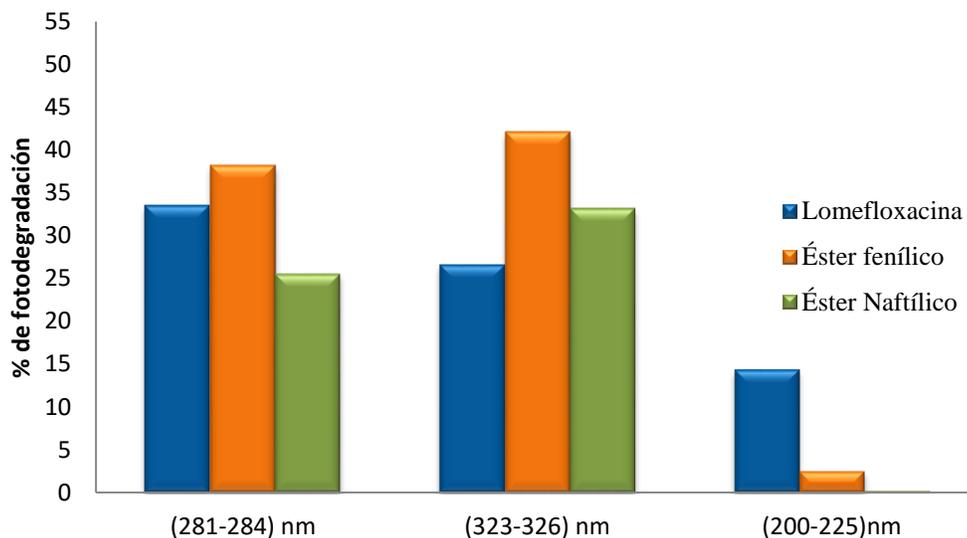


Figura 67. Porcentaje de Fotodegradación de las principales bandas de los compuestos en UVB.

En las figuras 66 y 67 podemos observar una comparación entre los porcentajes de degradación de las bandas características en los espectros UV-visibles de los compuestos de partida y los ésteres sintetizados, al ser irradiados durante 1 hora, observando que los compuestos no poseen estabilidad frente a la radiación.

9.4.1.2 Fotoestabilidad en PBS (solución de buffer fosfatado a pH 7,2)

El estudio de la fotoestabilidad en este medio, se observa que la Lomefloxacin sufre fuertes cambios en los espectros a lo largo de la exposición ante las radiaciones UVA y UVB (Figura 68 y 69), para los productos de la esterificación se observa una mayor estabilidad ante la radiación UVA que ante la UVB pero si comparamos con los espectros de la fotodegradación realizadas en agua (figura 60 y 61), los productos muestran menor estabilidad en PBS.

Se ha reportado que el rendimiento cuántico de liberación del Flúor en pH ligeramente mayor a 7 es casi del doble que en agua, alcanzando un valor aproximado de 0,98 (Martinez, Li, & Chignell, 1997), a lo cual puede atribuirse este aumento de la Fotodegradación de los compuestos en este medio.

La estabilización de la banda en los 220 nm es igualmente observada (Figuras 70, 71, 72 y 73), a pesar que se aumenta la variación de las otras dos bandas con respecto al compuesto de partida. Por lo que podemos inferir que se mantiene la integridad estructural en la esterificación realizada.

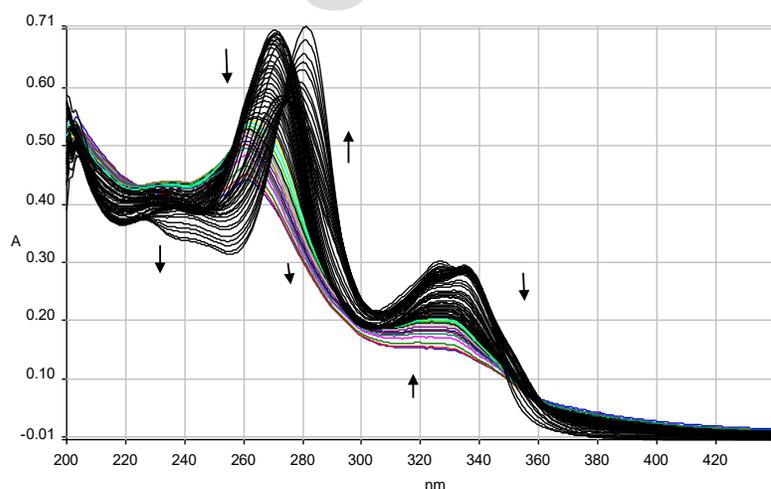


Figura 68. Fotodegradación de Lomefloxacin en UVA.

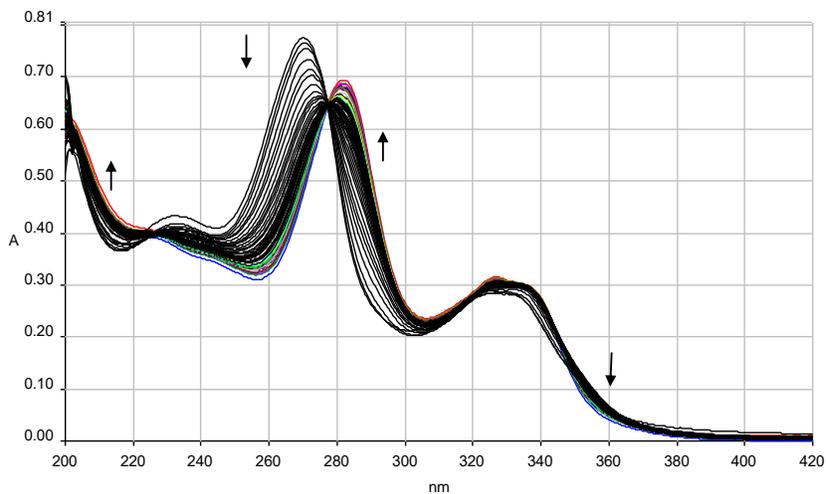


Figura 69. Fotodegradación de Lomefloxacin en UVB.

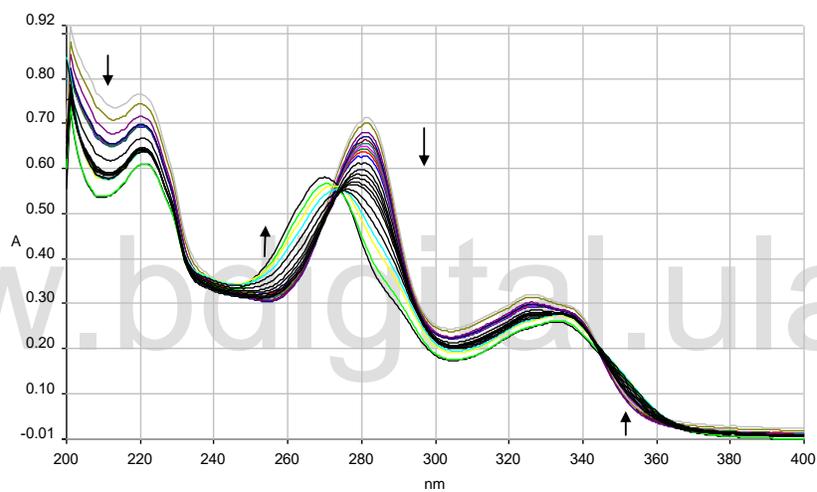


Figura 70. Fotodegradación del éster fenílico en UVA.

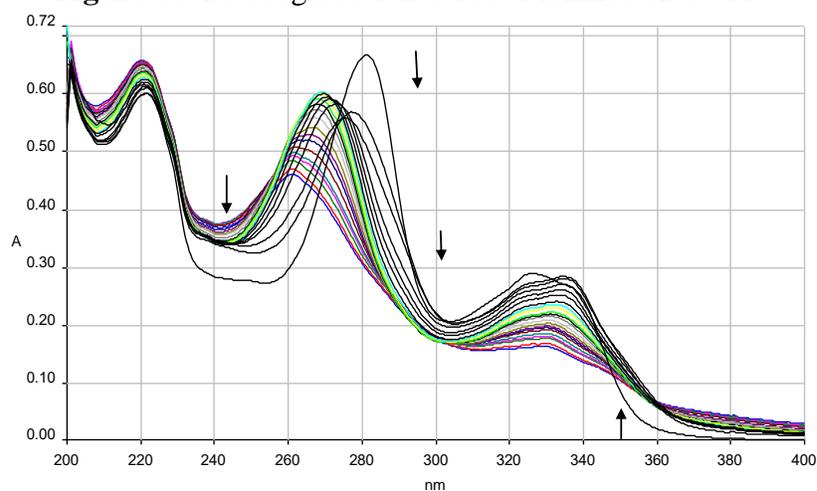


Figura 71. Fotodegradación del éster fenílico en UVB.

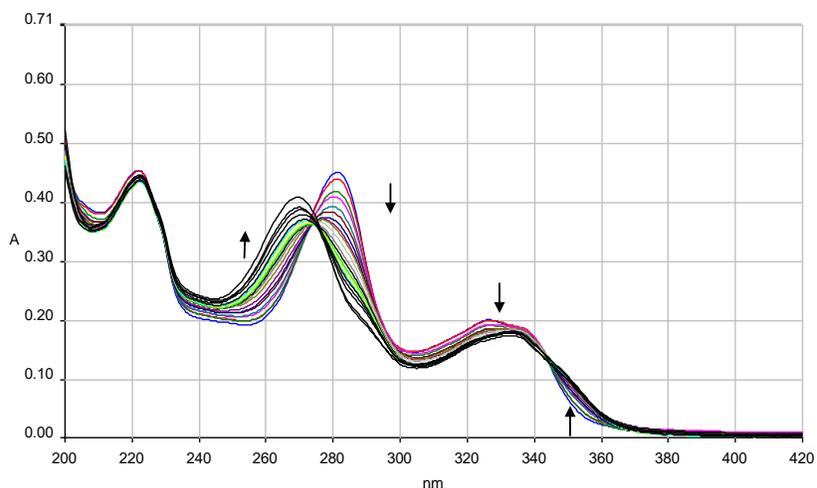


Figura 72. Fotodegradación del éster naftílico en UVA.

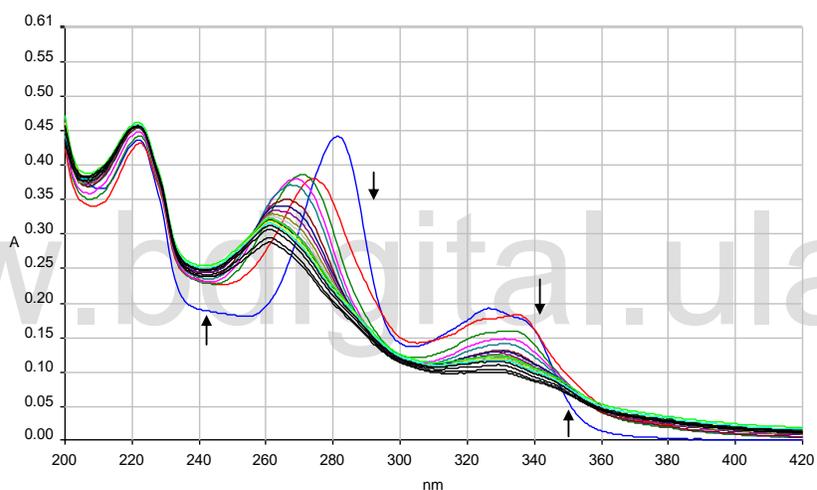


Figura 73. Fotodegradación del éster naftílico en UVB.

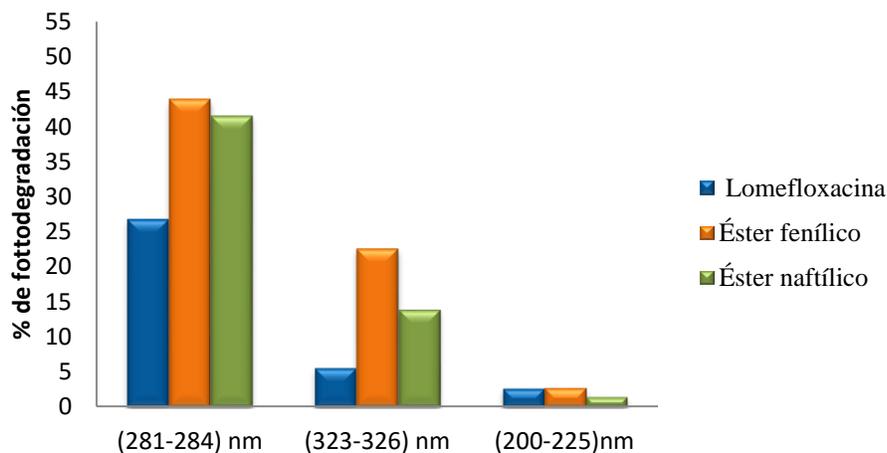


Figura 74. Porcentaje de fotodegradación de las principales bandas de los compuestos en UVA.

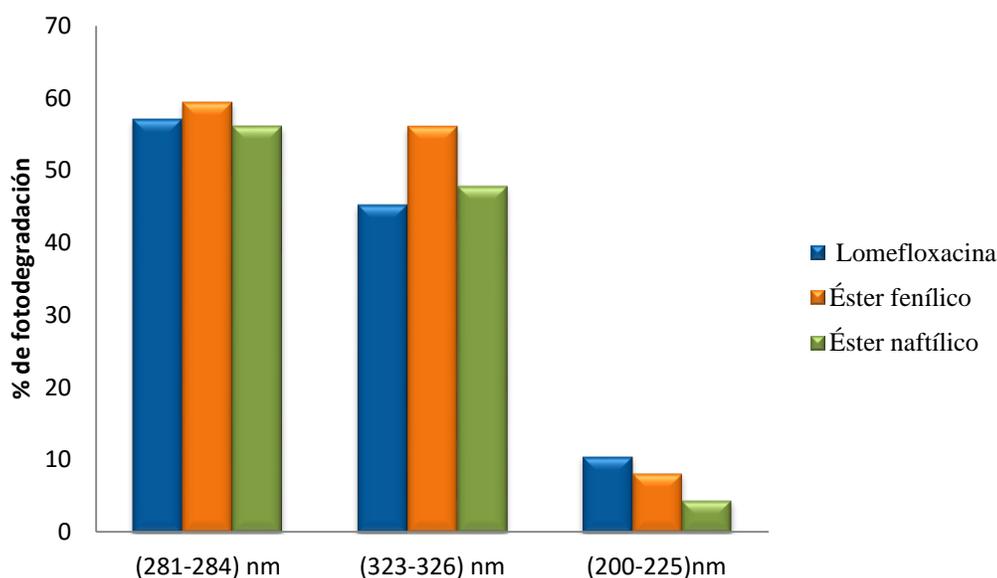


Figura 75. Porcentaje de fotodegradación de las principales bandas de los compuestos en UVB.

9.4.2 Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia.

9.4.2.1 Rendimiento Cuántico de Fluorescencia en Agua

Para la caracterización de un fotosensibilizador, es de gran importancia determinar la eficiencia de relajación fluorescente, como una función de su rendimiento cuántico, a fin de verificar la tendencia del compuesto a alcanzar el nivel singlete excitado y utilizar el fenómeno de relajación radiante como ruta para regresar a su estado fundamental (Zoltan T, 2008).

Los espectros de fluorescencia obtenidos en agua se muestran a continuación:

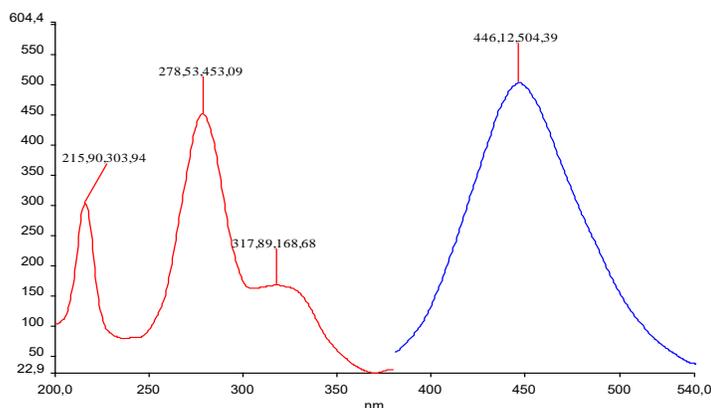


Figura 76. Espectro de fluorescencia de Lomefloxacin en agua [1×10^{-7} M].

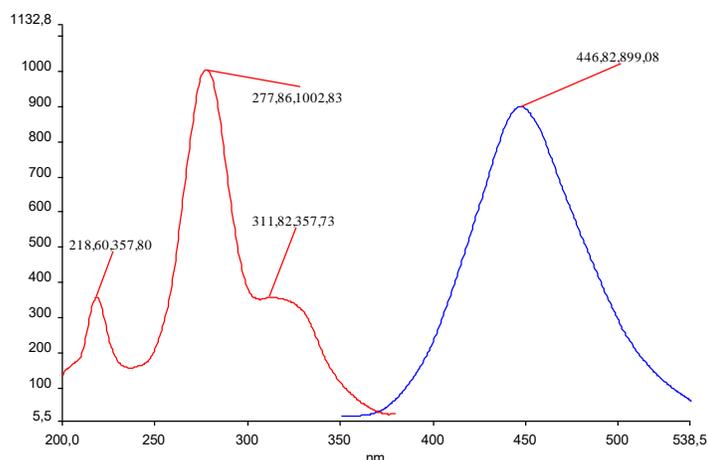


Figura 77. Espectro de fluorescencia del éster fenílico de Lomefloxacin en agua [1×10^{-6} M].

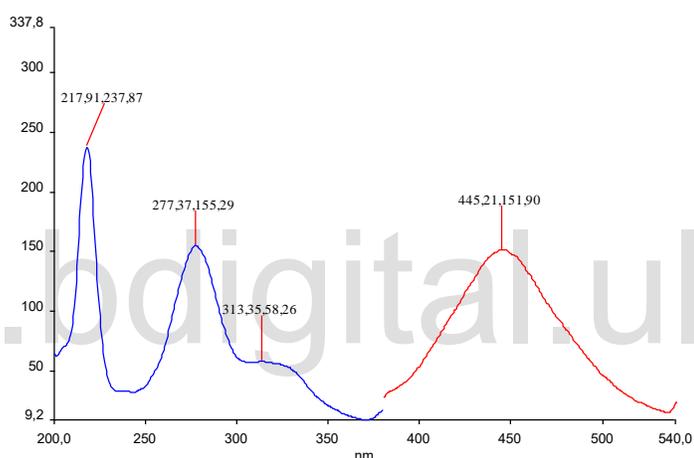


Figura 78. Espectro de fluorescencia del éster naftílico de Lomefloxacin en agua [1×10^{-7} M].

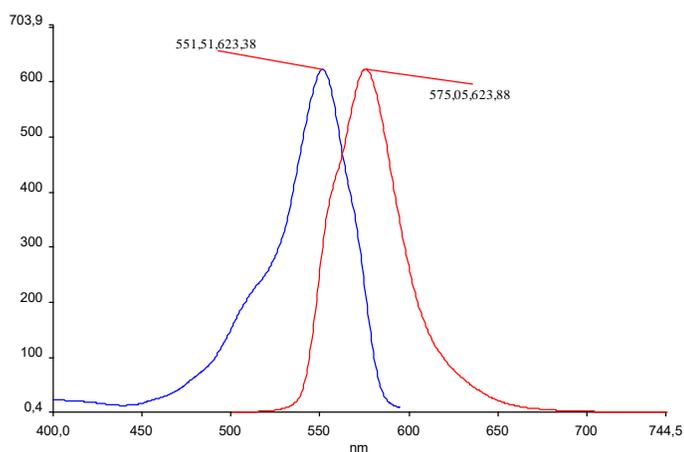


Figura 79. Espectro de fluorescencia de Rodamina B (patrón) en agua [$3,9 \times 10^{-7}$ M].

La tendencia que se observa para los ϵ se mantiene para los rendimientos cuánticos de fluorescencia de los compuestos y es la siguiente:

Lomefloxacin> éster fenílico de Lomefloxacin > éster naftílico de Lomefloxacin

Tabla 20 podemos observar que no existen diferencias significativas entre las longitudes de onda de emisión de los compuestos, ya que se ha reportado que la fluorescencia de estos compuestos es debido a las transferencia electrónica entre el heteroátomo y el sistema π conjugado de los anillos aromáticos (Polischuk, Karaseva, Emelina, & Karasev, 2012), y como esta parte de la molécula no ha sido modificada, la emisión por radiación fluorescente se mantiene en los 3 compuestos a la misma longitud de onda.

Comparando los rendimientos cuánticos de fluorescencia (figura 80) podemos observar que existe una relación directa entre las variaciones de los coeficientes de absorción molar (Tabla 18) y los rendimientos cuánticos de fluorescencia, pudiendo inferir así que la vía principal de desactivación que utilizan los 3 compuestos es por relajación fluorescente.

La tendencia que se observa para los ϵ se mantiene para los rendimientos cuánticos de fluorescencia de los compuestos y es la siguiente:

Lomefloxacin> éster fenílico de Lomefloxacin > éster naftílico de Lomefloxacin

Tabla 20. Rendimientos Cuánticos de Florescencia en Agua

| Compuesto | λ abs (nm) | λ emis (nm) | Φ_f |
|---------------------------------|--------------------|---------------------|-------------|
| Rodamina B | 551,51 | 575,05 | 0,31 |
| Lomefloxacin | 278,53 | 446,12 | 0,46 |
| Éster fenílico de Lomefloxacin | 277,86 | 446,82 | 0,24 |
| Éster naftílico de Lomefloxacin | 277,37 | 445,21 | 0,14 |

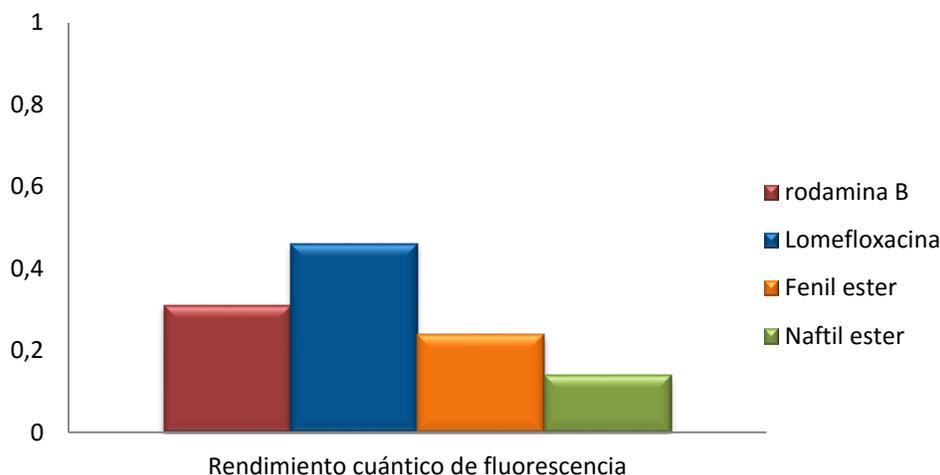


Figura 80. Comparación rendimiento cuántico de fluorescencia en Agua

9.4.2.2 Rendimiento Cuántico de Fluorescencia en PBS (solución de buffer fosfatado a pH 7,2)

De igual manera se realizó el estudio del rendimiento cuántico de fluorescencia variando el pH e incluyendo sales disueltas en el medio.

Los espectros de fluorescencia obtenidos se muestran a continuación:

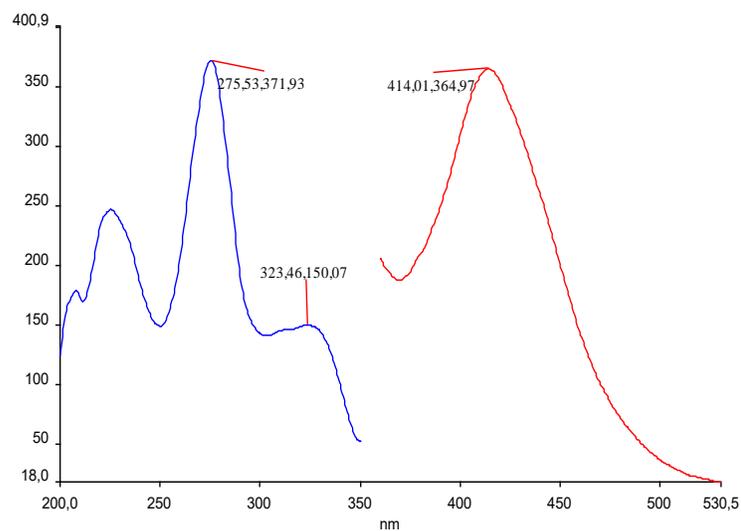


Figura 81. Espectro de fluorescencia de Lomefloxacin en PBS [$1,2 \times 10^{-7}$ M].

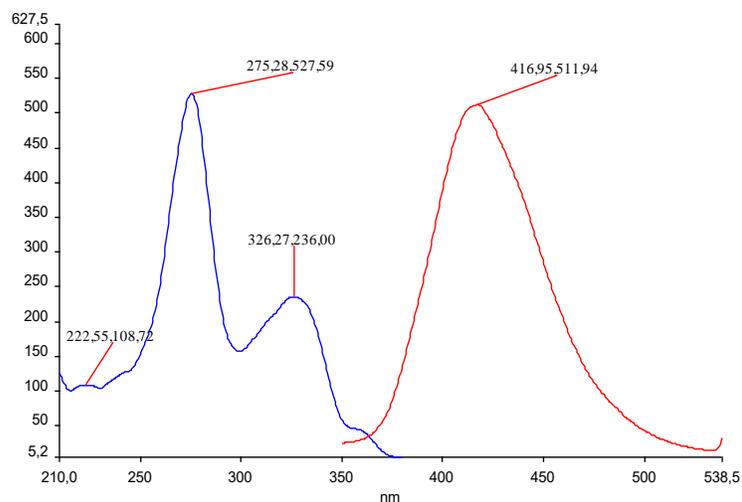


Figura 82. Espectro de fluorescencia del éster fenílico de Lomefloxacin en PBS [3×10^{-7} M].

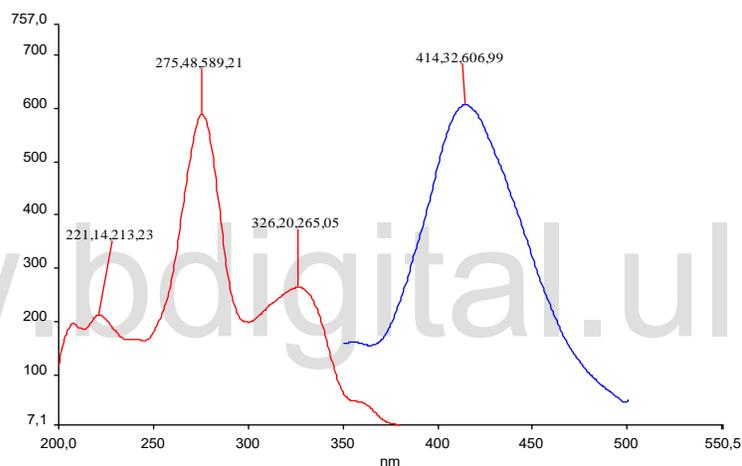


Figura 83. Espectro de fluorescencia del éster naftílico de Lomefloxacin en PBS [5×10^{-7} M].

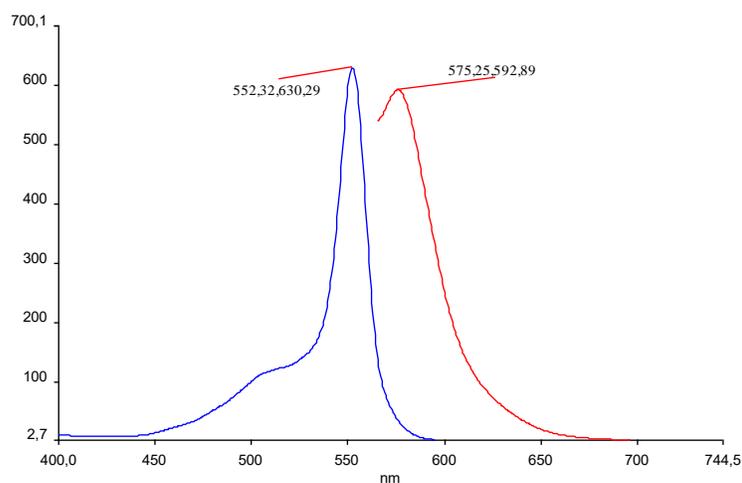


Figura 84. Espectro de fluorescencia de la Rodamina B en PBS [$4,9 \times 10^{-7}$ M].

En la Tabla 21 podemos observar que las longitudes de onda de emisión con respecto a las obtenidas en agua tienen un desplazamiento hacia el rojo de aproximadamente 30 nm, y que los rendimientos cuánticos de fluorescencia de los esteres aumentan con respecto a los obtenidos en agua, observando así un comportamiento diferente con la variación del pH y las sales disueltas en el medio, pudiéndose atribuir esto a un aumento en la simetría del estado excitado con respecto al estado fundamental.

Tabla 21. Rendimientos Cuánticos de fluorescencia en PBS.

| Compuesto | λ abs (nm) | λ emis (nm) | Φ_f |
|----------------------------------|--------------------|---------------------|-------------|
| Rodamina B | 552,32 | 575,25 | 0,31 |
| Lomefloxacina | 275,53 | 414,01 | 0,40 |
| Éster fenílico de Lomefloxacina | 275,48 | 414,32 | 0,32 |
| Éster naftílico de Lomefloxacina | 275,28 | 419,5 | 0,29 |

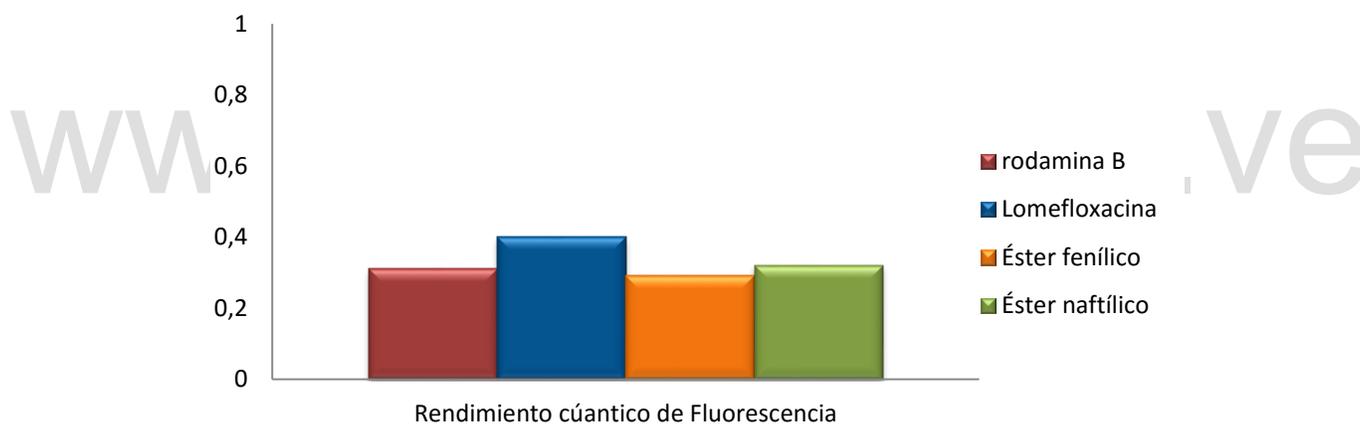


Figura 85 Comparación rendimiento cuántico de fluorescencia en PBS

La tendencia que se observa para los rendimientos cuánticos de fluorescencia varía en PBS observándose la tendencia

Lomefloxacina >éster naftílico de Lomefloxacina > éster fenílico de Lomefloxacina.

9.4.3 Determinación del rendimiento cuántico de oxígeno singlete.

La determinación de la eficiencia de formación del $^1\text{O}_2$ es de vital importancia en la caracterización de nuevos fotosensibilizadores que utilizan el mecanismo tipo II (transferencia energética) para ser utilizados en las fototerapias (Vargas, y otros, 2008).

El oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), es una especie altamente oxidativa que ha sido ampliamente estudiada fotoquímicamente, es fácilmente generada debido a la disponibilidad del oxígeno molecular en los medios biológicos, y debido a que reacciona con diversos componentes de la membrana celular para provocar la muerte de la célula; es de gran uso en la fototerapia dinámica.

Como se mencionó anteriormente (sección 7.4.3), las determinaciones de la formación $^1\text{O}_2$ se llevaron a cabo utilizando metodologías indirectas. Se llevó a cabo la degradación de la histidina en presencia de nitrosoanilina. Es de hacer destacar que los controles en ausencia de radiación no mostraron degradación apreciable de la histidina.

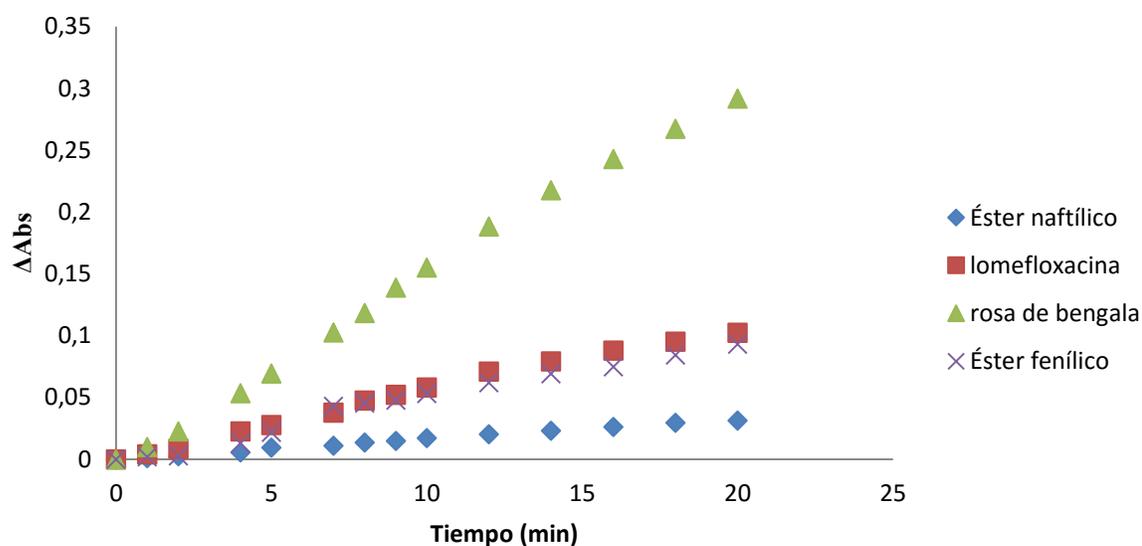


Figura 86. Producción de Oxígeno Singlete de los Compuestos y la Rosa de Bengala al ser irradiados con luz UVA en agua.

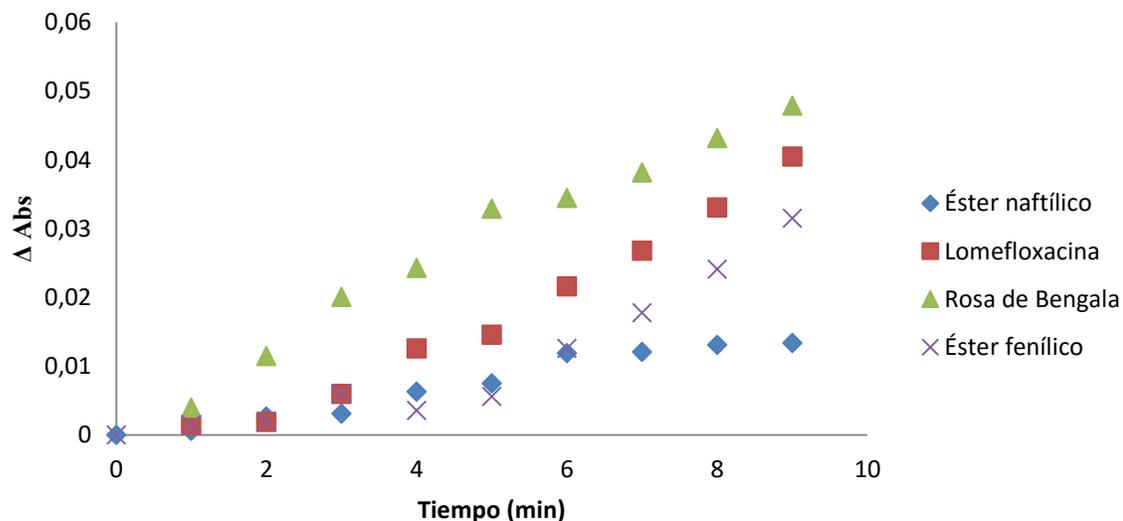


Figura 87. Comparación de la Producción de Oxígeno Singlete de los compuestos y la Rosa de Bengala al ser irradiados con luz UVA en PBS.

Para la cuantificación del $^1\text{O}_2$ producido por los compuestos, se utilizaron curvas de calibración, en función de los cambios de absorbancia del reactivo selectivo (nitrosoanilina), como una función del cambio de concentración, el cual se puede relacionar directamente en el sistema experimental, con la concentración de $^1\text{O}_2$ producido. (Zoltan, Vargas, & Izzo, 2007)

Para la determinación del rendimiento cuántico de formación de $^1\text{O}_2$ ($\Phi_{^1\text{O}_2}$) se utilizó como patrón la Rosa de Bengala, cuyos valores de rendimiento cuántico se encuentran reportados (Redmond & Gamblin, 1999).

Los rendimientos cuánticos obtenidos luego de ser calculados con la ec. 2 son mostrados a continuación:

Tabla 22. Rendimientos cuánticos de fluorescencia en agua y PBS.

| Compuesto | Δ Absorbancia en t= 20 min (agua) | $\Phi_{^1\text{O}_2}$ | Δ Absorbancia en t= 9 min (PBS) | $\Phi_{^1\text{O}_2}$ |
|------------------------|--|-----------------------|--|-----------------------|
| Rosa de Bengala | 0,2919 | 0,75 | 0,0479 | 0,75 |
| Lomefloxacina | 0,1023 | 0,26 | 0,0405 | 0,63 |
| Éster fenílico | 0,0931 | 0,24 | 0,0315 | 0,49 |
| Éster naftílico | 0,0312 | 0,08 | 0,0134 | 0,21 |

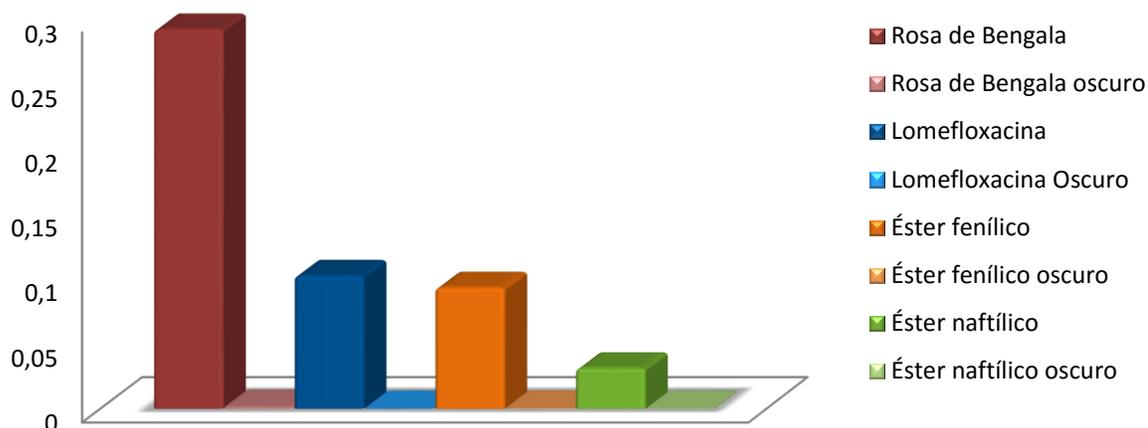


Figura 88. Comparación entre la producción de Oxígeno Singlete de los compuestos irradiados y a oscuras en agua.

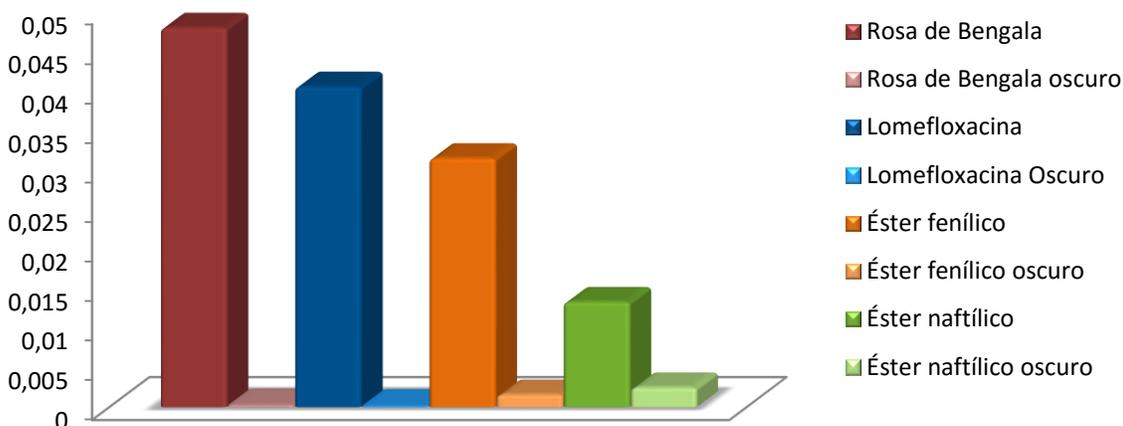


Figura 89. Comparación en la producción de Oxígeno Singlete entre los compuestos irradiados y a oscuras en PBS.

La tendencia observada para los rendimientos cuánticos de formación de $^1\text{O}_2$ es la siguiente

Lomefloxacina > éster fenílico de Lomefloxacina > éster naftílico de Lomefloxacina.

Podemos observar que el rendimiento cuántico de $^1\text{O}_2$ para el éster naftílico de Lomefloxacina disminuye drásticamente en agua (en comparación con los otros dos compuestos) y tiene una variación significativa cuando es realizado en PBS, aunque se mantiene con un valor menor que para los demás compuestos.

La generación de oxígeno singlete involucra la transferencia de energía desde el estado triplete excitado de la molécula del sensibilizador a la molécula en estado basal del oxígeno circundante (Vargas, y otros, 2008). Cinéticamente hablando, la eficiencia de dicha transferencia se encuentra afectada por la velocidad (o tiempo de vida media) del resto de los mecanismos de desactivación de la molécula excitada. Se puede observar que la inclusión de grupos resonantes disminuye el tiempo de vida media del estado triplete, por lo que se puede inferir que dicha disminución, trae como consecuencia pérdida de eficiencia en la transferencia energética hacia el oxígeno, aumentando la eficiencia de otros mecanismos de desactivación (térmicas o no radiantes), perdiéndose el estado triplete excitado sin transferencia de energía hacia el oxígeno molecular.

Se obtiene un aumento apreciable en la producción de la especie oxidativa cuando se varía el medio, y esto puede ser atribuido a un aumento en la estabilización del estado triplete excitado lo que aumenta el tiempo de vida medio de este estado, con una consecuente disminución de los demás procesos de relajación.

9.4.4 Determinación de producción de radicales libres oxigenados.

Como mencionamos en la sección anterior, la determinación de la eficiencia en la producción de oxígeno singlete es de gran importancia, debido a que es una de las especies involucrada en las reacciones mediadas por fotosensibilizadores (mecanismos tipo II), pero no es la única especie reactiva de oxígeno. Especies tales como: anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (OH^\bullet) son también producidos mediante mecanismos tipo I. De esta manera podemos ver que, la determinación de dichas especies reactivas de oxígeno, producidas mediante transferencia electrónica (tipo I), concluye la completa caracterización fotoquímica de los sensibilizadores obtenidos (Vargas, y otros, 2008).

La determinación fue llevada a cabo utilizando la metodología descrita anteriormente (sección 7.4.4) utilizando quimioluminiscencia y reacciones enzimáticas en función de la producción de peróxido de hidrógeno. Se utilizaron dos tiempos de irradiación diferentes 15 y 20 minutos (Figura 90), no observándose producción de radicales libres en ausencia de radiación. Con el fin de establecer de manera cuantitativa la contribución del anión superóxido en la formación de H_2O_2 se realizaron estudios en presencia de SOD (Figura 91 y 92).

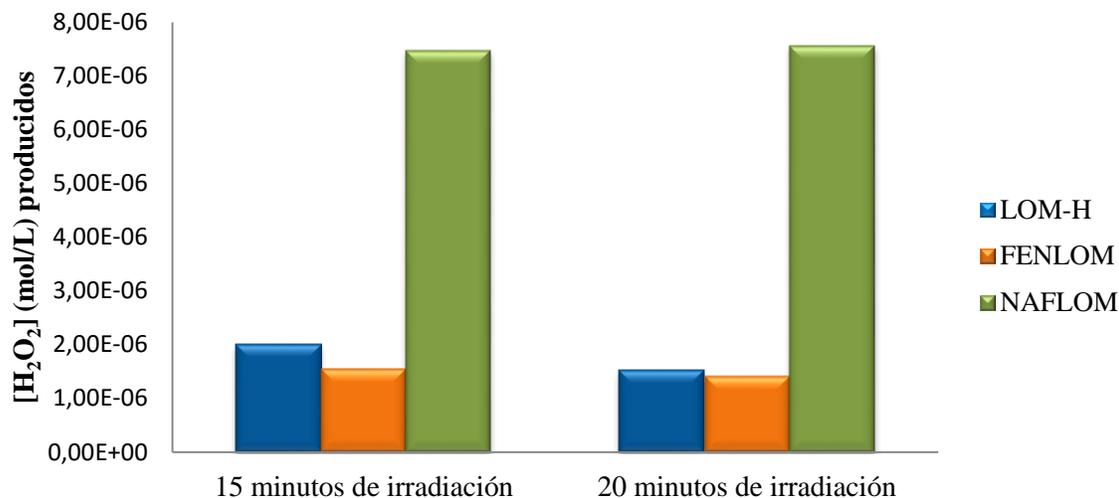


Figura 90. Comparación de la producción de $[H_2O_2]$ de los compuestos a diferentes tiempos de irradiación.

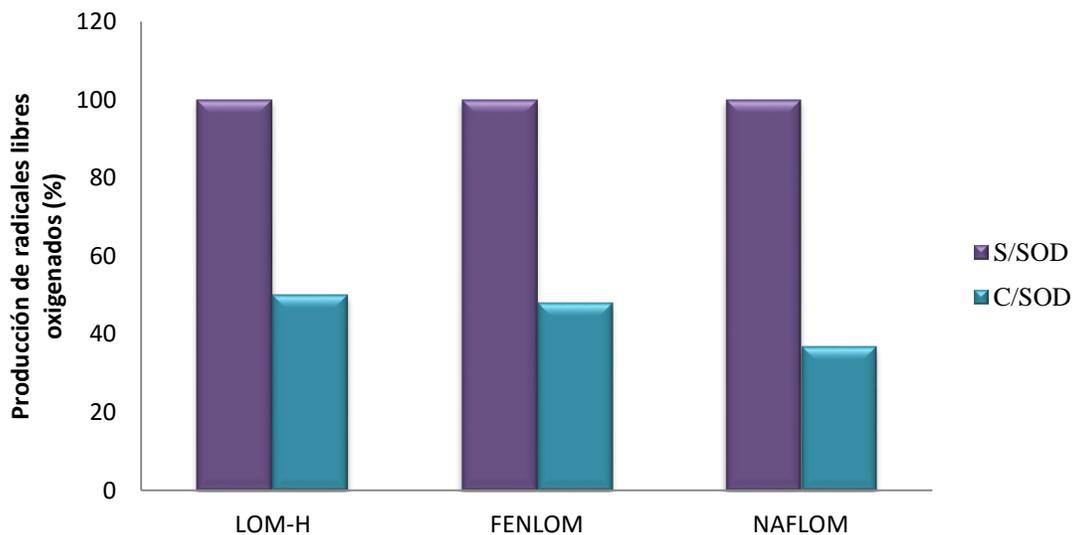


Figura 91. Efecto de la SOD en la producción de radicales libres oxigenados en 15 minutos de irradiación.

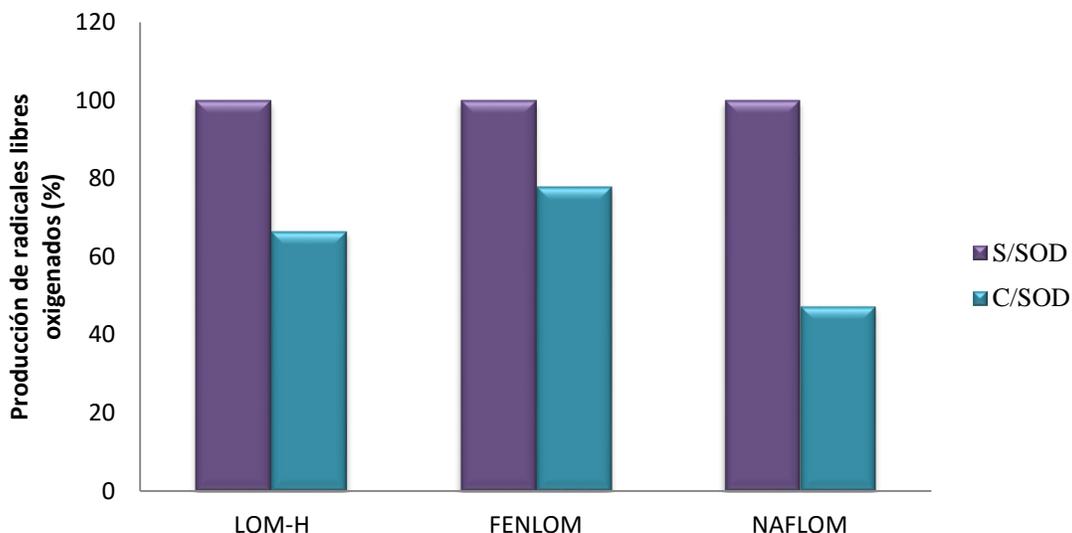


Figura 92. Efecto de la SOD en la producción de radicales libres oxigenados en 20 minutos de irradiación.

En la Figura 90 podemos observar que la tendencia de la producción de radicales libres por parte de los compuestos es la siguiente:

Éster naftílico de Lomefloxacin > Lomefloxacin > éster fenílico de Lomefloxacin

Esta tendencia nos indica que la principal vía de interacción del éster naftílico de Lomefloxacin en su estado triplete excitado con el oxígeno molecular es la transferencia electrónica, lo cual indica que dicho fotosensibilizador tendría una acción principalmente mediante el mecanismo tipo I.

Si comparamos los valores de rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete con los porcentajes de producción de radicales libres oxigenados, podemos observar que para el éster fenílico se observa una preferencia por el mecanismo tipo II (mayor producción de oxígeno singlete) que para la transferencia electrónica, al contrario, para el éster naftílico, se observa una marcada preferencia por la producción de radicales libres oxigenados (mecanismo tipo I) que por la transferencia energética al oxígeno.

En cuanto a los ensayos con SOD (Figura 91), podemos observar que para el éster naftílico se obtiene una mayor disminución de la señal, indicando una mayor contribución del anión

superóxido, indicándonos que el éster fenílico y la Lomefloxacin producen de manera preferencial radicales del tipo hidroxilo.

Si comparamos la producción de los radicales libres oxigenados con respecto al tiempo de irradiación, no observamos diferencias significativas en la variación de los moles/L de H_2O_2 producidos por los 3 compuestos, pero al observar el efecto de la inhibición de la señal del peróxido por parte del SOD, a mayor irradiación el compuesto éster naftílico aumenta su producción del anión superóxido, de igual manera se observa una menor inhibición de la señal para el éster fenílico, lo que nos indica que su producción de radicales del tipo hidroxilo va aumentando a medida que son irradiados.

9.4.5 Determinación de la actividad antibacteriana fotoinducida

Para una valoración adecuada de los fotosensibilizadores estudiados, se hace necesario ensayos de fotoinactivación bacteriana, más aún si tomamos en cuenta que la caracterización fotoquímica no predice de manera exacta la actividad del fotosensibilizador (Zoltan T, 2008).

Los resultados obtenidos en el estudio se muestran a continuación:

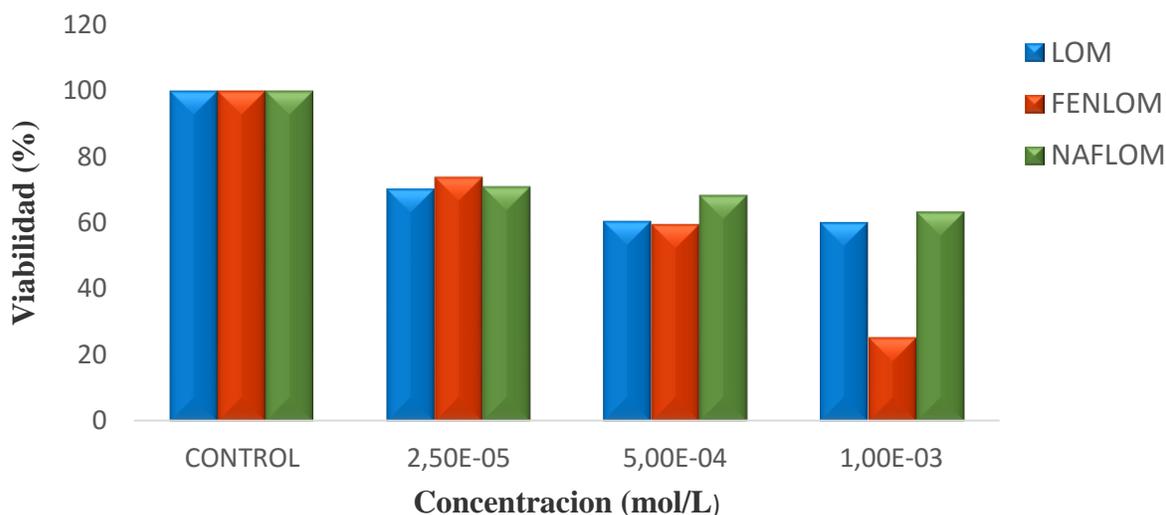


Figura 93. Comparación de la fotoinactivación de *E. coli* por parte de los compuestos sintetizados y el compuesto de partida.

Como podemos observar, en todos los compuestos estudiados, al aumentar la concentración del compuesto se observa una disminución en la viabilidad bacteriana.

Para la Lomefloxacina (compuesto de partida) podemos observar que al aumentar la concentración de $2,5 \times 10^{-5}$ M a $1,0 \times 10^{-4}$ M se observa una disminución de la viabilidad, es decir, hay un aumento en la actividad antibacteriana, comportamiento que no varía al aumentar a $1,0 \times 10^{-3}$ M (no se observan cambios en la viabilidad), En cambio, para los productos sintetizados (FENLOM y NAFLOM) se observa un aumento de actividad a medida que se aumenta la concentración del compuesto.

Comparando el comportamiento de los dos productos de la reacción, se puede observar que el éster fenílico de Lomefloxacina aumenta en gran proporción (casi 40%) la inhibición de la actividad al aumentar la concentración de éste en dos órdenes de magnitud, en cambio el éster naftílico de Lomefloxacina sólo disminuye aproximadamente un 10% la viabilidad bacteriana al aumentar en la misma proporción la concentración.

Por su parte, el éster naftílico de Lomefloxacina, a pesar de mostrar un aumento gradual de la actividad antibacteriana al aumentar su concentración, demuestra menor disminución de la viabilidad que el compuesto de partida.

Con el fin de analizar cuál es el mecanismo principal actuando en la fotoinactivación bacteriana debemos tomar en cuenta los resultados de los estudios fotoquímicos realizados.

La Lomefloxacina es el compuesto que demuestra mayor producción de las dos especies reactivas de oxígeno (Oxígeno Singlete y radicales libres oxigenados), pero podemos inferir que debido a que su fotodegradación es muy alta, pierde su actividad antibacteriana y al comparar con el derivado éster fenílico es menor.

En el éster fenílico se observa una preferencia por el mecanismo tipo II (mayor producción de oxígeno singlete) que para la transferencia electrónica. Por el contrario, para el éster naftílico se observa una marcada preferencia por la producción de radicales libres oxigenados (mecanismo tipo I) que por la transferencia energética al oxígeno, siendo éste el compuesto que demostró menor producción de especies reactivas de oxígeno en todas las pruebas fotoquímicas realizadas.

El éster fenílico de Lomefloxacin muestra mayor actividad antibacteriana fotoinducida por lo cual podemos concluir que son las reacciones de tipo II las que producen mayor daño en el ADN celular, que es el mecanismo reportado para la acción del $^1\text{O}_2$ sobre las bacterias. (Zoltan T, 2008).

www.bdigital.ula.ve

10. CONCLUSIONES

- Se logró un aumento en el rendimiento de reacción de las esterificaciones, al desplazar el equilibrio de la reacción hacia la formación de los productos mediante la utilización de un exceso del alcohol, logrando un rendimiento de reacción para ambos productos mayor del 70%.
- Al realizar los lavados de los productos con un solvente poco polar, en el cual nuestros productos eran muy poco solubles, se logró disminuir la pérdida de estos en los lavados.
- La caracterización espectroscópica de los productos demostró la inclusión de los grupos aromáticos en la estructura de la Lomefloxacina.
- Se logró un aumento en la estabilidad de los compuestos derivados (respecto a la Lomefloxacina) ante radiaciones UVA y UVB, como muestran en el UV-Vis las bandas de la esterificación.
- Según las características fotoquímicas observadas en los ésteres sintetizados, podemos decir que en el éster fenílico se observa una preferencia por el mecanismo tipo II (mayor producción de oxígeno singlete) que para la transferencia electrónica. Por el contrario, para el éster naftílico se observa una marcada preferencia por la producción de radicales libres oxigenados (mecanismo tipo I).
- A pesar que el éster naftílico de Lomefloxacina demuestra menos actividad antibacteriana que su predecesor, la Lomefloxacina, su estabilidad ante las radiaciones UVA y UVB es mayor, por lo tanto se recomienda su uso como fotosensibilizador en la fototerapia dinámica antibacteriana.
- El compuesto que presentó mayor actividad antibacteriana fotoinducida fue el éster fenílico de Lomefloxacina, y esto puede ser atribuido a la formación de especies reactivas de oxígeno, en su mayoría oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), y la fuerte acción que esta especie tiene sobre la inhibición de la viabilidad celular.

11.RECOMENDACIONES

- Se sugiere el estudio de la estructura de los compuestos obtenidos luego de la radiación, aislándolos y caracterizándolos estructuralmente para comprobar que la descomposición es debido a la liberación del flúor y todas las variaciones estructurales que se derivan de esto.

www.bdigital.ula.ve

12. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, M., & MacGowan, A. (2003). Development of the quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51: 1-11.
- Araki, T., & Kitahoka, H. (1998). ESR Detection of Free Radical and Active Oxygen Species Generated during Photolysis of Fluoroquinolones. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 46: 1021-1026.
- Bezman, S., Burtis, P., TPJ, I., & Thayer, M. (1978). Photodynamic inactivation of E. coli by Rose Bengal immobilized on polystyrene beads. *Photochemistry and Photobiology*, 28: 325-329.
- Bosca, F., Miranda, M., & Vargas, F. (1990). New photodegradation pathways for naproxen, a phototoxic nonsteroidal antiinflammatory drug. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 54: 131-143.
- Castell, J., Gomez, M., Miranda, M., & Morera, I. (1987). Photolytic degradation of ibuprofen: toxicity of the isolated photoproducts and fibroblast and erythrocytes. *Photochemistry and Photobiology*, 46: 991-996.
- Chang R. (2002). *Química*. Bogotá: McGraw-Hill.
- Contreras R. (2007). *El Origen del color en la naturaleza*. Merida-Venezuela: Universidad de Los Andes.
- Dahl, T. (1987). Pure singlet oxygen cytotoxicity for bacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 46: 345-352.
- El-Bary, A., Soliman, I., Ali, M., El-Wahed, T., & El-Menshawee, S. (2005). The Photostability Study of Gatifloxacin under stressed conditions. *Journal of the Medical Research Institute*, 26: 128-136.
- Fasani E., M. M. (2004). Photochemistry of the phototoxic drug Lomefloxacin: paths observed in the presence of amines or NaOH and from methyl ester. *European Journal of Organic Chemistry*: 5057-5082.

- Fasani, E., Profumo, A., & Albini, A. (1998). Structure and Medium-Dependent Photodecomposition of Fluoroquinolones Antibiotics. *Photochemistry and Photobiology*, 68: 666-674.
- Ferguson, J., Phillips, G., McEwan, J., Moreland, T., & Johnson, B. (1988). Loss of Antibiotic activity caused by photodegradation: in vitro studies. *British Journal of Dermatology*, 119: 550-551.
- Fernandez E, S. G. (2005). Relación Estructura-fotoestabilidad y fototoxicidad de fluoroquinolonas. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 71: 835-848.
- Fontal B, S. T. (2005). *El Espectro Electromagnético*. Mérida-Venezuela: CELCIEC_ULA.
- García D. (2005). *Fotosensibilización y el sensibilizador: síntesis, propiedades y limitaciones*. Madrid: S. Safe, Editor.
- Halkin H. (1988). Adverse Effects of the fluoroquinolones. *Reviews of Infectious Diseases*, 10: 550-551.
- Korineck, M., Klinger, P., Dedic, R., Psencik, J., Svoboda, A., & Hala, J. (2007). Delayed fluorescence of meso.tetraohenylnporphyrin in acetone and in dimethylsulphoxide. *Journal of Luminescence*, 122: 247-249.
- Leyva S, L. E. (2008). Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Boletín de la Sociedad Química de México*, 2: 1-13.
- Martinez, L., Sik, R., & Chignell, C. (1998). Fluoroquinolone Antimicrobials: Singlet Oxygen, Superoxide and Phototoxicity. *Photochemistry and Photobiology*, 67: 399-403.
- Matsumoto, M., Kojima, K., Nagano, H., Matsubara, S., & Yokota, T. (1992). Photostability and Biological Activity of Fluoroquinolones Substituted at the (Position after UV irradiation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36: 1715-1719.

- Mosinger, J., & Micka, Z. (1997). Quantum yields of singlet oxygen of metal complexes of meso-tetrakis(sulphonatophenyl)porphine. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 77-82.
- Quintero B, M. M. (2000). Mechanism of Photosensitization induced by drugs: a general survey. *Ars Pharmaceutica*, 41: 27-46.
- Ray, R., Agrawal, N., Misra, R., Farooq, M., & Hans, R. (2006). Radiation-induced in vitro Phototoxic Potential of Some Fluoroquinolones. *Drugs and Chemical Toxicology*, 1: 25-38.
- Shah, S., Rathod, I., Savale, S., & Patel, D. (2002). Determination of bioequivalence of lomefloxacin tablets using urinary excretion data. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30: 1319-1329.
- Vargas F. (2002). *Advances in Biomedical Applications of Photochemistry & Photobiology*. Trivandrum-India: Research Singpost.
- Vargas, F., & Martinez, I. (2000). *Principios Básicos de Fotoquímica y Fotobiología*. Caracas: Centro de Estudios Avanzados - Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas CEA-IVIC.
- Vargas, F., Rivas, C., & Machado, R. (1991). Decarboxylation and singlet oxygen production in the photolysis of nalidixic acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 11: 81-85.
- Vargas, F., Rivas, C., Fernandez, A., Florez, Y., & Padrón, L. (2006). Photodegradation and Phototoxicity of antibacterial agents and the new alternatives for the photo-inactivation of microorganisms. *Revista de la Facultad Experimental de La Universidad del Zulia*, 14: 210-217.
- Vargas, F., Zoltan, T., Ramirez, A., Cordero, T., Chavez, V., Izzo, C., . . . Fuentes, A. (2009). Studies of the photooxidant properties of antibacterial fluoroquinolones and their naphthalene derivatives. *Pharmazie*, 64: 116-122.

- Vargas, F., Zoltan, T., Rivas, C., Ramirez, A., Cordero, T., Diaz, Y., . . . Fuentes, A. (2008). Synthesis, primary photophysical and antibacterial properties of naphthyl ester cinoxacin and nalidixic acid derivates. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 92: 83-90.
- Wardle B. (2009). *Principles and Applications of Photochemistry*. Manchester, UK: Wiley & Sons.
- Zelickson AS. (1964). Phototoxic reactions With Nalidixic Acid. *Journal of the American Medical Association JAMA*: 556-557.
- Zoltan T. (2008). *Estudios Fotoquímicos de Porfirinas Metalizadas. Correlación estructura/actividad en función de estudios in vitro*. Caracas: Tesis Doctoral. Instituto Venezolano de Investigacion Cientificas.

www.bdigital.ula.ve