

Propiedades fisicoquímicas y evaluación del efecto fotocitotóxico de nuevos agentes terapéuticos © 2022 by Haniewicz, Cinthia Soledad is licensed under Creative Commons [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)



“PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y EVALUACIÓN DEL EFECTO FOTOCITOTÓXICO DE NUEVOS AGENTES TERAPÉUTICOS”

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Farm. Cinthia Soledad Haniewicz

Directora de Tesis: Prof. Dra. Cristina S. Ortiz

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica
UNITEFA-CONICET

2022

Córdoba, Argentina

**Trabajo de Tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias Químicas realizado en el
Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad
Nacional de Córdoba.**

DIRECTORA DE TESIS

Prof. Dra. CRISTINA S. ORTIZ

Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

COMISIÓN EVALUADORA DE TESIS

Prof. Dra. ELIZABETH LAURA MOYANO

Departamento de Química Orgánica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

Prof. Dra. ALICIA VIVIANA VEGLIA

Departamento de Química Orgánica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

Prof. Dr. VÍCTOR GABRIEL MORÓN

Departamento de Bioquímica Clínica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

EVALUADORA EXTERNA

Prof. Dra. MARÍA PAULINA MONTAÑA

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia
Universidad Nacional de San Luis

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
OBJETIVOS	5
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	7
1.1. GENERALIDADES.....	9
1.2. ANTECEDENTES	10
1.3. TERAPIA FOTODINÁMICA Y TERAPIA FOTODINAMICA ANTIMICROBIANA	11
1.4. FOTOSENSIBILIZADORES.....	14
<i>1.4.1. Primera generación.....</i>	<i>15</i>
<i>1.4.2. Segunda generación</i>	<i>15</i>
<i>1.4.3. Tercera Generación.....</i>	<i>16</i>
1.5. FUENTES DE LUZ	17
1.6. PROCESOS FOTOFÍSICOS Y FOTOQUÍMICOS.....	18
1.7. PROCESOS DE MUERTE CELULAR	20
<i>Terapia fotodinámica</i>	<i>20</i>
<i>Terapia fotodinámica antimicrobiana.....</i>	<i>22</i>
1.8. APLICACIONES TERAPÉUTICAS.....	23
<i>1.8.1. Oncológicas</i>	<i>24</i>
<i>1.8.2. No oncológicas.....</i>	<i>25</i>
1.9. BIBLIOGRAFÍA.....	26
CAPÍTULO 2: SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS AGENTES FOTOTERAPÉUTICOS	39
2.1. SÍNTESIS DE NUEVOS FOTOSENSIBILIZADORES DE SEGUNDA GENERACIÓN	41
<i>2.1.1. Selección de prototipos</i>	<i>44</i>
<i>2.1.2. Estrategias de síntesis.....</i>	<i>47</i>
2.2. ANÁLISIS DE TOLUIDINE BLUE O (TBO)	49
<i>2.2.1. Materiales y métodos</i>	<i>49</i>
<i>2.2.2. Resultados y discusión</i>	<i>50</i>

2.3. BROMACIÓN DE TBO	54
2.3.1. <i>Materiales y métodos</i>	54
2.3.2. <i>Resultados y discusión</i>	55
2.4. ANÁLISIS DE AZURE A-COMERCIAL (AzA)	65
2.4.1. <i>Materiales y métodos</i>	65
2.4.2. <i>Resultados y discusión</i>	65
2.5. BROMACIÓN DE AzA	67
2.5.1. <i>Materiales y métodos</i>	67
2.5.2. <i>Resultados y discusión</i>	67
2.6. SÍNTESIS DE BUCHWALD-HARTWIG	74
2.6.1. <i>Materiales y métodos</i>	74
2.6.2. <i>Resultados y discusión</i>	74
2.6.2.1. <i>Aminación de Buchwald-Hartwig de TBO</i>	75
2.6.2.2. <i>Aminación de Buchwald-Hartwig de AzA</i>	76
2.7. CONCLUSIONES PARCIALES	77
2.8. BIBLIOGRAFÍA	79
CÁPITULO 3: PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y FOTOQUÍMICAS	89
3.1. IMPACTO EN EL DESARROLLO DE NUEVOS FOTOSENSIBILIZADORES	91
3.2. CONSTANTE DE IONIZACIÓN	92
3.2.1. <i>Materiales y métodos</i>	93
3.2.2. <i>Resultados y discusión</i>	95
3.3. ESTABILIDAD FOTOQUÍMICA	96
3.3.1. <i>Materiales y métodos</i>	97
3.3.2. <i>Resultados y discusión</i>	98
3.4. PRODUCCIÓN DE OXÍGENO SINGLETE	99
3.4.1. <i>Metodología directa: Luminiscencia del oxígeno singlete</i>	102
3.4.1.1. <i>Materiales y métodos</i>	102
3.4.1.2. <i>Resultados y discusión</i>	103
3.4.2. <i>Metodologías indirectas: Fotooxidación de ácido dimalónico de 9,10-</i> <i>dimetilantraceno y 9,10-dimetilantraceno</i>	106
3.4.2.1. <i>Materiales y métodos</i>	106
3.4.2.2. <i>Resultados y discusión</i>	107
3.4.2.2.1. <i>Fotooxidación de ácido dimalónico de 9,10-dimetilantraceno</i>	107

3.4.2.2.2. Fotooxidación de 9,10-dimetilantraceno en N,N-dimetilformamida	110
3.4.2.2.3. Fotooxidación de 9,10-dimetilantraceno en N, N-dimetilformamida con Ácido Acético.....	111
3.5. CONCLUSIONES PARCIALES	113
3.6. BIBLIOGRAFÍA.....	114
CAPÍTULO 4: ESTUDIO DE AGREGACIÓN	125
4.1. INTRODUCCIÓN	127
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	129
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	130
4.3.1. Evaluación de TBO y TBOBr ₂ en N,N-dimetilformamida	130
4.3.2. Evaluación de TBO y TBOBr ₂ en metanol	132
4.3.3. Evaluación de TBO y TBOBr ₂ en etanol	134
4.3.4. Evaluación de TBO y TBOBr ₂ en mezclas N,N-dimetilformamida:agua	137
4.3.5. Evaluación de TBOBr ₂ en una mezcla N,N-dimetilformamida:agua 20:80 v/v	138
4.3.6. Evaluación de TBO y TBOBr ₂ en mezclas etanol:agua	139
4.3.7. Evaluación de TBO comercial en agua	140
4.3.8. Evaluación de AzCBr ₂ en mezclas N,N-dimetilformamida:agua y etanol:agua	141
4.4. CONCLUSIONES PARCIALES	143
4.5. BIBLIOGRAFÍA.....	144
CAPÍTULO 5: EVALUACIÓN DEL EFECTO FOTOCITOTÓXICO	153
5.1. INTRODUCCIÓN	155
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	157
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	158
5.3.1. Evaluación del efecto fotocitotóxico.....	158
5.3.2. Determinación del mecanismo fotodinámico	160
5.4. CONCLUSIONES PARCIALES	162
5.5. BIBLIOGRAFÍA.....	162
CONCLUSIONES GENERALES	169
PROYECCIONES	173
ABREVIATURAS	177

RESUMEN

Esta Tesis Doctoral tuvo como finalidad el desarrollo de nuevos agentes fototerapéuticos para su potencial aplicación en terapia fotodinámica (TFD) y terapia fotodinámica antimicrobiana (TFDA) destinadas al tratamiento de patologías oncológicas y no oncológicas, respectivamente. Ambas alternativas terapéuticas han demostrado resultados promisorios y se sustentan en la utilización de fotosensibilizadores (Fs), compuestos químicos capaces de absorber luz de determinada longitud de onda, generando especies reactivas del oxígeno responsables de la muerte celular.

Se sintetizaron nuevos Fs de segunda generación a partir de modificaciones estructurales sobre prototipos de la familia de fenotiazinas, toluidine blue O (TBO) y azure A (AzA), con la finalidad de mejorar su eficacia fotodinámica. Se realizó la bromación de los reactivos de partida ensayando diferentes parámetros de síntesis para obtener los compuestos dibromados de toluidine blue O (TBOBr₂), azure C (AzCBr₂) y azure A (AzABr₂). Los nuevos Fs se analizaron por cromatografía en placa fina, cromatografía líquida de alta eficacia y espectrofotometría UV-Visible. La caracterización por espectrometría de masas de alta resolución y espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones permitió corroborar la estructura de los productos obtenidos. El Fs AzABr₂ resultó inestable en las condiciones de almacenamiento (ambiente de nitrógeno, oscuridad y baja temperatura). Por lo expuesto, se evaluaron las propiedades fisicoquímicas y fotoquímicas de TBOBr₂ y AzCBr₂. Los nuevos Fs bromados evidenciaron valores pK_a cercanos al pH fisiológico, presentaron mejores rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete que su precursor y fueron fotoquímicamente estables. Los estudios de agregación permitieron identificar a las especies monoméricas y agregadas de los Fs evaluando diferentes medios y concentraciones. Se llevaron a cabo ensayos de fotohemólisis *in vitro* de glóbulos rojos permitiendo inferir un mayor daño celular fotoinducido de TBOBr₂ con relación a TBO y AzCBr₂. Adicionalmente se determinó que los nuevos derivados presentan actividad fotodinámica principalmente mediante el mecanismo Tipo II.

ABSTRACT

The objective of this doctoral thesis was the development of new phototherapeutic agents for their application in photodynamic therapy (PDT) and antimicrobial photodynamic therapy (APDT) used for the treatment of oncological and non-oncological pathologies, respectively. These therapeutic modalities have shown promising results and are based on the administration of photosensitizers (Ps), chemical compounds that absorb light of the appropriate wavelength and generate reactive oxygen species responsible for cell death.

In this context the need to develop new second-generation Ps from structural modifications on prototypes of the phenothiazine family, toluidine blue O (TBO) and azure A (AzA), was raised in order to improve their photodynamic efficiency.

The bromination of the starting reagents was carried out by testing different synthesis parameters to obtain the dibrominated compounds of toluidine blue O (TBOBr₂), azure C (AzCBr₂) and azure A (AzABr₂). The new Ps were analyzed by thin layer chromatography, high performance liquid chromatography and UV-Visible spectrophotometry. Characterization by high resolution mass spectrometry and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy allowed corroborating the structure of the products obtained. The Ps AzABr₂ was unstable under storage conditions (nitrogen environment, darkness and low temperature). Therefore, the physicochemical and photochemical properties of TBOBr₂ and AzCBr₂ were evaluated.

The new brominated Ps showed pK_a values close to physiological pH, presented better quantum yield of singlet oxygen production than its precursor and were photochemically stable. On the other hand, the aggregation test made it possible to identify the monomeric and aggregated species of the studied Ps in different media and concentrations.

Finally, *in vitro* photohemolysis red blood cells allowed inferring a higher photodynamic activity of the TBOBr₂ in relation to TBO and AzCBr₂. Furthermore, it was determined that the new derivatives obtained present their photodynamic activity predominantly through the Type II mechanism.

OBJETIVOS

La terapia fotodinámica y terapia fotodinámica antimicrobiana son modalidades terapéuticas prometedoras para el abordaje de importantes problemáticas de salud, tales como el tratamiento de enfermedades oncológicas, no oncológicas y la resistencia de microorganismos a los agentes antimicrobianos, entre otras. Por tal motivo han experimentado en las últimas décadas un importante crecimiento y los avances científicos y tecnológicos potenciaron sus aplicaciones en diferentes campos de la medicina. Sin embargo actualmente se dispone de un número reducido de compuestos fotoactivables aprobados para su uso clínico, los cuales distan de reunir las características óptimas establecidas para un fotosensibilizador ideal. La administración de elevadas concentraciones del fármaco para alcanzar el objetivo terapéutico y la aplicación limitada al tratamiento de patologías superficiales señalan la necesidad de desarrollar nuevos agentes terapéuticos, lo que motivó el abordaje de esta Tesis Doctoral.

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al desarrollo de nuevos fotosensibilizadores que permitan optimizar el tratamiento de diversas patologías mediante la aplicación de la terapia fotodinámica y la terapia fotodinámica antimicrobiana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Sintetizar y caracterizar nuevos agentes fototerapéuticos.
- ✓ Determinar las propiedades fisicoquímicas y fotoquímicas de los nuevos fotosensibilizadores.
- ✓ Evaluar el efecto fotocitotóxico de los derivados fotoactivables.

El primer objetivo específico implicó la evaluación de las condiciones de síntesis y caracterización de nuevos fotosensibilizadores de segunda generación derivados de la familia de fenotiazinas. El desarrollo de reacciones de bromación y aminación de Buchwald-Hartwig

Objetivos

permitieron obtener derivados que incrementaron la generación de oxígeno singlete, presentaron un corrimiento batocrómico de la longitud de onda de máxima absorción y una mejora en las propiedades fisicoquímicas de los precursores.

En el segundo objetivo específico se propuso determinar un conjunto de parámetros que gobiernan diferentes procesos biológicos tales como permeabilidad celular, absorción, distribución y excreción. Asimismo fue relevante evaluar las características relacionadas a la absorción-emisión de luz y la reactividad química desencadenada por la irradiación de los agentes fototerapéuticos. En este marco se estudiaron la constante de disociación ácida, la estabilidad fotoquímica y la producción de oxígeno singlete. Adicionalmente los estudios de agregación en función de la concentración en diferentes medios orgánicos y acuosos, evidenciaron el potencial impacto en la eficacia fotodinámica.

Finalmente el efecto fotocitotóxico, definido como la respuesta tóxica ocasionada en una célula por exposición a agentes fotoactivables e irradiación con luz, se evaluó mediante ensayos de fotohemólisis *in vitro*. La ruptura de glóbulos rojos fue detectada por la liberación de hemoglobina permitiendo inferir la potencial actividad fotocitotóxica de los fotosensibilizadores en líneas celulares cancerígenas y microbianas.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL



INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. GENERALIDADES

La terapia fotodinámica (TFD) constituye una modalidad terapéutica moderna y no invasiva, aplicable al tratamiento de enfermedades no oncológicas y diferentes tipos de cáncer. Los excelentes resultados terapéuticos y la posible utilización en paralelo con otras terapias, determinan que sea viable su uso en diversas áreas de la medicina ¹. La TFD se ha empleado con éxito en campos tales como la dermatología, ginecología, urología y en distintos tratamientos oncológicos ². Esta terapia fue aprobada para su aplicación en diversos tipos de cáncer, de cabeza y cuello, piel no melanoma (carcinoma de células basales y enfermedad de Bowen), neoplasias de vejiga, ginecológicas y lesiones precancerosas (queratosis actínica) entre otras. La TFD también es ampliamente utilizada para el diagnóstico de cáncer mediante teragnosis (término que surge de la combinación de pruebas de diagnóstico y terapia), una técnica prometedora basada en la conjunción de imágenes fluorescentes y una alternativa terapéutica moderna ³.

La TFD consiste en la aplicación local o sistémica de un compuesto fotosensible, denominado fotosensibilizador (Fs), que presenta una acumulación preferencial en tejidos patológicos. Las moléculas fotosensibilizadoras absorben luz a una longitud de onda adecuada, iniciando la activación de procesos que conducen a la destrucción selectiva de las células dañadas. Esta terapia presenta una óptima tolerancia debido principalmente a su acción selectiva. Por otra parte, los tratamientos son indoloros y de simple administración, lo que permite la aplicación ambulatoria. Adicionalmente, se emplea en cuadros de inflamación crónica y es una alternativa interesante frente a infecciones bacterianas resistentes a fármacos ^{4,5}. Esta última utilización se denomina en la actualidad terapia fotodinámica antimicrobiana (TFDA), con antecedentes promisorios en el abordaje de diversas patologías ocasionadas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, virus, parásitos y hongos. La TFDA ha demostrado resultados exitosos frente a bacterias patógenas tanto en estado planctónico así como sobre la formación de biofilms ^{6,7}.

1.2. ANTECEDENTES

Los primeros antecedentes bibliográficos relativos a un "efecto fotodinámico" fueron proporcionados por Raab y Von Tappeiner^{8,9}. Ellos demostraron que ciertos compuestos sensibilizan a los microorganismos en presencia de luz de manera que tal exposición conduce rápidamente a la muerte celular. Figge y col., demostraron en 1948, que las porfirinas administradas de forma exógena, se acumulan selectivamente en los tumores murinos¹⁰. Este estudio se extendió a pacientes con cáncer, de modo tal que la aplicación de hematoporfirina condujo a la fluorescencia selectiva del tumor¹¹. El campo de la TFD clínica avanzó aún más cuando se determinó que la fluorescencia del tumor se intensifica al aplicar un "derivado" de hematoporfirina¹². La naturaleza de este material no fue revelada inicialmente y se utilizó la abreviatura "HPD", para referirse al mismo, por sus siglas en inglés, *hematoporphyrin derivative*. Estudios posteriores revelaron que es una mezcla de porfirinas, compuesta por monómeros, dímeros y oligómeros superiores¹³.

A partir de esta instancia, la evaluación de este tipo de compuestos adquirió relevancia mediante ensayos que permitieron demostrar que la formulación de HPD podía utilizarse para la localización de diferentes neoplasias a través de la fluorescencia tumoral¹⁴.

Posteriormente, en 1972, Diamond y col. publicaron el primer informe que sugiere que el procedimiento *in vivo* utilizando una preparación de hematoporfirina podría tener efectos terapéuticos. Este trabajo demostró que era factible erradicar las células de glioma tanto en cultivo celular, como así también, en tumores trasplantados en ratones¹⁵. El grupo de Dougherty, utilizando HPD, como material fotosensibilizante y distintas fuentes de irradiación, informó el tratamiento promisorio en pacientes con diversos tumores. El mismo equipo de trabajo demostró en 1979 el exitoso efecto terapéutico sobre el carcinoma de mama¹⁶⁻¹⁸. Basado en la terminología introducida inicialmente por Von Tappeiner, este procedimiento se denominó terapia fotodinámica¹³.

Gomer y col., utilizaron preparaciones radiactivas para demostrar la biodistribución de HPD. Este material fotosensibilizante se concentró en los tejidos malignos, evidenciando además acumulación en hígado, riñón y bazo. Sin embargo, al aplicar una irradiación localizada en la zona a tratar no se observaron efectos adversos en los órganos vitales antes mencionados¹⁹. Otro avance importante identificó el oxígeno singlete (1O_2), generado por efecto de la luz incidente sobre las porfirinas, como el principal agente citotóxico producido durante la TFD²⁰.

La bibliografía relativa a TFD hasta el año 1991, referencia principalmente los estudios vinculados a la biodistribución de HPD y la respuesta en animales portadores de tumores ²¹. Se identificaron los componentes "activos" como una serie de dímeros de porfirina y oligómeros superiores unidos por enlaces éter ²². El producto disponible comercialmente y aprobado en 1995 por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) consistió en HPD, excluidas las porfirinas monoméricas, el cual se denomina "Photofrin[®]" y se aplica aún en la actualidad en TFD clínica ^{13,23}.

La primera experiencia argentina en TFD, se desarrolló en el año 2000 en el Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad Nacional de Córdoba. El estudio clínico, consistió en el tratamiento de 27 pacientes que presentaban queratosis actínica, aplicando ácido 5-aminolevulínico (ALA, por sus siglas en inglés) como Fs e irradiación con una fuente de luz no coherente. Los pacientes tratados evidenciaron respuesta terapéutica y el 84% remisión completa de la patología ²⁴.

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) aprobó en el año 2008 a Photofrin[®] para el tratamiento de cáncer de esófago, esófago de Barrett y pulmón, siendo el Laboratorio Techsphere el responsable de la fabricación y comercialización de este medicamento. A partir de estos antecedentes Argentina fue el primer país de Latinoamérica en aplicar esta terapia y el procedimiento se desarrolló en el Hospital General San Martín (La Plata, Buenos Aires) empleando Photofrin[®] como agente terapéutico ²⁵.

1.3. TERAPIA FOTODINÁMICA Y TERAPIA FOTODINAMICA ANTIMICROBIANA

La TFD combina tres elementos fundamentales, luz, oxígeno molecular (O₂) y un Fs impactando selectivamente en las células tumorales mediante la actividad citotóxica. Las células malignas y macrófagos presentan una captación preferencial por este tipo de agentes terapéuticos. Los Fs se activan por exposición a la luz y reaccionan con el O₂ para producir especies reactivas del oxígeno (EROs). Estas moléculas citotóxicas inducen una serie de reacciones biológicas que finalmente conducen a la muerte celular. Los resultados de la TFD dependen de la naturaleza de las células a tratar y las condiciones lumínicas, como así también de la localización y las propiedades fisicoquímicas, fotofísicas y fotoquímicas del Fs ²⁶⁻²⁸. La

Figura 1.1 muestra de manera esquemática los pasos involucrados en la TFD, no invasiva y altamente selectiva. El primero consiste en la administración del Fs por vía intravenosa y/o tópica; este agente terapéutico se concentra en las células tumorales debido a su selectividad. Con posterioridad se irradia la zona afectada con luz de una determinada longitud de onda y en la última etapa el tumor es destruido selectivamente como consecuencia de la formación de EROs ²⁹.



Figura 1.1: Pasos involucrados en la TFD

Una ventaja representativa de la TFD es que no evidencia resistencia cruzada con la quimioterapia, ya que su mecanismo de acción es diferente al involucrado en la terapia tradicional con agentes antineoplásicos. Por lo tanto, la TFD se presenta como un tratamiento alternativo o sinérgico a la quimioterapia. Adicionalmente, esta estrategia terapéutica presenta una ventaja en términos de efectos secundarios, ya que la activación con luz láser solo se limita a la zona a tratar y la toxicidad del Fs es menor en las regiones no irradiadas, difiriendo significativamente de los fármacos antineoplásicos que desencadenan numerosos efectos adversos ³⁰.

Otra ventaja relevante de la TFD es que el organismo no adquiere resistencia, transformándola en una modalidad prometedora para el tratamiento de diferentes tipos de neoplasias de piel, esófago y pulmón, como así también, para patologías no neoplásicas, tales como aterosclerosis, degeneración macular y artritis reumatoidea, entre otras ³¹.

La TFD como todo método terapéutico presenta ciertas desventajas relacionadas con el Fs y la fuente de luz aplicada. Desafortunadamente, a pesar de la amplia diversidad de agentes fotosensibilizadores aplicados en la clínica y los que están en etapa de desarrollo, no se dispone en la actualidad de un Fs ideal (sección 1.4) ³².

La comunidad científica estudia en la actualidad la problemática relativa a la resistencia antibiótica que presentan diferentes microorganismos. En tal sentido la TFDA es una herramienta valiosa que requiere agentes fotosensibilizantes capaces de inducir la formación de EROs que provoquen, de manera eficiente y selectiva, la erradicación de distintos patógenos ³³. La estrategia de la TFDA es esencialmente coincidente con la que presenta la TFD y los alcances de la misma se muestran en la Figura 1.2.

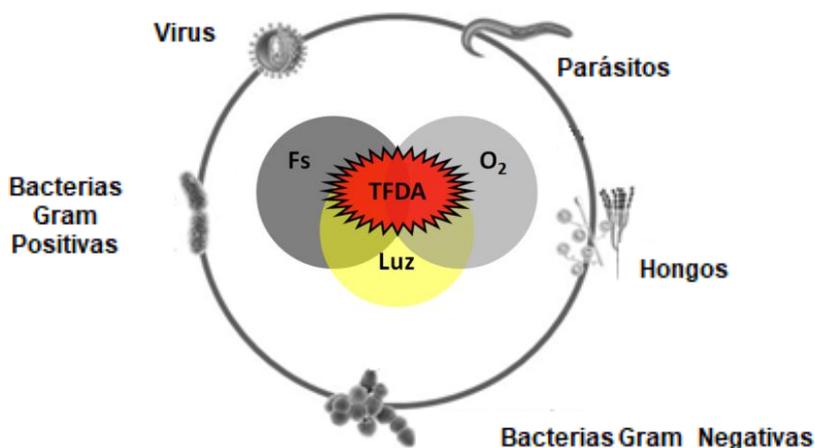


Figura 1.2: Alcances de la TFDA.

A principios de la década de 1990 la acción fotodinámica se aplicó con fines no oncológicos como es la inactivación de microorganismos patógenos ³⁴. La TFDA se exploró como una alternativa a los tratamientos antimicrobianos convencionales y los Fs fueron diseñados para unirse selectivamente a las células microbianas ^{35,36}.

Una ventaja destacable de la TFDA es el efecto rápido sobre los microorganismos, en comparación con otros agentes antimicrobianos. Esto se explica porque en general las células microbianas presentan mayor carga negativa que la atribuible a las células de los mamíferos. Al aplicar un Fs catiónico, éste se une más rápidamente a las células microbianas, en tanto que la captación por las células del huésped (mamíferos) es pausada. Otro aspecto relevante de esta estrategia es que presenta un amplio espectro de acción en comparación con los antibióticos convencionales, ya que el Fs actúa sobre diversos microorganismos tales como bacterias, protozoos, hongos, virus y parásitos, entre otros ³⁷. Adicionalmente, el Fs aplicado de forma tópica o local en el área afectada es eficaz para producir la muerte de cepas bacterianas resistentes y sensibles, por lo que reduce los efectos adversos y el daño al tejido

huésped^{38,39}. La principal ventaja de la TFD frente a los tratamientos con antibióticos convencionales es que no existen evidencias que señalen resistencia microbiana adquirida a esta terapia^{40,41}. Sin embargo, es importante destacar que esta estrategia presenta como desventaja la falta de especificidad. Por otra parte, no se dispone en la actualidad de Fs antimicrobianos para uso humano eficaces y aprobados en base a rigurosos controles toxicológicos³².

1.4. FOTOSENSIBILIZADORES

Los componentes más importantes requeridos para el desarrollo de la TFD son el Fs, luz y oxígeno molecular. Los Fs se definen como sustancias capaces de absorber luz a una longitud de onda específica, desencadenando reacciones fotoquímicas o fotofísicas que generan EROs responsables de la muerte celular. Cabe destacar un conjunto de características y condiciones que describen al Fs ideal⁴²⁻⁴⁴, tales como:

- Alto grado de pureza química.
- Estabilidad química a temperatura ambiente.
- Efecto fotosensible solo en presencia de luz de una longitud de onda específica.
- Estabilidad fotoquímica.
- Alta reactividad fotoquímica. La máxima absorción de luz debe presentarse entre las longitudes de onda de 600 nm a 800 nm, conocida como ventana fototerapéutica, a fin de alcanzar una penetración más profunda en los tejidos. Aquellos Fs que absorben luz a una longitud de onda superior a 800 nm no proporcionan energía suficiente para estimular al oxígeno en su estado singlete.
- Mínima absorción en el rango de 400 nm a 600 nm, lo cual previene la posible fotosensibilidad cutánea prolongada provocada por la exposición a la luz solar.
- Las curvas espectrales no deben superponerse a las correspondientes a otras sustancias endógenas como melatonina, hemoglobina u oxihemoglobina.
- Citotoxicidad mínima en la oscuridad.
- Alto rendimiento cuántico de formación del estado triplete excitado.

- Elevado rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete.
- Adecuada solubilidad en los tejidos del organismo, con un balance hidrofílico/lipofílico apropiado, para una absorción celular conveniente.
- Alta selectividad por los tejidos neoplásicos. El Fs debe abandonar en forma lenta las áreas afectadas y requiere ser eliminado rápidamente de los tejidos sanos, para minimizar los efectos secundarios fototóxicos de la terapia.
- Síntesis simple, económica y de fácil disponibilidad.

1.4.1. Primera generación

La primera aplicación de un agente fotosensibilizante en combinación con luz se atribuye a un estudiante de medicina, Oscar Raab en la década de 1900, quien durante experimentos con derivados de acridina demostró fluorescencia en protozoos con posterioridad al tratamiento con Fs y luz. El efecto tóxico provocó la muerte de estos microorganismos y este fenómeno se denominó "efecto fotodinámico" ⁴⁵. El primer intento eficaz de tratamiento del cáncer de piel se desarrolló con solución de eosina al 5 %. Sin embargo, esta terapia no llegó a un público amplio y fue olvidada durante décadas ^{46,47}.

Los Fs se introdujeron en la clínica a escala comercial en la década de 1970 por el Dr. Thomas Dougherty ⁴⁸. El ensayo de una mezcla de porfirinas solubles en agua llamadas HPD fueron obtenidas por purificación y modificación química del Fs hematoporfirina. Este derivado presentó mejor selectividad tisular tumoral y menor efecto fotosensibilizante en la piel que la hematoporfirina. Una mezcla de dímeros de porfirina y oligómeros de la HPD, conocida como porfímero de sodio o Photofrin[®], es un Fs comúnmente utilizado ⁴⁹. Éste presenta algunas limitaciones en la clínica relativas a la baja pureza química (es una mezcla de más de 60 moléculas) y la restringida penetración en los tejidos, como consecuencia de la longitud de onda de máxima absorción por debajo de la ventana fototerapéutica ^{50,51}.

1.4.2. Segunda generación

En 1980 se iniciaron estudios relativos a la generación de nuevos Fs, evaluando numerosas sustancias con potencial fotosensibilizante y solo algunas se ensayaron en la etapa clínica.

Actualmente, los Fs de segunda generación corresponden a derivados de porfirinas y Fs sintéticos, tales como: ALA, derivados de benzoporfirina, clorinas y análogos de bacterioclorinas y ftalocianinas ^{52,53}.

Los compuestos orgánicos no relacionados a las porfirinas, Fs no porfirínicos, incluyen diversas antraquinonas, fenotiazinas, cianinas, xantenos, azinas, oxazinas, como así también compuestos 4-4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenos (*BODIPY*) y aza-*BODIPY*, entre otros ⁵⁴.

Los Fs de segunda generación se caracterizan por presentar mayor pureza química y rendimiento de formación de 1O_2 , de igual modo que una mejor penetración tisular debido a la absorción en el rango de longitud de onda entre 650 nm a 800 nm. Además exhiben menos efectos secundarios y una rápida eliminación del organismo, en comparación con los Fs de primera generación. La principal desventaja de la segunda generación de Fs radica en la baja solubilidad acuosa, siendo una limitante significativa para la administración intravenosa, por esta razón en numerosos casos se requiere el desarrollo de métodos de vehiculización que permitan alcanzar el sitio de acción ^{55,56}.

1.4.3. Tercera generación

El desarrollo de los Fs de tercera generación se sustenta en la preparación de sistemas con mayor afinidad por el tejido a tratar, reduciendo el daño al entorno circundante. Por tal motivo, surgieron nuevos sistemas de administración de fármacos que permiten aumentar la biodisponibilidad del Fs e incrementar el efecto fotodinámico ⁵⁷. La tercera generación de Fs involucra la unión de aquellos Fs de segunda generación con componentes tales como anticuerpos, ligandos o portadores que permitan una administración eficaz y específica ⁵⁸.

La TFD y TFDA aplican distintas estrategias que permiten incrementar la selectividad del Fs, tales como:

- ✓ Combinación del Fs con lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) ^{59,60}.
- ✓ Conjugación del Fs con un anticuerpo monoclonal dirigido al antígeno específico de las células cancerosas ⁶¹⁻⁶³.
- ✓ Marcadores de la superficie del tumor, como receptores de transferrina u hormonas (por ejemplo, insulina) ^{42,64}.

- ✓ Fs conjugados químicamente con polímeros biocompatibles, nanopartículas, liposomas, micelas e hidrogeles, entre otros ^{65–69}.

Con relación a la última estrategia es importante señalar que la nanomedicina es la aplicación de materiales nanotecnológicos, conocidos como nanoportadores, para la administración de fármacos que permiten el diagnóstico y tratamiento de diversas patologías. Estos sistemas de transporte tienen el potencial de mejorar la solubilidad de los Fs, prolongar su vida media en la circulación sanguínea, controlar de manera eficiente la farmacocinética y la acumulación del mismo en el tejido requerido, disminuyendo los efectos secundarios. También permiten aumentar la biodisponibilidad y superar la resistencia microbiana a múltiples fármacos ⁷⁰.

Estas alternativas favorecen la selectividad e incrementan la acumulación del Fs en las zonas tratadas, brindando la posibilidad de reducir las dosis administradas ^{71–73}.

1.5. FUENTES DE LUZ

Las fuentes de luz aplicadas en el tratamiento fotodinámico deben presentar características espectrales que coincidan con el intervalo de longitudes de onda de máxima absorción del Fs, a fin de generar niveles adecuados de EROs que desencadenan el efecto citotóxico deseado ^{74,75}. Los Fs se activan con luz roja entre 630 y 700 nm, con un poder de penetración en los tejidos de 0,5 cm a 630 nm y 1,5 cm a 700 nm ⁷⁶.

Las primeras fuentes de luz aplicadas en TFD fueron policromáticas y no coherentes, diseñadas para emitir luz blanca y calor en la mayoría de los casos. Se incluyen las lámparas de filamento de tungsteno, halógeno de cuarzo, arco de xenón, haluro metálico y de sodio revestidas de fósforo. Estas fuentes de luz pueden producir espectros de longitudes de onda amplios, por lo que se utilizan conjuntamente con filtros ópticos para acotar el rango de irradiación. Las desventajas de las lámparas convencionales incluyen efecto térmico significativo, baja intensidad de luz y dificultad para determinar la dosis administrada. Sin embargo en la actualidad, la mayoría de estos inconvenientes pueden ser superados por un cuidadoso diseño de ingeniería ⁷⁷.

La invención de los láseres en la década de 1960 impactó en la TFD permitiendo una radiación monocromática y coherente. El tratamiento se definió aplicando la longitud de onda óptima, una alta densidad de energía y transmisión de luz mediante fibras ópticas ^{7, 77,78}. La principal desventaja de este tipo de fuente de luz es el elevado costo ⁷⁴.

Los diodos emisores de luz (LED, por las siglas en inglés) son sistemas compactos, livianos, no emiten calor, requieren poca energía para producir irradiaciones a distintas longitudes de onda y se pueden montar en una amplia gama de geometrías y tamaños. Dependiendo de la profundidad de las patologías a tratar, los LED pueden implantarse en diferentes catéteres permitiendo la irradiación de grandes superficies ^{53,79-81}.

Las lámparas halógenas, a diferencia de los láseres y los LED, presentan la posibilidad de coincidir espectralmente con el Fs, sin embargo no pueden acoplarse de manera eficiente a fibras ópticas y provocan un elevado calentamiento ^{7,74}. La Tabla 1.1, resume las ventajas y desventajas de las fuentes de luz ^{79,82}.

Tabla 1.1: Ventajas y desventajas de las fuentes de luz.

FUENTE DE LUZ	VENTAJAS	DESVENTAJAS
LÁSER	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Monocromático ➤ Potente ➤ Adaptable a fibras ópticas 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Elevado costo ➤ Gran tamaño ➤ Requiere mayor mantenimiento
LED	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Tamaño pequeño ➤ Bajo costo ➤ Puede utilizarse directamente para aplicaciones endoscópicas/intersticiales 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Efectos térmicos ➤ Baja potencia ➤ Divergencia del haz (en comparación con los láseres)
LÁMPARAS HALÓGENAS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Diseño simple ➤ Bajo costo ➤ Campo de irradiación amplio 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Pueden sufrir pérdidas al acoplarse a fibras ópticas ➤ Requiere filtrado espectroscópico ➤ Efectos térmicos

1.6. PROCESOS FOTOFÍSICOS Y FOTOQUÍMICOS

El Diagrama de Jablonski ilustra los eventos fotofísicos y fotoquímicos que se desencadenan con la absorción de luz por parte del Fs (Figura 1.3). El Fs en estado basal o fundamental presenta dos electrones con espines opuestos en un orbital molecular de baja energía; esto se conoce como estado singlete fundamental (¹Fs).

Al absorber luz de una determinada longitud de onda el Fs pasa al estado singlete excitado (¹Fs*), de esta manera un electrón migra a un nivel de energía mayor conservando el mismo spin electrónico. Este estado energético presenta un tiempo de vida corto y disipa su energía emitiendo luz por fluorescencia o por conversión en calor interno (liberación de calor).

Cuando el tiempo de vida del $^1\text{Fs}^*$ lo permite tiene lugar el denominado cruce entre sistemas con la inversión del spin electrónico. La molécula pasa al estado conocido como estado triplete excitado ($^3\text{Fs}^*$), de mayor tiempo de vida, lo que posibilita la interacción con moléculas del entorno incrementando el potencial del Fs como agente terapéutico. El $^3\text{Fs}^*$ puede disipar la energía mediante la emisión de luz, fenómeno denominado fosforescencia, o bien desencadenar diferentes procesos fotoquímicos ^{83–85}.

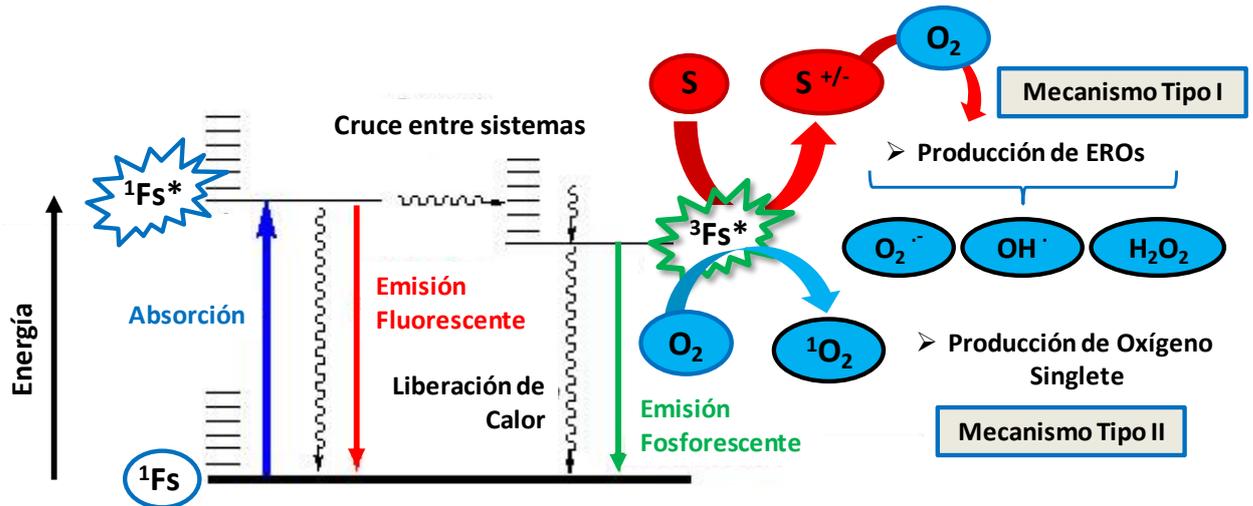


Figura 1.3: Procesos fotoquímicos y fotoquímicos implicados en la TFD y TFDA.

El Fs activado puede generar diferentes especies citotóxicas responsables de la muerte celular. El $^3\text{Fs}^*$, a través del mecanismo Tipo I, interactúa con los sustratos biológicos (S) y les transfiere un protón o electrón dando origen a radicales catiónicos o aniónicos ($\text{S}^{+/-}$). Estos radicales pueden reaccionar adicionalmente con oxígeno para producir EROs, entre las que se destacan, radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El mecanismo Tipo II tiene lugar mediante una transferencia de energía, donde el $^3\text{Fs}^*$ reacciona con oxígeno molecular produciendo $^1\text{O}_2$, especie altamente reactiva y citotóxica ^{86–88}.

La producción de radicales libres y la formación de $^1\text{O}_2$ contribuyen a la fotocitotoxicidad en células malignas y/o diferentes microorganismos patógenos. La TFD y TFDA, en general involucran la contribución de los mecanismos de acción fotodinámicos Tipo I y Tipo II. La relación entre estos procesos depende tanto de las características intrínsecas del Fs aplicado, como así también de la concentración de sustrato y oxígeno. La alta reactividad y la corta vida media del $^1\text{O}_2$ y de los diferentes radicales implican que las estructuras celulares que se encuentran en la región donde se localiza el Fs, están directamente afectadas por esta

estrategia terapéutica ⁸⁹.

Algunos reportes bibliográficos sugieren que podría tener lugar el denominado mecanismo Tipo III, que consiste en la interacción directa entre el $^3\text{Fs}^*$ y biomoléculas (nucleótidos y diferentes residuos proteicos) presentes en el medio, desencadenando la formación de radicales libres que difieren de aquellos generados en el mecanismo Tipo I provocando la muerte celular ⁸⁶. Este mecanismo requiere de una alta concentración del Fs para producir una acción tóxica sobre las células diana siendo una vía independiente del oxígeno ⁹⁰.

Los tres mecanismos podrían tener lugar durante el proceso de fotosensibilización, pero se sugiere que el Tipo II predominaría sobre los restantes. El $^1\text{O}_2$ presenta mayor reactividad que las otras EROs provocando la destrucción irreversible de las células tratadas ⁹⁰.

1.7. PROCESOS DE MUERTE CELULAR

Terapia fotodinámica

La literatura sugiere que la TFD induce la muerte de las células malignas a través de vías directa e indirecta. La primera involucra tres procesos, apoptosis, necrosis y autofagia ^{75,91,92}, mientras que la segunda implica el daño al sistema vascular que suministra nutrientes y oxígeno al tejido tumoral ⁹³. Estos procesos pueden desencadenarse de forma individual o simultánea (Figura 1.4) ⁹⁴.

Apoptosis: es la modalidad de muerte celular habitual en respuesta a la TFD mediante diversas vías de señalización, que se acoplan con caspasas, a la familia de proteínas Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) y factores inductores de apoptosis. En este caso la célula sufre una contracción característica y posterior formación de cuerpos apoptóticos con orgánulos celulares ^{75,93,95}.

Por otra parte, en condiciones de bajos niveles de ATP, la vía apoptótica no está disponible y la TFD puede causar muerte en el tejido diana mediante la inducción de un proceso necrótico o autofágico ^{96,97}.

Necrosis: se caracteriza por una disfunción celular mediante ruptura de las mitocondrias y/o la membrana plasmática provocando que el citoplasma se filtre al espacio extracelular induciendo a la lisis de las células malignas ^{98,99}.

Autofagia: es el proceso por el cual los orgánulos y el citosol quedan limitados en el interior de vacuolas de doble membrana denominadas autofagosomas y que una vez fusionados con lisosomas (autolisosomas), el contenido es digerido por enzimas lisosomales ^{93,100}.

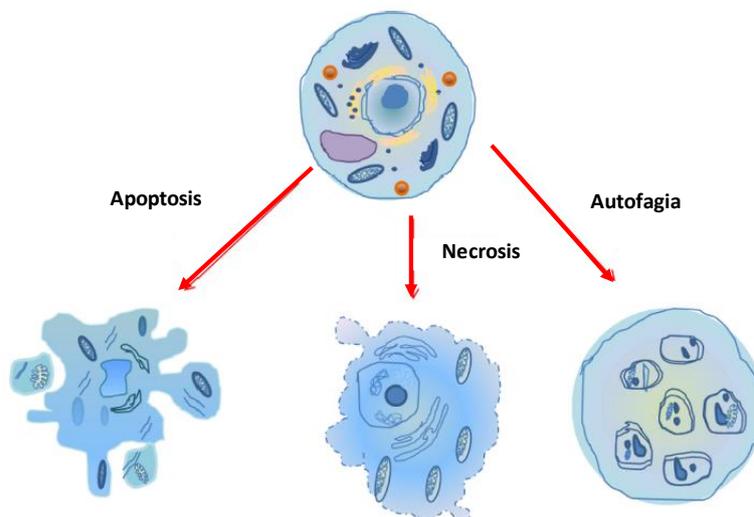


Figura 1.4: La morfología de las células en apoptosis, necrosis y autofagia.

Estos procesos de muerte celular son inducidos por diferentes vías de señalización dependiendo tanto del tipo, dosis y localización del Fs, como así también de las características particulares del tejido diana y el nivel de oxígeno presente en el área sometida a TFD, entre otros factores ¹⁰¹. Es probable que los Fs localizados en membrana y lisosomas causen necrosis, mientras que aquellos que se localizan en las mitocondrias generen apoptosis en las células a tratar ⁹³.

El Fs puede actuar mediante el mecanismo Tipo I provocando necrosis, que se caracteriza por una lisis rápida y repentina que afecta a un gran número de células de manera simultánea, sin discriminar las circundantes. El "daño colateral" está mediado por la liberación de materiales celulares y citocinas al ambiente extracelular ⁹¹. Generalmente, dosis altas de un Fs y/o luz, desencadenan la destrucción de la membrana citoplasmática conduciendo a este proceso de muerte celular ⁹⁵. Antecedentes bibliográficos indican que la formación de EROs es la principal causa de necrosis durante la TFD ^{85,102}.

Las reacciones involucradas en el mecanismo Tipo II dan lugar a la lisis celular mediada por apoptosis o autofagia. La primera consiste en un mecanismo programado, inducido por una variedad de señales intracelulares. Las etapas primordiales de la apoptosis producen cambios

morfológicos, la condensación de cromatina y fragmentación nuclear. Este proceso de muerte comienza con la activación de receptores de muerte transmembranales (vía extrínseca) o por la liberación de citocromo c de la membrana mitocondrial (vía intrínseca) ^{93,103}. Las últimas fases de la vía apoptótica intrínseca conducen a la activación del apoptosoma y caspasa-9, en tanto que en la extrínseca, los procesos están mediados por las caspasas-8 y 10. Ambas alternativas conducen a la activación de endonucleasas, caspasas-3 y 7, lo que conlleva a la formación de cuerpos apoptóticos y la posterior lisis celular ¹⁰⁴.

Por el contrario la autofagia es un proceso bioquímico regulado donde la vía apoptótica está ausente. Durante el mismo, los componentes celulares innecesarios o disfuncionales son eliminados por un proceso de autodigestión; mediante la formación de autofagosomas, la posterior fusión con lisosomas y finalmente la degradación y reciclado de esos componentes por medio de enzimas lisosomales ^{85,105}.

Terapia fotodinámica antimicrobiana

A pesar de los grandes progresos en los últimos años, aún no se han comprendido los detalles de los procesos involucrados en la TFDA y el impacto en las células microbianas ⁸⁶. Diversos antecedentes bibliográficos detallan que las vías de captación de los Fs aniónicos, por células bacterianas, pueden ser mediadas por una combinación de carga electrostática y proteínas transportadoras. Este último proceso en el caso de Fs catiónicos surge por interacciones electrostáticas y vías "auto promovidas" ^{106,107}.

El proceso de inactivación fotodinámica propuesto para Fs catiónicos, presenta dos vías alternativas frente a bacterias, levaduras y protozoos que se esquematizan en la Figura 1.5. La vía 1 implica una translocación directa del Fs a la membrana plasmática y se desarrolla en bacterias Gram-positivas y protozoos en la etapa trofozoítica. Por otra parte, la vía 2 requiere de un aumento inicial de la permeabilidad de la pared exterior y tiene lugar en bacterias Gram-negativas, levaduras y protozoos en fase quística ¹⁰⁸.

Ambas vías de captación convergen en el interior del microorganismo a tratar, generando las especies citotóxicas, EROs y/o $^1\text{O}_2$, con posterioridad a la irradiación, provocando estrés oxidativo con consecuente deterioro de las funciones celulares y la muerte microbiana.

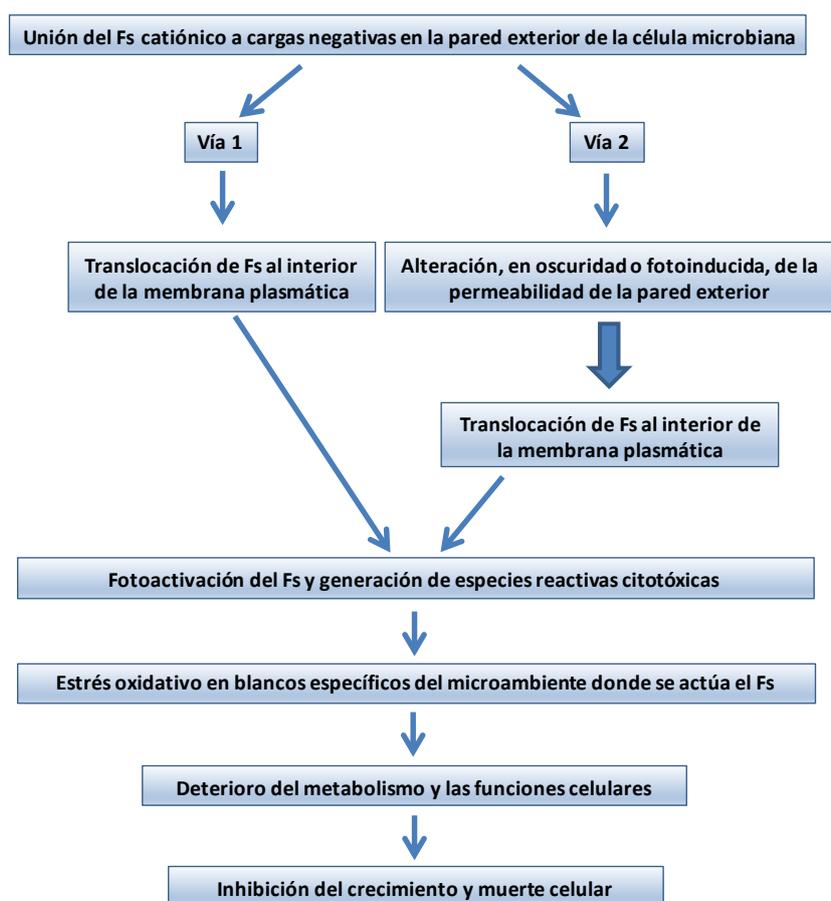


Figura 1.5: Pasos esenciales involucrados en el proceso de unión del Fs a células microbianas y posterior fotoactivación.

1.8. APLICACIONES TERAPÉUTICAS

La TFD presenta aplicaciones clínicas en el tratamiento oncológico de una variedad de cánceres, tales como pulmón, piel, mama, cabeza y cuello, tracto digestivo, páncreas, hígado, vejiga, ovario, próstata y cerebro. Adicionalmente esta modalidad terapéutica se utiliza en una amplia gama de patologías no oncológicas, entre las cuales cabe señalar, infecciones ocasionadas por diferentes tipos de microorganismos (bacterias, virus, parásitos, hongos, etc); afecciones hiperproliferativas y/o inflamatorias (degeneración macular o psoriasis) y lesiones premalignas (queratosis actínica y esófago de Barrett), entre otras ^{109,110}.

1.8.1. Oncológicas

La primera aplicación de TFD en el año 1990 la informó J.C. Kennedy con la administración de ALA a pacientes con carcinoma en células basales ¹¹¹. Posteriormente cabe mencionar el tratamiento de linfoma cutáneo de células T ^{112,113}, carcinoma de células escamosas ¹¹⁴ y otros cánceres de cabeza y cuello ^{115,116}. Actualmente se desarrollan estudios relativos a la eficacia de este Fs frente a carcinomas de células basales ¹¹⁷, queratosis actínica y la enfermedad de Bowen ¹¹⁸.

La naturaleza hidrofílica del ALA limita su capacidad de penetración profunda en la piel intacta, restringiendo el uso a la aplicación tópica y al tratamiento de enfermedades superficiales, donde la estructura del tejido presenta cierto grado de desorganización. Con el objetivo de superar esta limitante, se desarrolló el éster metílico de ALA, metil-aminolevulinato (MAL), para la aplicación de TFD frente a la queratosis actínica ¹¹⁹. Antecedentes recientes señalan el uso de este Fs en el tratamiento del cáncer de vejiga ¹²⁰, gástrico temprano y en displasia del tracto gastrointestinal. La administración sistémica de ALA a pacientes con adenocarcinomas de recto no operables y carcinoma de colon indicó una fotosensibilización tisular eficaz con protoporfirina IX ^{121,122}. En 1995 se trató con éxito el cáncer de estómago empleando ALA-TFD ¹²³. La TFD con ALA demostró ser una alternativa promisorio en las lesiones ginecológicas premalignas del cuello uterino, neoplasias intraepiteliales vulvares y vaginales, presentando mínima destrucción del tejido, preservación de la anatomía, buen resultado cosmético, anestesia local y posibilidad de otras terapias concomitantes ^{121,124}.

Photofrin[®] fue el primer Fs aprobado por la Agencia Canadiense de Salud para la aplicación clínica de la TFD en cáncer de vejiga. La aprobación por la FDA y en numerosos países permitió el tratamiento de distintos tipos de tumores malignos, tales como de pulmón, esófago, gástrico y displasia cervical. Photofrin[®] es una mezcla compleja de moléculas con escasa selectividad tisular y baja absorción de luz, lo cual implica concentraciones elevadas del Fs que persisten en el organismo por más de 2 meses, ocasionando fotosensibilidad cutánea ¹²⁵.

Posteriormente se desarrolló una segunda generación de Fs, con una pureza mejorada, absorción a mayores longitudes de onda, mayor fotosensibilidad y selectividad tisular. La Temoporfina, aprobada bajo el nombre comercial de Foscan[®], se utilizó ampliamente para el

tratamiento de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de mama, páncreas y próstata, con resultados mixtos ¹²⁶.

La investigación relativa a aplicaciones oncológicas de diferentes Fs continúa en la actualidad.

1.8.2. No Oncológicas

Infecciones: La TFDA fue ensayada hace más de 100 años frente a varios microorganismos combinando un Fs apropiado y luz, a una determinada longitud de onda, en presencia de oxígeno. Recientemente esta alternativa terapéutica ha sido estudiada en profundidad como un tratamiento apropiado para numerosas infecciones. Este interés ha sido motivado por el alarmante aumento de la resistencia de los distintos patógenos a los medicamentos disponibles comercialmente ¹²⁷. Diferentes bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, en estado planctónico y formando biofilms, han sido tratadas con numerosos Fs evidenciando resultados prometedores ^{128–130}.

Los estudios clínicos iniciales de la TFDA en infecciones, se dirigieron a la evaluación de patologías virales. Recientemente se han realizado ensayos clínicos frente al virus del papiloma humano y lesiones de herpes simple ^{32,131–134}.

Oftalmológicas: El primer Fs aprobado para el tratamiento fotodinámico de la degeneración macular fue Verteporfina (Visudyne[®]). Este derivado de benzoporfirina produce EROs por irradiación con luz roja, no térmica y de baja energía a una longitud de onda de 689 nm. Este Fs tiene afinidad por células con una alta expresión de receptores de LDL, manifestando su acción en células endoteliales tumorales y neovasculares, lo que explica su eficacia en la eliminación de vasos formados dentro de la retina. Verteporfina se administra por vía intravenosa 15 minutos antes de la aplicación de luz láser. La agudeza visual de los pacientes se incrementó en comparación con aquellos que no recibieron el tratamiento. El éxito de la TFD con este Fs propició su utilización en otras afecciones oftalmológicas tales como hemangioma coroideo, coriorretinopatía serosa central, vasculopatía coroidea polipoidea y neovascularización coroidea peripapilar ¹³⁵.

Dermatológicas: Esta estrategia terapéutica demostró ser adecuada para el tratamiento del acné, psoriasis, foliculitis decalvante, hidradenitis supurativa e hiperplasia sebácea, entre otras ¹³⁶. El procedimiento terapéutico empleado en todos los casos, consiste principalmente en la administración tópica de ALA e irradiación apropiada con diferentes fuentes de luz ^{137,138}.

Ginecológicas: Estudios preliminares proponen a la TFD como una alternativa terapéutica frente a embarazos extrauterinos y endometriosis. Se requiere profundizar los ensayos, evaluando potenciales daños y efectos adversos ¹³⁹.

Cardiológicas: La eliminación selectiva de macrófagos mediante TFD es una nueva y prometedora modalidad para la reducción de placas ateroscleróticas. El contribuyente predominante de la morbilidad cardiovascular es una inflamación crónica, con progresión lenta, debido a la acumulación de lípidos y macrófagos en la pared arterial. La aterosclerosis es la principal causa de infartos de miocardio y rotura de la placa aterosclerótica. Ensayos e investigaciones recientes han demostrado que la TFD reduce la formación de placa mediante la eliminación de los macrófagos ¹⁴⁰.

1.9. BIBLIOGRAFÍA

1. Luo, D., Carter, K. A., Miranda, D. y Lovell, J. F. Chemophototherapy: an emerging treatment option for solid tumors. *Adv. Sci. News* **4**, 1-24 (2017).
2. Shi, X., Zhang, C. Y., Gao, J. y Wang, Z. Recent advances in photodynamic therapy for cancer and infectious diseases. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* **11**, 1-23 (2019).
3. Juarranz, Á., Gilaberte, Y. y González, S. Photodynamic therapy (PDT) in oncology. *Cancers (Basel)*. **12**, 1-5 (2020).
4. Correia, J. H., Rodrigues, J. A., Pimenta, S., Dong, T. y Yang, Z. Photodynamic therapy review: principles, photosensitizers, applications and future directions. *Pharmaceutics* **13**, 1-16 (2021).
5. Souza, B. M. N., Pinto, J. G., Pereira, A. H. C., Miñán, A. G. y Ferreira-Strixino, J. Efficiency of antimicrobial photodynamic therapy with Photodithazine® on MSSA and MRSA strains. *Antibiotics* **10**, 1-17 (2021).

6. Almeida, A. Photodynamic therapy in the inactivation of microorganisms. *Antibiotics* **9**, 1-5 (2020).
7. Cieplik, F. y col. Antimicrobial photodynamic therapy-what we know and what we don't. *Crit. Rev. Microbiol.* **44**, 571-589 (2018).
8. Raab, O. Über die wirkung fluorescirender stoffe auf infusorien. *Ztg. Biol.* **39**, 524–546 (1900).
9. Von Tappeiner, H. y Jodlbauer, A. Über die wirkung der photodynamischen (fluorescierenden) stoffe auf protozoen und enzyme. *Dtsch. Arch. Klin. Med* **39**, 427–487 (1904).
10. Figge, F. H. J., Weiland, G. S. y Manganiello, L. O. J. Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **68**, 640–641 (1948).
11. Rassmussen-Taxdal, D. S., Ward, G. E. y Figge, F. H. J. Fluorencence of human lymphatic and cancer tissues following high doses of intravenous hematoporphyrin. *Fluoresc. Cancer Tissues* **8**, 78-81 (1955).
12. Lipson, R. L., Baldes, E. J. y Olsen, A. M. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J. Natl. Cancer Inst.* **26**, 1-11 (1961).
13. Kessel, D. Photodynamic therapy: a brief history. *J. Clin. Med.* **8**, 1-7 (2019).
14. Gregorie, H. B. y col. Hematoporphyrin-derivative fluorescence in malignant neoplasms. *Ann. Surg.* **167**, 820-828 (1968).
15. Diamond, I. y col. Photodynamic therapy of malignant tumours. *Lancet* **300**, 1175-1177 (1972).
16. Dougherty, T. J. y col. Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **62**, 231-237 (1979).
17. Dougherty, T. J. y col. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.* **38**, 2628-2635 (1978).
18. Dougherty, T. J., Grindey, G. B., Fiel, R., Weishaupt, K. R. y Boyle, D. G. Photoradiation therapy II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J. Natl. Cancer Inst.* **55**, 115-121 (1975).
19. Gomer, C. J. y Dougherty, T. J. Determination of [³H]- and [¹⁴C]hematoporphyrin derivative distribution in malignant and normal tissue. *Cancer Res.* **39**, 146-151 (1979).
20. Weishaupt, K. R., Gomer, C. J. y Dougherty, T. J. Identification of singlet oxygen as the

- cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. *Cancer Res.* **36**, 2326-2329 (1976).
21. Kessel, D. Thomas J. Dougherty: an appreciation. *Photochem. Photobiol.* **96**, 454-457 (2020).
 22. Pandey, R. K., Siegel, M. M., Tsao, R., McReynolds, J. H. y Dougherty, T. J. Fast atom bombardment mass spectral analyses of Photofrin II® and its synthetic analogs. *Biomedical Environ. Mass Spectrom.* **19**, 405-414 (1990).
 23. Bellnier, D. A. y col. Clinical pharmacokinetics of the PDT photosensitizers Porfimer Sodium (Photofrin), 2-[1-Hexyloxyethyl]-2-Devinyl Pyropheophorbide-a (Photochlor) and 5-ALA-Induced Protoporphyrin IX. *Laser Surg. Med.* **38**, 439-444 (2006).
 24. Allevato, M. A. Terapia fotodinámica (1° parte). *Act Ter. Dermatol.* **29**, 302-312 (2006).
 25. ANMAT, Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. *Productos autorizados para comercialización- Monofármacos- Abril 2008* (2008).
 26. Qiu, H., Tan, M., Ohulchansky, T. Y., Lovell, J. F. y Chen, G. Recent progress in upconversion photodynamic therapy. *Nanomaterials.* **8**, 1-18 (2018).
 27. Ostańska, E., Aebisher, D. y Bartusik-Aebisher, D. The potential of photodynamic therapy in current breast cancer treatment methodologies. *Biomed. Pharmacother.* **137**, 1-10 (2021).
 28. Mazraedoost, S. y Behbudi, G. Nano materials-based devices by photodynamic therapy for treating cancer applications. *J. Adv. Appl. NanoBio Tech.* **2**, 9-21 (2021).
 29. Rossetti, M. V. y col. Heme metabolism: the janus nature of precursors and porphyrins. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam.* **50**, 1-27 (2016).
 30. Yi, G. y col. Recent advances in nanoparticle carriers for photodynamic therapy. *Quant. Imaging Med. Surg.* **8**, 433-443 (2018).
 31. Kou, J., Dou, D. y Yang, L. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget.* **8**, 81591-81603 (2017).
 32. Oniszczyk, A., Wojtunik-kulesza, K. A., Oniszczyk, T. y Kasprzak, K. The potential of photodynamic therapy (PDT)-Experimental investigations and clinical use. *Biomed. Pharmacother.* **83**, 912-929 (2016).
 33. Agazzi, M. L., Ballatore, M. B., Durantini, A. M., Durantini, E. N. y Tomé, A. C. BODIPYs in antitumoral and antimicrobial photodynamic therapy: an integrating review. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **40**, 21-48 (2019).

34. Dai, T., Huang, Y. Y. y Hamblin, M. R. Photodynamic therapy for localized infections- State of the art. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **6**, 170-188 (2009).
35. Wainwright, M. y Mclean, A. Rational design of phenothiazinium derivatives and photoantimicrobial drug discovery. *Dye. Pigment.* **136**, 590-600 (2017).
36. Manov, H. y col. Photosensitive dendrimers as a good alternative to antimicrobial photodynamic therapy of Gram-negative bacteria. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **419**, 1-7 (2021).
37. Pérez-Laguna, V., García-Luque, I., Ballesta, S., Rezusta, A. y Gilaberte, Y. Photodynamic therapy combined with antibiotics or antifungals against microorganisms that cause skin and soft tissue infections: a planktonic and biofilm approach to overcome resistances. *Pharmaceuticals.* **14**, 1-21 (2021).
38. Ghorbani, J., Rahban, D., Aghamiri, S., Teymouri, A. y Bahador, A. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview. *Laser Ther.* **27**, 293-302 (2018).
39. Hamblin, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* **33**, 67-73 (2016).
40. Tim, M. Strategies to optimize photosensitizers for photodynamic inactivation of bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **150**, 2-10 (2015).
41. da Fonseca, A. S., Mencialha, A. L. y de Paoli, F. Antimicrobial photodynamic therapy against *Acinetobacter baumannii*. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **35**, 1-7 (2021).
42. Kwiatkowski, S. y col. Photodynamic therapy- mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed. Pharmacother.* **106**, 1098-1107 (2018).
43. Jiang, X., Zhu, N., Zhao, D. y Ma, Y. New cyclometalated transition-metal based photosensitizers for singlet oxygen generation and photodynamic therapy. *Sci. China Chem.* **59**, 40-52 (2016).
44. Broadwater, D., Medeiros, H. C. D., Lunt, R. R. y Lunt, S. Y. Current advances in photoactive agents for cancer imaging and therapy. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **23**, 29-60 (2021).
45. Allison, R. R. y Sibata, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **7**, 61-75 (2010).
46. Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N. y Reed, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **74**, 656-669 (2001).
47. Dougherty, T. J. A brief history of clinical photodynamic therapy development at

- Roswell Park Cancer Institute. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **14**, 219-221 (1996).
48. Daniell, M. D. y Hill, J. S. A history of photodynamic therapy. *Aust. N. Z. J. Surg.* **61**, 340-348 (1991).
 49. Stables, G. I. y Ash, D. V. Photodynamic therapy. *Cancer Treat. Rev.* **21**, 311-323 (1995).
 50. Menezes, P. F. C. y col. Photodynamic therapy for Photogem and Photofrin using different light wavelengths in 375 human melanoma cells. *Laser Phys. Lett.* **4**, 546-551 (2007).
 51. Hak, A., Shinde, V. R. y Rengan, A. K. A review of advanced nanoformulations in phototherapy for cancer therapeutics. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **33**, 1-8 (2021).
 52. Moriwaki, K. y col. Synthesis and photophysical properties of S-mannosylated chlorins and their effect on photocytotoxicity in HeLa cells. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **91**, 230-236 (2018).
 53. Yoon, I., Li, J. Z. y Shim, Y. K. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clin Endosc.* **46**, 7-23 (2013).
 54. D'Alessandro, S. y Priefer, R. Non-porphyrin dyes used as photosensitizers in photodynamic therapy. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **60**, 1-14 (2020).
 55. Park, W. y col. Advanced smart-photosensitizers for more effective cancer treatment. *Biomater. Sci.* **6**, 79-90 (2018).
 56. Niehoff, A. C. y col. A palladium label to monitor nanoparticle-assisted drug delivery of a photosensitizer into tumor spheroids by elemental bioimaging. *Metallomics.* **6**, 77-78 (2014).
 57. Josefsen, L. B. y Boyle, R. W. Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? *Br. J. Pharmacol.* **154**, 1-3 (2008).
 58. Meng, Z. y col. Therapeutic considerations and conjugated polymer-based photosensitizers for photodynamic therapy. *Macromol. Rapid Commun.* **39**, 1-15 (2018).
 59. Lenkavska, L. y col. Benefits of hypericin transport and delivery by low- and high-density lipoproteins to cancer cells: From in vitro to ex ovo. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **25**, 214-224 (2019).
 60. Datta, S. y col. Phosphorescence kinetics of singlet oxygen produced by photosensitization in spherical nanoparticles. Part II. The case of hypericin-loaded low-density lipoprotein particles. *J. Phys. Chem. B* **122**, 5154-5160 (2018).

61. Sadraeian, M. y col. Photoimmunotherapy using cationic and anionic photosensitizer-antibody conjugates against HIV Env-expressing cells. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1-16 (2020).
62. Shirasu, N., Shibaguchi, H., Yamada, H., Kuroki, M. y Yasunaga, S. Highly versatile cancer photoimmunotherapy using photosensitizer-conjugated avidin and biotin-conjugated targeting antibodies. *Cancer Cell Int.* **19**, 1-13 (2019).
63. Railkar, R. y Agarwal, P. K. Photodynamic therapy in the treatment of bladder cancer: past challenges and current innovations. *Eur. Urol. Focus* **4**, 509-511 (2018).
64. Dixit, S. y col. Dual receptor-targeted theranostic nanoparticles for localized delivery and activation of photodynamic therapy drug in glioblastomas. *Mol. Pharm.* **12**, 3250-3260 (2015).
65. Qidwai, A. y col. Role of nanocarriers in photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **30**, 1-8 (2020).
66. Li, J. y col. Multifunctional micelles dually responsive to hypoxia and singlet oxygen: enhanced photodynamic therapy via interactively triggered photosensitizer delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **10**, 17117-17128 (2018).
67. Vilsinski, B. H. y col. Formulation of aluminum chloride phthalocyanine in Pluronic™ P-123 and F-127 block copolymer micelles: photophysical properties and photodynamic inactivation of microorganisms. *Photochem. Photobiol.* **91**, 518-525 (2015).
68. Bayat, F. y Karimi, A. R. Design of photodynamic chitosan hydrogels bearing phthalocyanine-colistin conjugate as an antibacterial agent. *Int. J. Biol. Macromol.* **129**, 927-935 (2019).
69. Belali, S., Karimi, A. R. y Hadizadeh, M. Cell-specific and pH-sensitive nanostructure hydrogel based on chitosan as a photosensitizer carrier for selective photodynamic therapy. *Int. J. Biol. Macromol.* **110**, 437-448 (2018).
70. Pellosi, D. S., De Jesus, P. C. C. y Tedesco, A. C. Spotlight on the delivery of photosensitizers: different approaches for photodynamic-based therapies. *Expert Opin. Drug Deliv.* **14**, 1395-1406 (2017).
71. Setaro, F. y col. Amphiphilic phthalocyanines in polymeric micelles: a supramolecular approach toward efficient third-generation photosensitizers. *J. Mater. Chem. B* **8**, 282-289 (2020).
72. Kataoka, H. y col. New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers. *Ann. Transl. Med.* **5**, 1-7 (2017).

73. Mfouo-Tynga, I. S., Dias, L. D., Inada, N. M. y Kurachi, C. Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **34**, 1-11 (2021).
74. Plotino, G., Grande, N. M. y Mercade, M. Photodynamic therapy in endodontics. *Int. Endod. J.* **52**, 760-774 (2019).
75. Robertson, C. A., Evans, D. H. y Abrahamse, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **96**, 1-8 (2009).
76. Veerendra, N. R., Rekha, R. K., Chandana, G. y Sangeeta, S. Photodynamic therapy. *Indian J. Dent. Adv.* **1**, 46-50 (2009).
77. Huang, Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technol. Cancer Res. Treat.* **4**, 283-293 (2005).
78. Carrera, E. T. y col. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. *Laser Phys.* **26**, 1-13 (2016).
79. Algorri, J. F., Ochoa, M., Roldán-Varona, P., Rodríguez-Cobo, L. y López-Higuera, J. M. Light technology for efficient and effective photodynamic therapy: a critical review. *Cancers (Basel)*. **13**, 1-42 (2021).
80. Yuri Nagata, J. y col. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **9**, 122-131 (2012).
81. Wilson, B. C. y Patterson, M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys. Med. Biol.* **53**, 61-109 (2008).
82. Kim, M. M. y Darafsheh, A. Light sources and dosimetry techniques for photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **96**, 280-294 (2020).
83. Santos, H. F. y col. Charge separation of photosensitized phenothiazines for applications in catalysis and nanotechnology. *Dye. Pigment.* **177**, 1-8 (2020).
84. Wang, S., Wang, X., Yu, L. y Sun, M. Progress and trends of photodynamic therapy: from traditional photosensitizers to AIE-based photosensitizers. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **34**, 1-14 (2021).
85. Stájer, A., Kajári, S., Gajdács, M., Musah-Eroje, A. y Baráth, Z. Utility of photodynamic therapy in dentistry: current concepts. *Dent. J.* **8**, 1-22 (2020).
86. Tapashetti, R. y Bhagat, M. Photodynamic therapy in periodontics. *Galore Int. J. Heal.*

- Sci. Res.* **5**, 14-29 (2020).
87. Nguyen, V. N., Yan, Y., Zhao, J. y Yoon, J. Heavy-atom-free photosensitizers: from molecular design to applications in the photodynamic therapy of cancer. *Acc. Chem. Res.* **54**, 207-220 (2021).
 88. Mesquita, M. Q., Dias, C. J., Neves, M. G. P. M. S., Almeida, A. y Faustino, M. A. F. Revisiting current photoactive materials for antimicrobial photodynamic therapy. *Molecules.* **23**, 1-47 (2018).
 89. Calixto, G. M. F., Bernegossi, J., De Freitas, L. M., Fontana, C. R. y Chorilli, M. Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: a review. *Molecules.* **21**, 1-18 (2016).
 90. Deda, D. K. y Araki, K. Nanotechnology, light and chemical action: an effective combination to kill cancer cells. *J. Braz. Chem. Soc.* **26**, 2448-2470 (2015).
 91. Baptista, S. y col. Type I and type II photosensitized oxidation reactions: guidelines and mechanistic pathways. *Photochem. Photobiol.* **93**, 912-919 (2017).
 92. Chiaviello, A., Postiglione, I. y Palumbo, G. Targets and mechanisms of photodynamic therapy in lung cancer cells: a brief overview. *Cancers.* **3**, 1014-1041 (2011).
 93. Chilakamarthi, U. y Giribabu, L. Photodynamic therapy: past, present and future. *Chem. Rec.* **17**, 775-802 (2017).
 94. Thompson, S. A. y col. Compromising the plasma membrane as a secondary target in photodynamic therapy-induced necrosis. *Bioorg. Med. Chem.* **26**, 5224-5228 (2018).
 95. Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B. y Hamblin, M. R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers.* **3**, 2516-2539 (2011).
 96. Agostinis, P. y col. Photodynamic therapy of cancer: an update. *A Cancer J. Clin.* **61**, 250-281 (2011).
 97. Saczko, J. y col. Photooxidative action in cancer and normal cells induced by the use of Photofrin[®] in photodynamic therapy. *Folia Biol.* **54**, 24-29 (2008).
 98. Ortel, B., Shea, C. R. y Calzavara-Pinton, P. Molecular mechanisms of photodynamic therapy. *Front. Biosci.* **14**, 4157-4172 (2009).
 99. Castano, A. P., Demidova, T. N. y Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2**, 1-23 (2005).
 100. Esteve, J. M. y Knecht, E. Mechanisms of autophagy and apoptosis: recent

- developments in breast cancer cells. *World J. Biol. Chem.* **2**, 232-238 (2011).
101. Abrahamse, H., Kruger, C. A., Mtech, S. K. y Mishra, A. Nanoparticles for advanced photodynamic therapy of cancer. *Photomed. Laser Surg.* **11**, 581-588 (2017).
 102. Ochsner, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **39**, 1-18 (1997).
 103. Kessel, D. y Reiners Jr, J. J. Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochem. Photobiol.* **83**, 1024-1028 (2007).
 104. Misra, A., Rai, S. y Misra, D. Functional role of apoptosis in oral diseases: an update. *J. Oral Maxillofac. Pathol* **20**, 491-496 (2016).
 105. Yu, L., Lenardo, M. J. y Baehrecke, E. H. Autophagy and caspases. *Cell Cycle* **3**, 1124-1126 (2004).
 106. George, S., Hamblin, M. R. y Kishen, A. Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* **8**, 788-795 (2009).
 107. Rapacka-Zdończyk, A. y col. Factors determining the susceptibility of bacteria to antibacterial photodynamic inactivation. *Front. Med.* **8**, 1-18 (2021).
 108. Jori, G. y col. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg. Med.* **38**, 468-481 (2006).
 109. Hu, Z., Oleinick, N. y Hamblin, M. R. Photodynamic therapy as an emerging treatment modality for cancer and non-cancer diseases. *J Anal Bioanal Tech* **S1**, 1-3 (2014).
 110. Gunaydin, G., Gedik, M. E. y Ayan, S. Photodynamic therapy-current limitations and novel approaches. *Front. Chem.* **9**, 1-25 (2021).
 111. Kennedy, J. C., Pottier, R. H. y Pross, D. C. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **6**, 143-148 (1990).
 112. Tarabadkar, E. S. y Shinohara, M. M. Skin directed therapy in cutaneous T-cell lymphoma. *Front. Oncol.* **9**, 1-7 (2019).
 113. Coors, E. A. y von den Driesch, P. Topical photodynamic therapy for patients with therapy-resistant lesions of cutaneous T-cell lymphoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* **50**, 363-367 (2004).
 114. Keyal, U., Bhatta, A. K., Zhang, G. y Wang, X. L. Present and future perspectives of photodynamic therapy for cutaneous squamous cell carcinoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* **80**, 765-773 (2019).

115. Malik, Z. Fundamentals of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy and diagnosis: an overview. *Transl. Biophotonics* **2**, 1-6 (2020).
116. Stummer, W., Stepp, H., Wiestler, O. D. y Pichlmeier, U. Randomized, prospective double-blinded study comparing 3 different doses of 5-aminolevulinic acid for fluorescence-guided resections of malignant gliomas. *Neurosurgery*. **81**, 230-239 (2017).
117. de Albuquerque, I. O., Nunes, J., Longo, J. P. F., Muehlmann, L. A. y Azevedo, R. B. Photodynamic therapy in superficial basal cell carcinoma treatment. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **27**, 428-432 (2019).
118. Shi, L. y col. Chinese guidelines on the clinical application of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in dermatology (2021 edition). *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **35**, 1-9 (2021).
119. Dobson, J., de Queiroz, G. F. y Golding, J. P. Photodynamic therapy and diagnosis: principles and comparative aspects. *Vet. J.* **233**, 8-18 (2018).
120. Inoue, K. 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy for bladder cancer. *Int. J. Urol.* **24**, 97-101 (2017).
121. Casas, A. Clinical uses of 5-aminolaevulinic acid in photodynamic treatment and photodetection of cancer: a review. *Cancer Lett.* **490**, 165-173 (2020).
122. Loh, C. S. y col. Endogenous porphyrin distribution induced by 5-aminolaevulinic acid in the tissue layers of the gastrointestinal tract. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **20**, 47-54 (1993).
123. Gossner, L., Sroka, R., Hahn, E. G. y Ell, C. Photodynamic therapy: successful destruction of gastrointestinal cancer after oral administration of aminolevulinic acid. *Gastrointest. Endosc.* **41**, 55-58 (1995).
124. Matoba, Y., Banno, K., Kisu, I. y Aoki, D. Clinical application of photodynamic diagnosis and photodynamic therapy for gynecologic malignant diseases: a review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **24**, 52-57 (2018).
125. Baran, T. M. Photofrin® photodynamic therapy with intratumor photosensitizer injection provides similar tumor response while reducing systemic skin photosensitivity: pilot murine study. *Lasers Surg. Med.* **50**, 476-482 (2018).
126. dos Santos, A. F., de Almeida, D. R. Q., Terra, L. F., Baptista, M. S. y Labriola, L. Photodynamic therapy in cancer treatment-an update review. *J. Cancer Metastasis*

Treat. **5**, 1-20 (2019).

127. Kharkwal, G. B., Sharma, K. S., Huang, Y.-Y., Dai, T. y Hamblin, M. R. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg. Med.* **43**, 755-767 (2011).
128. Yang, Z., Qiao, Y., Li, J., Wu, F.-G. y Lin, F. Novel type of water-soluble photosensitizer from *Trichoderma reesei* for photodynamic inactivation of Gram-positive bacteria. *Langmuir.* **36**, 13227-13235 (2020).
129. Valenzuela-Valderrama, M., González, I. A. y Palavecino, C. E. Photodynamic treatment for multidrug-resistant Gram-negative bacteria: perspectives for the treatment of *Klebsiella pneumoniae* infections. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **28**, 256-264 (2019).
130. Ghasemi, M., Khorsandi, K. y Kianmehr, Z. Photodynamic inactivation with curcumin and silver nanoparticles hinders *Pseudomonas aeruginosa* planktonic and biofilm formation: evaluation of glutathione peroxidase activity and ROS production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 1-10 (2021).
131. Moore, C., Wallis, C., Melnick, J. L. y Kuns, M. D. Photodynamic treatment of herpes keratitis. *Infection Immun.* **5**, 169-171 (1972).
132. Namvar, M. A. y col. Effect of photodynamic therapy by 810 and 940 nm diode laser on herpes simplex virus 1: an in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **25**, 87-91 (2019).
133. Xie, J. y col. 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy reduces HPV viral load via autophagy and apoptosis by modulating Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT pathways in HeLa cells. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **194**, 46-55 (2019).
134. Zhang, W., Zhang, A., Sun, W., Yue, Y. y Li, H. Efficacy and safety of photodynamic therapy for cervical intraepithelial neoplasia and human papilloma virus infection. *Medicine.* **97**, 1-8 (2018).
135. Supuran, C. T. Agents for the prevention and treatment of age-related macular degeneration and macular edema: a literature and patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **29**, 761-767 (2019).
136. Megna, M., Fabbrocini, G., Marasca, C. y Monfrecola, G. Photodynamic therapy and skin appendage disorders: a review. *Ski. Appendage Disord.* **2**, 166-176 (2016).
137. Thunshelle, C., Yin, R., Chen, Q. y Hamblin, M. R. Current advances in 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic therapy. *Curr. Dermatol. Rep.* **5**, 179-190 (2016).
138. Monfrecola, G. y col. A critical reappraisal of off-label use of photodynamic therapy for

- the treatment of non-neoplastic skin conditions. *Dermatology*. **237**, 262-276 (2021).
139. Shishkova, N., Kuznetsova, O. y Berezov, T. Photodynamic therapy for gynecological diseases and breast cancer. *Cancer Biol. Med.* **9**, 9-17 (2012).
140. Wennink, J. W. H. y col. Macrophage selective photodynamic therapy by meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin loaded polymeric micelles: a possible treatment for cardiovascular diseases. *Eur. J. Pharm. Sci.* **107**, 112-125 (2017).

CAPÍTULO 2

SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS AGENTES FOTOTERAPÉUTICOS



SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS AGENTES FOTOTERAPÉUTICOS

2.1. SÍNTESIS DE NUEVOS FOTOSENSIBILIZADORES DE SEGUNDA GENERACIÓN

El desarrollo de nuevos Fs de segunda generación tiene como objetivo principal obtener agentes fototerapéuticos con mayor actividad fotodinámica que los prototipos.

El progreso de la TFD y TFDA se sustenta en nuevos y mejores Fs considerando las siguientes propiedades para el diseño y síntesis de un candidato ideal: i) retención selectiva en el tumor u otro tejido diana; ii) altos rendimientos cuánticos de producción de $^1\text{O}_2$; iii) fotoestabilidad y iv) penetración en el tejido blanco. Un Fs potencialmente promisorio debe además presentar una apreciable absorción en la región roja del espectro electromagnético ¹⁻³.

Los Fs que se aplican comúnmente en TFD son moléculas orgánicas con una extensa conjugación de enlaces π capaces de absorber radiaciones en la región visible del campo electromagnético, como las porfirinas (o sus congéneres clorinas y bacterioclorinas), ftalocianinas, fenotiazinas y otros ^{4,5}. Los Fs lipofílicos se emplean principalmente en diferentes tipos de cáncer, mientras que las estructuras catiónicas son más adecuadas para su aplicación en TFDA garantizando un buen grado de interacción entre la pared celular bacteriana y el Fs. Numerosos derivados catiónicos como las porfirinas policatiónicas, ftalocianinas solubles en agua y compuestos comerciales tales como Azul de Metileno (MB) y/o Azul de Toluidina (TBO), por sus siglas en inglés, han demostrado fotoactividad frente a diferentes bacterias ⁵⁻⁷.

Diversos Fs han sido aprobados para el tratamiento del cáncer por el ente regulatorio de Estados Unidos (FDA) y la Agencia de Medicina Europea (EMA, por sus siglas en inglés) (Figura 2.1) ⁸.

Photofrin[®], porfímero sódico, es el primer Fs aprobado en la clínica para su aplicación en la enfermedad conocida como Esófago de Barrett, cáncer obstructivo de esófago y de pulmón ⁹. Este agente fototerapéutico es una mezcla compleja de moléculas con una selectividad tisular relativamente baja, poca absorción de luz y pobre penetración en los tejidos. Por lo tanto se requiere una dosis alta del Fs para lograr el efecto terapéutico deseado lo que conduce a

tiempos de circulación prolongados y alta fotosensibilidad en el paciente ¹⁰⁻¹².

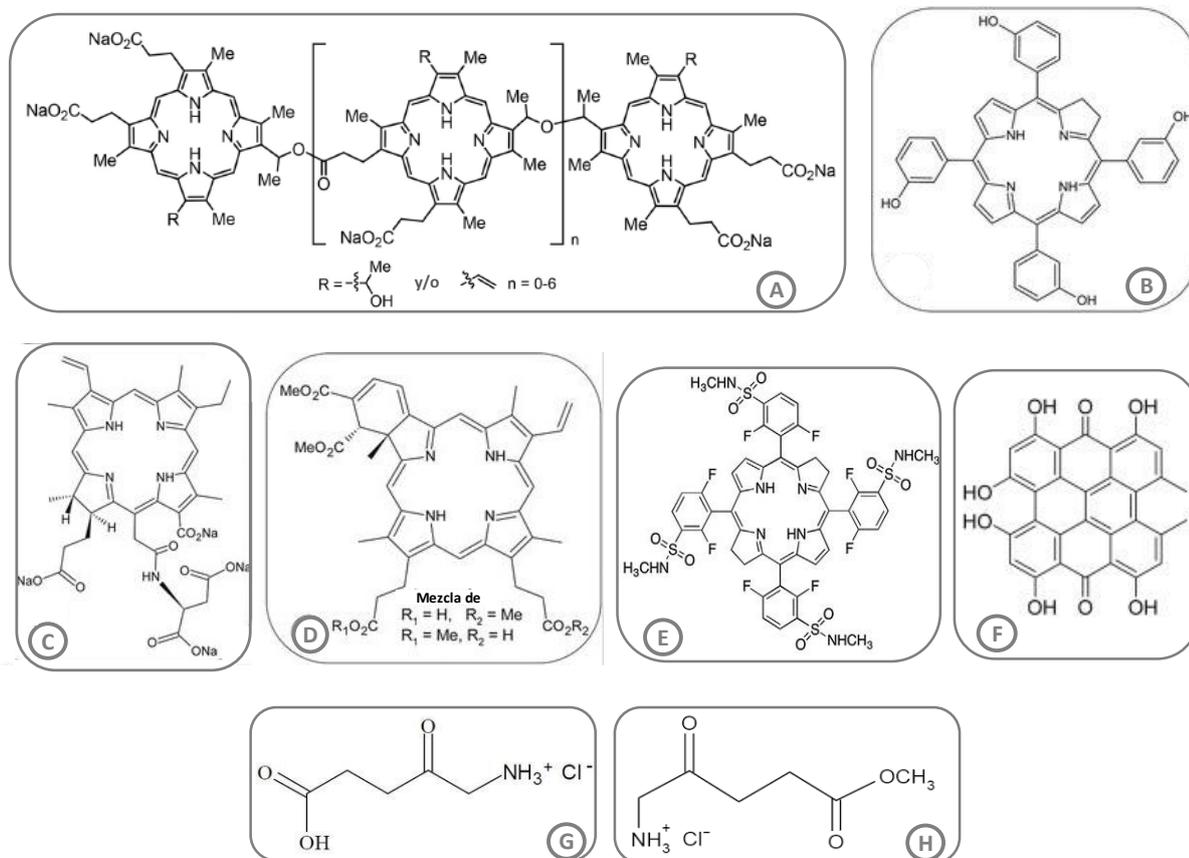


Figura 2.1: Fs aprobados por la FDA y EMA: A) Photofrin[®], B) Foscan[®], C) Laserphyrin[®], D) Visudyne[®], E) Redaporfin[®], F) SGX301[®], G) Levulan[®] y H) Metvix[®].

Las desventajas asociadas a la primera generación de Fs impulsaron una investigación extensa con el objetivo de mejorar la eficacia de las moléculas fotosensibilizadoras mediante modificaciones estructurales periféricas de las porfirinas o del núcleo porfirínico ¹³.

El segundo Fs aprobado por la EMA fue la Temoporfina, que corresponde a los de segunda generación, comercializado como Foscan[®] para el tratamiento avanzado de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello. Este Fs absorbe luz a mayores longitudes de onda que Photofrin[®] y presenta un tiempo de circulación mucho menor mejorando el perfil de seguridad ^{14,15}.

Por otra parte varias formulaciones de ALA han sido aprobadas para aplicaciones dermatológicas. El 5-ALA (Levulan[®] y Ameluz[®], clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico) tiene

licencia para el tratamiento de la queratosis actínica en tanto que su derivado de éster metílico, MAL (Metvix[®] y Metvixia[®], aminolevulinato de metilo) se aplica en los casos de queratosis actínica no hiperqueratóticas, enfermedad de Bowen, como así también en carcinomas basocelulares superficiales y nodulares. Debido a la administración local o tópica los derivados de ALA tienen un perfil de seguridad favorable en comparación con Photofrin[®]. Sin embargo estos Fs solo están indicados para lesiones superficiales debido a su limitada penetración tisular ¹⁶⁻¹⁸.

Otros Fs han sido aprobados tales como Laserphyrin[®] (Talaporfina, Fs de la familia de las clorinas) para el tratamiento de cáncer de pulmón; Visudyne[®] (Verteoporfina, derivado de una benzoporfirina) que se emplea en la degeneración macular relacionada con la edad; Redaporfin[®], perteneciente a la familia de bacterioclorinas, recomendado para la aplicación en cáncer de las vías biliares; y finalmente SGX301[®] que es una hipericina sintética utilizada en los casos de linfoma cutáneo de células T ^{19,20}.

Los antecedentes preliminares relativos a los Fs de primera generación impulsaron a numerosos autores a abordar la síntesis de nuevos compuestos porfirínicos y no porfirínicos con potencial actividad fotosensibilizadora. En las últimas décadas se han desarrollado Fs de segunda generación porfirínicos incluyendo metaloporfirinas (Lutrin[®] y Lutex[®]), un derivado de bacterioclorofila sustituido con paladio (Tookad[®]) y de la familia de las clorinas (Purlytin[®]) los cuales se encuentran en estadios de ensayos clínicos fase II y III para su aplicación principal en TFD ²¹, Figura 2.2.

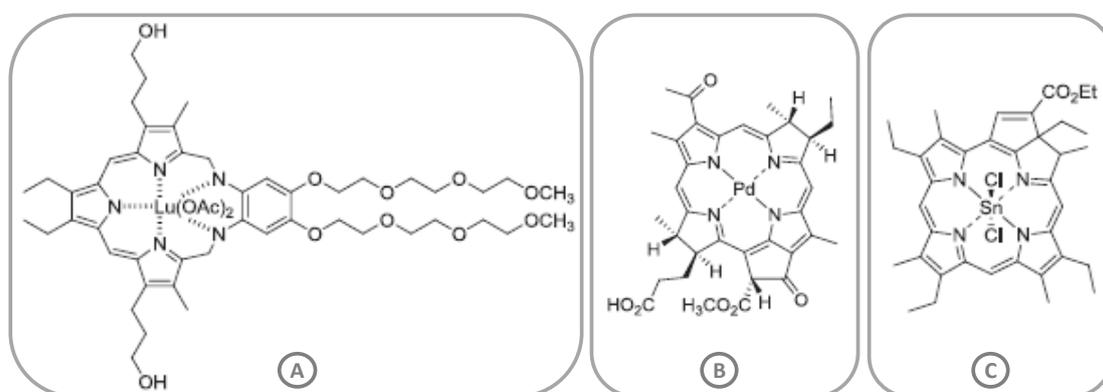


Figura 2.2: Fs en ensayos clínicos para TFD: A) Lutrin[®], B) Tookad[®] y C) Purlytin[®].

Por otra parte se impulsó la síntesis de Fs no porfirínicos tales como compuestos de la familia de fenotiazinas (MB y TBO), xantenos como Rosa de Bengala (RB), fullerenos, derivados catiónicos de *BODIPY*, entre otros, de aplicación promisorio en TFDA ^{11,22}.

La avanzada investigación con el objetivo de obtener Fs con actividad fotodinámica mejorada y el diseño racional de Fs novedosos, con propiedades fisicoquímicas y actividad fotocitotóxica óptima, sigue siendo un gran desafío para la industria farmacéutica.

El éxito de la TFD y TFDA depende principalmente del rendimiento de producción de $^1\text{O}_2$, la estabilidad del Fs, la profundidad de penetración de la luz absorbida en los tejidos y la biodistribución del Fs en el organismo y/o microorganismos, de modo que:

- 1) El $^1\text{O}_2$ generado en la fotoreacción tipo II es un factor clave considerado la principal especie citotóxica. Generalmente la introducción de átomos pesados como bromo y/o iodo en la molécula del Fs incrementa la producción de esta especie reactiva del oxígeno;
- 2) Una desventaja de los Fs actuales es su tendencia a la agregación lo que conduce a una disminución en la generación de $^1\text{O}_2$. Por lo tanto una modificación estructural que disminuya la agregación debe ser considerada con el objetivo de aumentar la actividad fotodinámica;
- 3) La introducción de sistemas conjugados ricos en electrones π puede incrementar la eficiencia de absorción de luz roja alcanzando una mayor penetración en el tejido humano;
- 4) Mejorar la biodistribución del Fs es muy importante para aumentar su eficacia y reducir los efectos adversos;
- 5) Los sustituyentes y las posiciones de los mismos en el Fs prototipo produce modificaciones en la lipofilicidad de la molécula impactando en la localización en el tejido blanco.

De acuerdo con lo expuesto, el diseño de nuevos Fs con propiedades deseables constituye un promisorio campo de investigación farmacéutica ^{23,24}.

2.1.1. Selección de prototipos

Los Fs fenotiazínicos se desarrollaron a fines del siglo XIX. MB y Tionina (Th, por sus siglas en inglés) se sintetizaron en 1876 con posterioridad al descubrimiento de los primeros derivados de anilina ^{25,26}. Los principales antecedentes relativos a la acción fotodinámica de esta familia de Fs se registraron en 1930 y corresponden a MB y TBO ²⁷⁻²⁹. Los compuestos fenotiazínicos están conformados por tres anillos aromáticos fusionados que actúan como donantes de electrones π , con bajos potenciales de oxidación por lo cual, las fenotiazinas oxidadas

presentan una alta estabilidad, poseen estructuras planas y catiónicas³⁰. Estudios vinculados a la aplicación de esta familia de Fs en TFD contra el cáncer, otras patologías no oncológicas y frente a diferentes microorganismos se ha concentrado predominantemente en MB y sus análogos desmetilados por ejemplo TBO, Azure A (AzA), Azure B (AzB), Azure C (AzC) y Th (Figura 2.3)^{3,25}.

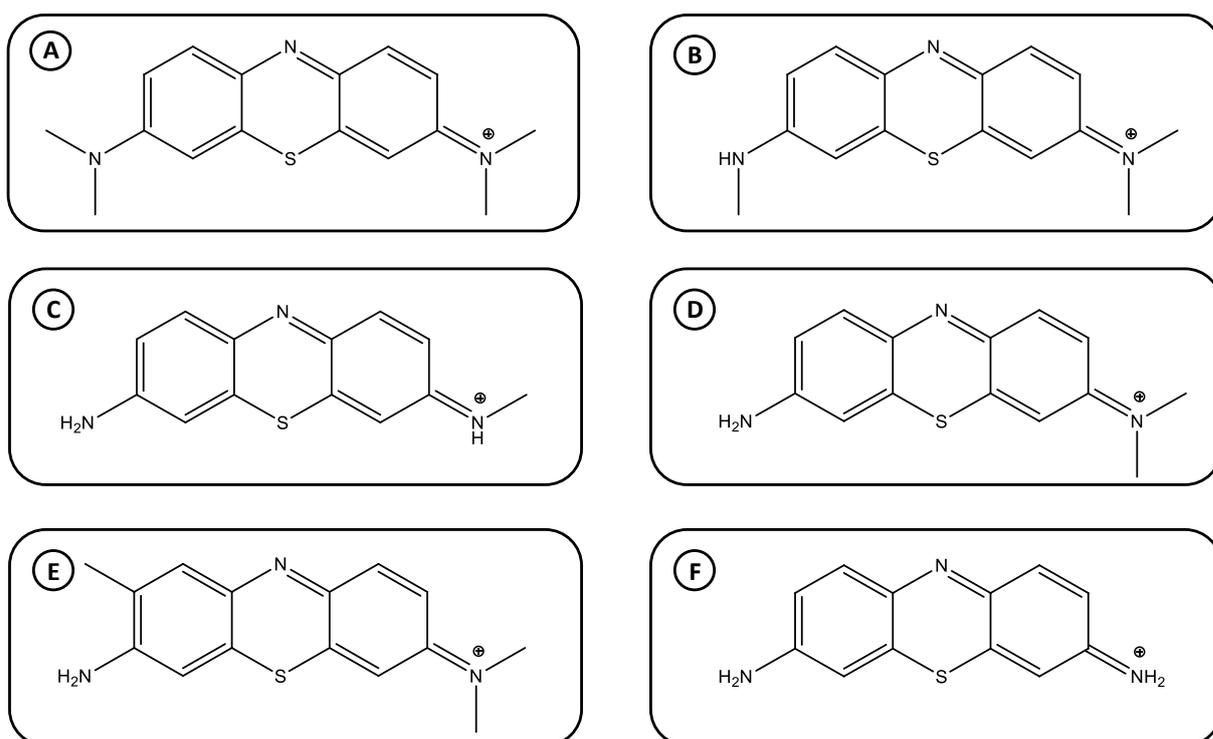


Figura 2.3: Fs Fenotiazínicos: A) Azul de Metileno (MB), B) Azure B (AzB), C) Azure C (AzC), D) Azure A (AzA), E) Toluidine Blue O (TBO) y F) Tionina (Th).

Los Fs fenotiazínicos exhiben una intensa absorción en la región de 600-660 nm del espectro electromagnético lo cual permite una penetración eficaz de la luz en los tejidos (absorción dentro de la ventana fototerapéutica)³¹⁻³³. La activación de estos Fs por luz visible genera EROs, principalmente ¹O₂, mediante una reacción fotodinámica Tipo II³. Por lo tanto la aplicación de las fenotiazinas en TFD y TFDA es consecuencia del rendimiento cuántico de producción de ¹O₂ y la baja toxicidad que presentan. Estos Fs catiónicos se caracterizan por una alta reactividad frente a componentes celulares tales como proteínas, lipoproteínas, ácidos nucleicos y una penetración limitada a través de las membranas celulares debido a su carácter hidrofílico^{25,34}.

Estudios relativos a modificaciones estructurales de los Fs fenotiazínicos con el objetivo

primordial de mejorar la actividad fotodinámica en TFD y TFDA, se centran tanto en MB como TBO^{6,35-39} y en menor proporción en los derivados AzA, AzB y AzC⁴⁰⁻⁴³.

Considerando la estructura fenotiazínica se presentan dos rutas básicas para la derivatización: la alteración auxocrómica y la modificación del cromóforo, las cuales se centran en lograr un aumento de la longitud de onda de máxima absorción (λ_{\max}) y un incremento del rendimiento cuántico de formación de $^1\text{O}_2$ ⁴⁴.

Las síntesis de nuevos Fs fenotiazínicos indican que el grado de alquilación del auxocromo impacta en la λ_{\max} por lo que debe existir un equilibrio entre la estructura, propiedades fisicoquímicas y actividad fotodinámica. Por ejemplo Th (Figura 2.3, compuesto F) al no presentar grupos alquilo auxocrómicos exhibe una λ_{\max} a 595 nm lo cual está levemente por debajo de la ventana terapéutica^{41,45}.

Los compuestos fenotiazínicos con grupos alquilo en el cromóforo son Fs activos produciendo $^1\text{O}_2$ con rendimientos cuánticos similares a MB y TBO, sin embargo, esta sustitución provocó corrimientos hipsocrómicos en la longitud de onda de máxima absorción³⁹.

Las propiedades fisicoquímicas y fotofísicas de las fenotiazinas se pueden modificar mediante la inclusión de grupos químicos simples. Los sustituyentes metilo (-CH₃) son electrónicamente inertes y no polares por lo tanto la inclusión de uno o dos de estos grupos en la estructura de MB no impactaría de manera radical. Sin embargo se demostró que la actividad fotodinámica de una serie de análogos de MB aumenta con la metilación. Propiedades tales como la lipofilidad y el rendimiento de $^1\text{O}_2$ incrementaron y la λ_{\max} disminuyó ligeramente con cada metilación^{39,41}.

Otras estrategias aplicadas en la derivatización de Fs fenotiazínicos incluyen la halogenación que genera un incremento en la producción de $^1\text{O}_2$ por efecto del átomo pesado. La introducción de sustituyentes bencénicos aumenta la longitud de onda de máxima absorción y disminuye concomitantemente el rendimiento cuántico de formación de $^1\text{O}_2$. Por otra parte la neutralidad de compuestos catiónicos puede ser conferida por desprotonación de un resto auxocrómico (-NH) lo cual permitiría incrementar la penetración celular de los Fs. También es viable lograr un aumento del carácter lipofílico general del prototipo por halogenación de cromóforos, alquilación o arilación de los grupos auxocrómicos^{41,45}.

Los antecedentes bibliográficos demuestran que los Fs catiónicos, entre los cuales cabe señalar a derivados de las fenotiazinas, son más eficientes como antibacterianos de amplio espectro en relación a sus congéneres aniónicos o neutros⁴⁴. Esto es extensivo a Fs de otras

familias de compuestos tales como porfirinas, ftalociacinas, *BODIPYS*, entre otros^{6,46,47}. La mayor eficiencia de los derivados catiónicos radica en que la pared celular de las bacterias Gram-negativas es menos permeable a las especies aniónicas, mientras que, en presencia de Fs catiónicos se produce la ruptura de la misma⁴⁸⁻⁵⁰.

La carga positiva de los Fs fenotiazínicos permite una unión eficaz al ácido nucleico de diferentes virus y en consecuencia MB y sus congéneres se aplican como sondas de ácidos nucleicos^{51,52}. Con relación a la actividad antifúngica de los agentes fotosensibilizantes se destaca que tanto los Fs aniónicos como catiónicos exhiben fototoxicidad eficaz frente a *Candida albicans*⁵³⁻⁵⁵.

La investigación relativa a compuestos fotosensibilizantes adecuados para el control de infecciones se sustenta en el aumento global de la resistencia a antimicrobianos convencionales. Con relación a lo expuesto la familia de Fs fenotiazínicos es uno de los modelos principales siendo MB el primer Fs con aplicación en el área clínica⁴⁴. Reportes bibliográficos abordan el estudio de las relaciones estructura-actividad para esta clase de agentes fotosensibilizantes. La síntesis y evaluación de diferentes derivatizaciones tienen el objetivo principal de obtener nuevos Fs que presenten una longitud de onda de máxima absorción en la ventana fototerapéutica (entre 600 nm y 800 nm) y un elevado rendimiento cuántico de formación de ¹O₂. Esto permitiría una mayor penetración tisular actuando sobre infecciones más profundas y un incremento en la generación de ¹O₂ provocando la muerte de células malignas y distintos microorganismos^{44,56,57}.

Por lo expuesto se seleccionaron como prototipos de este trabajo de Tesis Doctoral los compuestos fenotiazínicos AzA y TBO (Figura 2.3. D y E).

Ambos Fs presentan antecedentes promisorios en TFD y TFDA^{42,58-61} proponiendo diferentes tipos de derivatizaciones con el objetivo principal de revertir propiedades desfavorables y optimizar la actividad fotodinámica de los reactivos de partida.

2.1.2. Estrategias de síntesis

Con la finalidad de optimizar las propiedades fisicoquímicas y fotoquímicas de mayor interés farmacéutico correspondientes a los prototipos seleccionados se propusieron las siguientes rutas sintéticas para la preparación de nuevos derivados fenotiazínicos.

- **Halogenación:** es una estrategia ampliamente utilizada para mejorar las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de diversas familias de Fs tales como, *BODIPYS*^{62,63}, porfirinas^{64,65}, azinas⁶⁶, oxazinas y oxazonas⁶⁷, entre otros.

El $^1\text{O}_2$ generado por un Fs está regulado por la eficiencia atribuible a una transición electrónica de spin prohibido desde un estado singlete excitado a un estado triplete excitado conocido como cruce entre sistemas. La introducción de halógenos en una molécula genera un incremento de esta transición y se denomina “efecto de átomo pesado”⁶⁸. La incorporación de estos átomos además de aumentar la producción de $^1\text{O}_2$ permite la síntesis de Fs con diferentes perfiles terapéuticos^{69,70}.

La inclusión periférica de Br o I en el cromóforo de compuestos fenotiazínicos han conducido a un incremento del rendimiento cuántico de $^1\text{O}_2$ ^{43,71,72}. Por lo expuesto se plantea aplicar esta estrategia a los prototipos seleccionados con el objetivo de obtener nuevos Fs de segunda generación.

- **Síntesis de Buchwald-Hartwig:** esta reacción se aplica con la finalidad de formar enlaces C-N entre aminas y haluros de arilo a través de un acoplamiento cruzado mediado por paladio (Pd)⁷³. Además de Pd como catalizador este tipo de síntesis requiere de ligandos cuyas estructuras son uno de los determinantes más importantes para el éxito de la reacción de aminación, entre los cuales están disponibles comercialmente DavePhos[®], JohnPhos[®], XPhos[®], RuPhos[®], BrettPhos[®], Xantphos[®], entre otros⁷⁴⁻⁷⁶. Los distintos parámetros tales como la fuente de Pd, ligando, base, solvente y temperatura dan lugar a diferentes combinaciones de reactivos^{73,77}.

Estas reacciones se realizan en una amplia variedad de solventes como tolueno, 1,4-dioxano y tetrahidrofurano⁷⁸. También pueden utilizarse solventes apróticos y polares como dimetilsulfóxido (DMSO)⁷⁹ y *N,N*-Dimetilformamida (DMF)⁸⁰, puros y en mezclas⁸¹. Finalmente es importante señalar que la etapa inicial se desarrolla con el agregado de distintos compuestos inorgánicos tales como, carbonato de cesio (Cs_2CO_3), carbonato de potasio (K_2CO_3), fosfato de potasio (K_3PO_4) y terbutóxido de sodio ($(\text{CH}_3)_3\text{CONa}$), entre otros⁷⁸.

La derivatización de los prototipos seleccionados en el desarrollo de esta Tesis Doctoral permitiría obtener nuevos compuestos con mayores longitudes de onda y un incremento en

la producción de $^1\text{O}_2$ a partir de la introducción de grupos arilos y alquilarilos en los sustituyentes amino de los Fs tiazínicos ⁴⁴.

2.2. ANÁLISIS DE TOLUIDINE BLUE O-COMERCIAL (TBO)

2.2.1. Materiales y métodos

El Fs toluidine blue O (Colour Index N° 52040, CAS N° 92-31-9, Lote N° 19804BA-472) se adquirió en Sigma-Aldrich (grado de pureza $\approx 80\%$) y se evaluó por cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) empleando como fase móvil (FM) etanol (EtOH):ácido clorhídrico (HCl) 99:1 v/v ⁸². Se utilizó un revelador luz ultravioleta y placas de TLC como fase estacionaria (FE) (sílica gel 60 F254, espesor 0,25 mm sobre soporte de aluminio e indicador de fluorescencia UV254) de la marca Macherey-Nagel Polygram (Dueren, Alemania). El análisis mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) se realizó en un cromatógrafo Agilent 1100 Series (Agilent Technologies) provisto de una bomba isocrática, inyector automático, compartimiento termostatzado y detector espectrofotométrico UV-Visible de longitud de onda variable. Las determinaciones se realizaron en una columna Phenomenex Gemini C18 110A de fase reversa, 25 cm de longitud y 5 μm de tamaño de partícula (FE) utilizando metanol (MeOH):fosfato de trietilamina 83 mM (TEAP, por sus siglas en inglés) 60:40 v/v como FM, velocidad de flujo 0,8 mL/min y longitud de onda (λ) 630 nm. La adquisición de los datos cromatográficos se realizó empleando el software Agilent ChemStation (Rev. B.03.01).

La purificación de TBO comercial se llevó a cabo mediante cromatografía en columna aplicando las condiciones establecidas por McKamey MR y col., una columna de vidrio de 35 cm x 1,5 cm, sílica gel 70-230 mesh (FE) y gradiente EtOH:HCl como FM ⁸². Las fracciones eluidas presentaron un residuo blanco que se separó por extracción líquido-líquido (diclorometano (CH_2Cl_2)-solución amortiguadora de pH ≈ 13) ^{83,84}. Las muestras recuperadas en la fase orgánica se evaporaron a presión reducida en un evaporador rotatorio Büchi® Rotavapor R-114 equipado con un baño termostatzado Büchi B-480.

El reactivo de partida y las muestras purificadas se analizaron por espectrometría de masas de alta resolución (HRMS, por sus siglas en inglés) utilizando un espectrómetro de masas con detector QTOF (micrOTOF-QII Series, Bruker) y fuente de ionización por electrospray (ESI). La

adquisición de datos y procesamiento se desarrolló aplicando los programas Compass Version 3.1 y DataAnalysis Version 4.0, respectivamente. La concentración de las muestras para análisis fue de 10 µg/mL en MeOH y se aplicó inyección directa.

2.2.2. Resultados y discusión

La evaluación de TBO comercial por TLC frente a Th, AzA, AzB y MB como testigos se realizó aplicando la FM, EtOH:HCl 99:1 v/v descrita por Loach KW, la cual evidenció la presencia de AzC con una relación de frente (R_f)= $0,68 \pm 0,2$ (Figura 2.4.A y B). Si bien AzC no estaba disponible como referencia se pudo inferir que está presente en la muestra comercial de TBO en base al R_f descrito en literatura ⁸⁵. El análisis por HPLC en diferentes condiciones cromatográficas evidenció dos picos con tiempos de retención (t_R) diferentes y sin una separación definida (Figura 2.5), FM= MeOH: TEAP 83 mM 60:40 v/v y flujo= 0,8 mL/min.

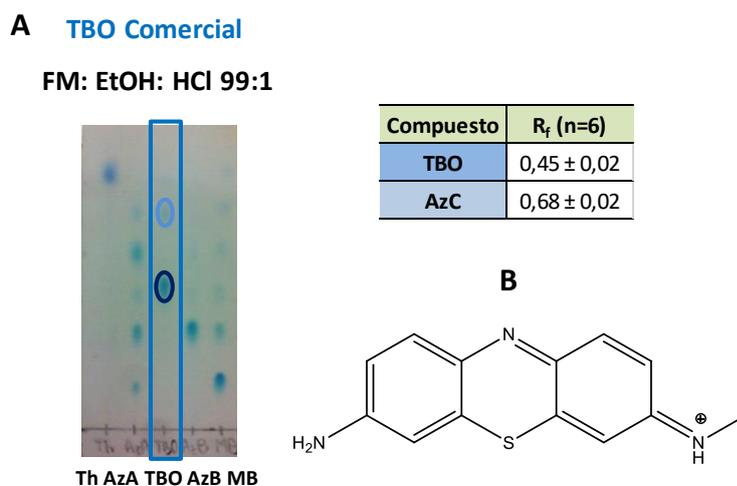
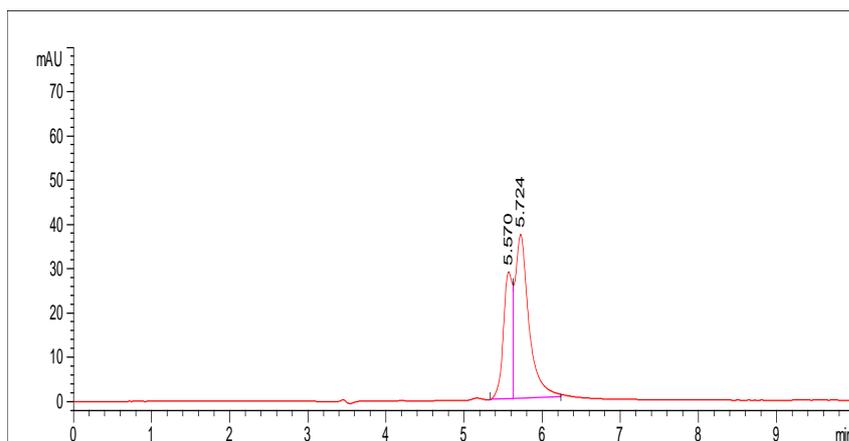


Figura 2.4: A) Evaluación de Fs fenotiazínicos por TLC: FM= EtOH:HCl 99:1 v/v. Se señala a TBO comercial. B) Estructura química de AzC.

Con el objetivo de identificar la impureza presente en TBO comercial se evaluó por HRMS en las condiciones descritas en la sección 2.2.1. Los espectros experimental y simulado se muestran en la Figura 2.6.



FM= MeOH:TEAP 83mM
60:40 v/v. Flujo 0,8
mL/min.

Compuesto	t_R (min)
1	5,71 ± 0,04
2	5,55 ± 0,05

Figura 2.5: Cromatograma HPLC TBO comercial.

La ampliación del espectro experimental del reactivo de partida comercial permitió observar la presencia de TBO el cual es coincidente con el simulado, Figura 2.6.A. Se evidenció el pico correspondiente al ión molecular (M^+) de TBO con una m/z de 270,1040 y los picos isotópicos $M+1$ y $M+2$ a las m/z 271,1059 y 272,1009, respectivamente. Adicionalmente en una ampliación del espectro, se visualizó un pico a una m/z de 242,0717 en muy baja proporción atribuible al M^+ de AzC. En la Figura 2.6.B se muestra la ampliación del espectro donde se infiere la presencia de la impureza AzC en la muestra comercial de TBO.

A partir de éstos resultados se planteó la purificación mediante cromatografía en columna y extracción líquido-líquido acorde a las condiciones descriptas en la sección 2.2.1.

Las muestras purificadas se analizaron por HRMS demostrando espectros experimentales coincidentes con los simulados correspondientes a TBO y AzC. Se observaron los picos correspondientes al M^+ y los picos isotópicos $M+1$ y $M+2$ para cada uno de los compuestos (Figura 2.7). La conjunción de metodologías permitió purificar y confirmar por HRMS la estructura correspondiente a TBO con la presencia de los picos a las relaciones m/z 270,1046 (M^+), 271,1079 ($M+1$) y 272,1039 ($M+2$) (Figura 2.7.A). Por otra parte, la Figura 2.7.B muestra el espectro experimental con los picos atribuibles al M^+ de AzC con una m/z igual a 242,0743 y los picos isotópicos a las m/z de 243,0685 ($M+1$) y 244,0683 ($M+2$). De esta manera se pudo corroborar que la muestra comercial de TBO presenta como impureza a AzC.

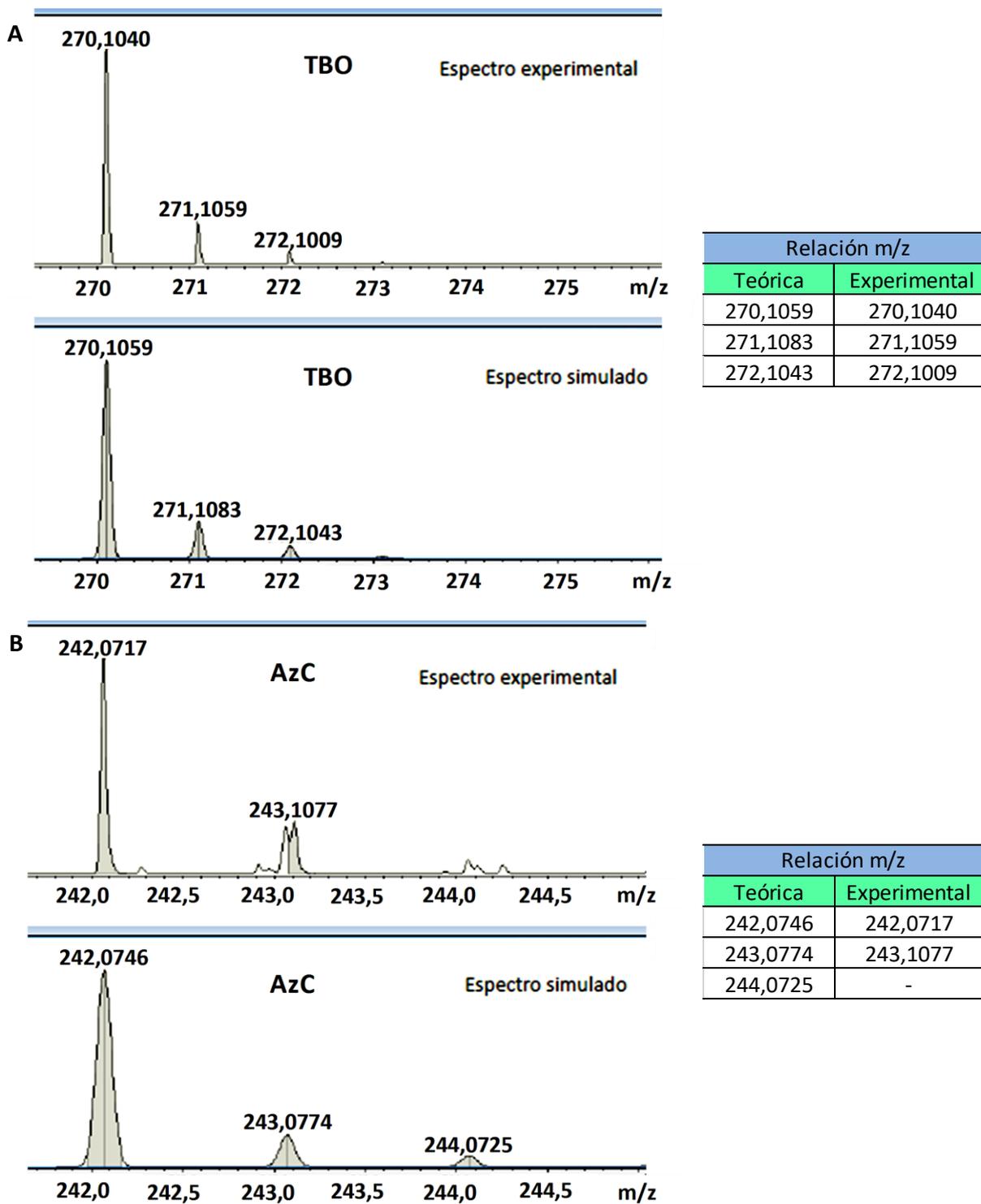


Figura 2.6: Análisis por HRMS de TBO comercial. **A)** Ampliación de TBO: Espectros experimental y simulado. **B)** Ampliación de AzC: Espectros experimental y simulado.

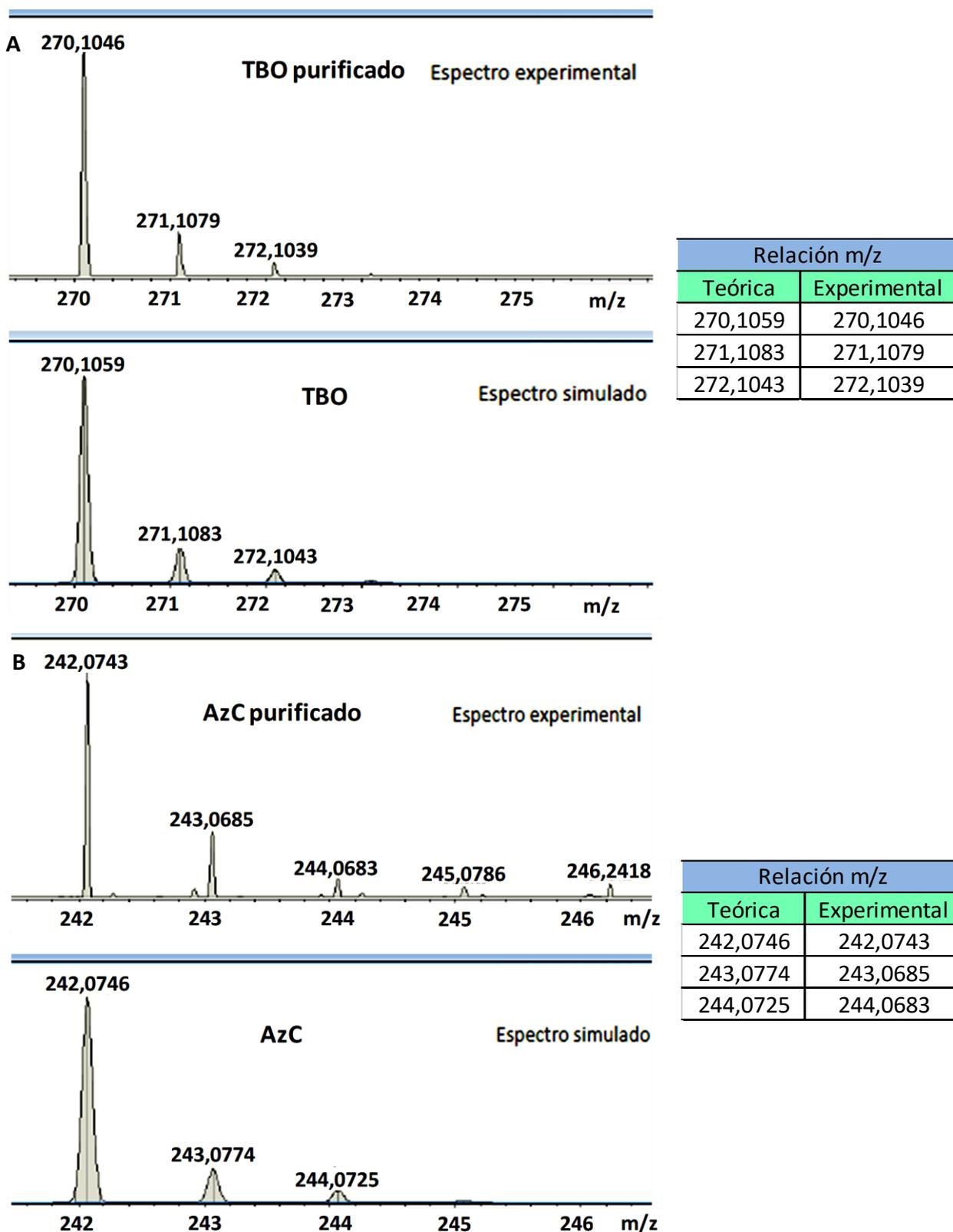


Figura 2.7: Análisis por HRMS. Espectros experimental y simulado. **A)** TBO purificado. **B)** AzC purificado.

2.3. BROMACIÓN DE TBO

2.3.1. Materiales y métodos

Los antecedentes bibliográficos no informan la bromación de AzC, impureza presente en el prototipo de partida, por lo que se propuso derivatizar a TBO y AzC a partir de TBO comercial sin purificación previa.

Se emplearon *N*-bromosuccinimida (NBS) de Sigma- Aldrich, CAS N° 128-08-5, Lote N° 89F1026 y bromo molecular (Br_2) de Carlo Erba, 99,5% P/P como agentes halogenantes. Los solventes y reactivos empleados en las síntesis fueron de grado pro-análisis (Cicarelli, Sintorgan o Anedra) y las soluciones acuosas se prepararon en agua ultrapura obtenida del sistema de purificación de agua Milli-Q[®] (Millipore Corporation). Las reacciones se desarrollaron en campana de extracción de gases y con los equipos de protección personal apropiados.

La síntesis utilizando NBS, se ensayó en ácido acético (HAc) a una relación molar TBO:NBS 1,0:1,0; T° Amb. y tiempos de reacción 15 min, 60 min y 24 h⁸⁶⁻⁸⁸. El agente halogenante se añadió al Fs con agitación continua en HAc, T° Amb y con protección de la luz. La reacción se finalizó con el agregado de H₂O Milli-Q[®]. Posteriormente se realizaron sucesivas extracciones con CH₂Cl₂ y los crudos de síntesis se analizaron por HPLC empleando el cromatógrafo, las condiciones y el software detallados en la sección 2.2.1.

En los experimentos que se empleó Br₂ como agente halogenante se ensayaron distintas relaciones molares de Fs:Br₂ (1,0:0,4 a 1,0:6,5), MeOH y HAc como solventes y diferentes tiempos de reacción (15, 30 y 60 min). Las síntesis se finalizaron mediante el burbujeo de N₂ con el objetivo de eliminar el exceso de Br₂ y los crudos se evaluaron por HPLC aplicando las condiciones cromatográficas descriptas en la sección 2.2.1.

Una vez establecidos los parámetros óptimos de reacción se desarrolló la purificación del crudo de síntesis por cromatografía en columna (58 cm de longitud x 2 cm de diámetro). La siembra se preparó por adsorción en Sílica Gel, FE= Sílica Gel 70-230 Mesh (0,063 mm-0,200 mm, TA1386734 622, Merck[®]), solvente de empaquetado CH₂Cl₂ y FM= gradiente CH₂Cl₂:EtOH. Los compuestos de interés se analizaron por HRMS (sección 2.2.1) y las muestras se evaluaron en MeOH por inyección directa a una concentración de analito 10 µg/mL.

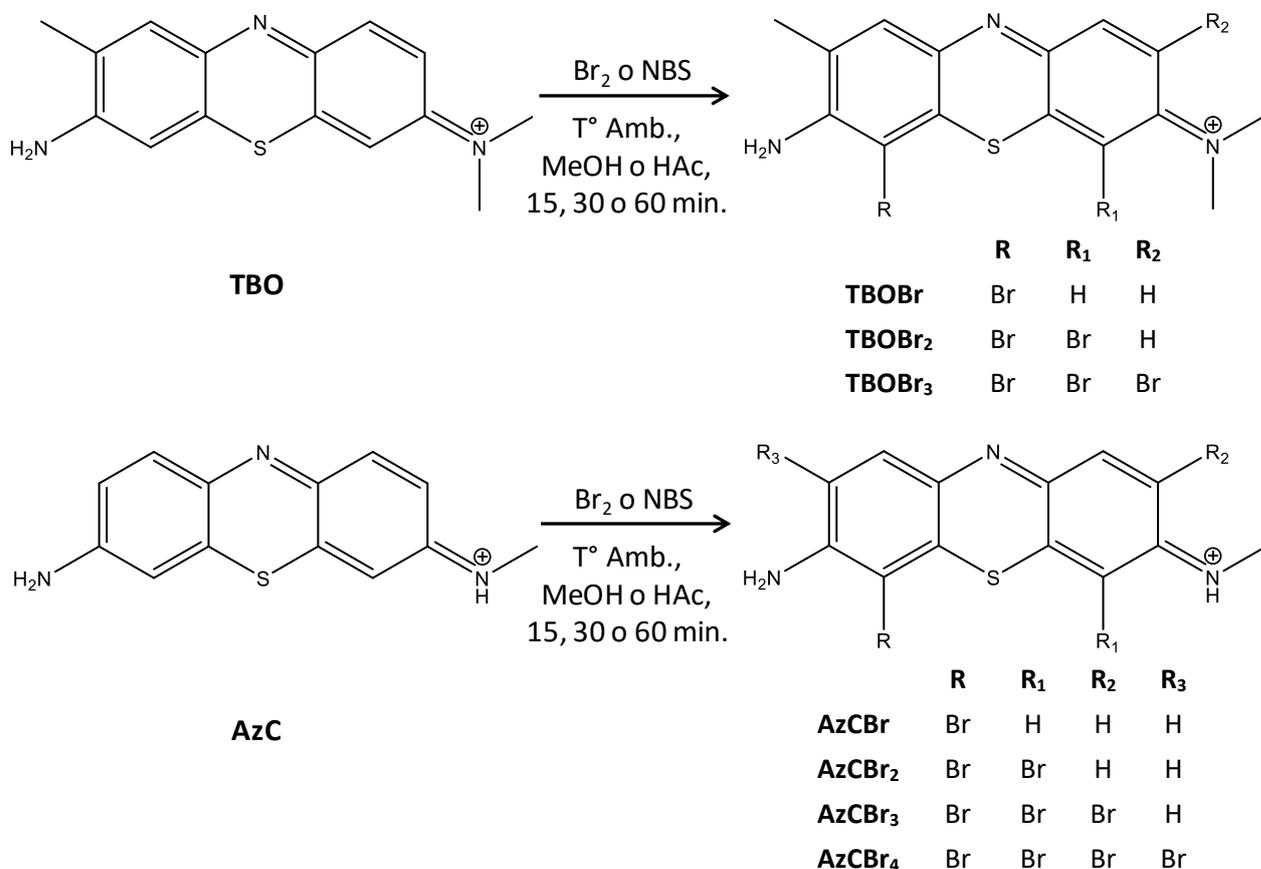
La caracterización por resonancia magnética nuclear (RMN) se realizó en un espectrómetro

de RMN de 400 MHz Bruker AVANCE II 400 (Bruker BioSpin, Billerica, MA) utilizando Acetona- d_6 (Sigma-Aldrich- Lote MKBV1056V) y la concentración aproximada de las muestras fue 20 mM. Los espectros de ^1H -RMN se calibraron con el solvente a 2,05 ppm y los datos se procesaron con el programa MestReNova Versión 6.0.2-5475 (©2009, MestreLab Research S.L.).

La evaluación de los nuevos derivados por espectrofotometría UV-visible se realizó en un espectrofotómetro Varian Cary 50 y una cuba de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Las curvas espectrales se analizaron aplicando el programa OriginPro 8 SRO (OriginLab Corporation).

2.3.2. Resultados y discusión

Las diferentes condiciones de síntesis evaluadas permitirían la obtención de los siguientes compuestos bromados de TBO y AzC (impureza presente en la muestra comercial) que se resumen en el Esquema 1.



Esquema 1: Esquema general de la bromación de TBO y AzC.

Los ensayos realizados empleando como agentes halogenantes Br₂ y NBS indicaron por HPLC la presencia de una mezcla de productos que se resumen en la Tabla 2.1. Los antecedentes bibliográficos señalan que NBS permite la bromación de distintos tipos de compuestos con excelente rendimiento y alta regioselectividad⁸⁹⁻⁹⁴. La evaluación de NBS como agente de bromación se llevó a cabo a 15 min, 60 min y 24 h sin observar diferencias relevantes en el número de derivados correspondientes a la bromación de TBO y AzC. De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó Br₂ como mejor agente halogenante, ya que el tratamiento de la reacción con NBS requiere de una extracción líquido-líquido con el objetivo de eliminar el subproducto *N*-succinimida.

Los resultados del estudio sistemático de las condiciones de reacción de TBO comercial desarrollados en MeOH y HAc, relación molar de reactivos TBO:Br₂ 1,0:1,0; 15 min y T° Amb se muestran en la Tabla 2.2. Se evidenció por HPLC igual número de productos nuevos seleccionando, por tal motivo, MeOH como medio óptimo para un tratamiento rápido del crudo de síntesis.

Tabla 2.1: Bromación de TBO: Evaluación del agente halogenante.

t_R (min)	% Productos Bromados^A	
Productos Bromados	Halogenación con Br₂	Halogenación con NBS
3,43^B	14,7	17,5
3,77	35,5	43,5
3,96	11,7	-
4,45	30,8	36,9
4,96	7,34	-
5,19	-	2,29

A: HPLC n=2. **B:** Reactivo de partida.

Relación molar de reactivos TBO:Agente halogenante 1,0:1,0; HAc; T° Amb y 15 min.

Tabla 2.2: Bromación de TBO: Evaluación del solvente de reacción.

t_R (min)	% Productos Bromados^A	
Productos Bromados	Solvente	
	MeOH	HAc
3,43^B	14,7	33,6
3,77	35,5	37,3
3,96	11,7	9,99
4,45	30,8	14,9
4,96	7,34	3,31

A: HPLC n=2. **B:** Reactivo de partida.

Relación molar de reactivos TBO:Br₂ 1,0:1,0; 15 min y T° Amb. Solventes: MeOH y HAc.

La evaluación del curso de la reacción a distintos tiempos tales como 15, 30 y 60 min, relación molar de reactivos TBO:Br₂ 1,0:1,0; MeOH y T° Amb no indicaron diferencias significativas, seleccionando como tiempo óptimo de reacción 15 min, Tabla 2.3.

Los resultados que se presentan en las Tablas 2.1-2.3 corresponden al análisis por HPLC empleando como FM MeOH:TEAP 83 mM 70:30 v/v y flujo 1 mL/ min descrita en bibliografía para los Fs fenotiazínicos⁹⁵.

Tabla 2.3: Bromación de TBO: Evaluación del tiempo de reacción.

t _R (min)	% Productos Bromados ^A		
Productos Bromados	Tiempo de reacción (min)		
	15	30	60
3,43 ^B	14,7	9,07	5,59
3,77	35,5	34,4	31,6
3,96	11,7	12,4	14,3
4,45	30,8	33,6	38,4
4,96	7,34	10,5	10,1

A: HPLC n=2. **B:** Reactivo de partida.

Relación molar de reactantes TBO:Br₂ 1,0:1,0; MeOH y T° Amb a los 15, 30 y 60 min.

La Tabla 2.4 muestra, como parte del estudio sistemático de las condiciones de reacción, el ensayo de distintas relaciones molares de TBO:Br₂ desde 1,0:3,5 hasta 1,0:6,5. Cabe destacar que las proporciones de reactantes desde 1,0:0,4 a 1,0:2,0 presentaron un número importante de productos (datos no mostrados). Como se puede observar en la Tabla 2.4 con las relaciones molares TBO:Br₂ 1,0:5,5 y 1,0:6,5 disminuyó el número de compuestos obtenidos sin presentar diferencias significativas en los porcentajes relativos. Por lo expuesto, se determinó como condición óptima de reacción la relación de reactantes 1,0:5,5.

Tabla 2.4: Bromación de TBO: Evaluación de la relación de reactantes.

t _R (min)	% Productos Bromados ^A			
Productos Bromados	Relación TBO:Br ₂			
	1,0:3,5	1,0:4,5	1,0:5,5	1,0:6,5
9,16	5,89	3,36	-	-
9,45	21,7	19,4	35,4	34,0
10,1	15,3	7,87	6,16	4,94
12,4	9,31	9,15	57,0	58,6
12,8	44,5	58,8	-	-

A: HPLC n=2.

Condiciones de reacción: MeOH, 15 min y T° Amb.

La evaluación por HPLC en este caso se desarrolló utilizando como FM la mezcla MeOH:TEAP 83 mM 60:40 v/v y flujo 0,8 mL/min descrita en la sección 2.2.1.

El análisis de los diferentes parámetros de síntesis permitió establecer que las condiciones óptimas para la bromación de TBO son como agente halogenante Br₂, relación de reactantes TBO:Br₂: 1,0:5,5; MeOH, 15 min y T° Amb, Figura 2.8.

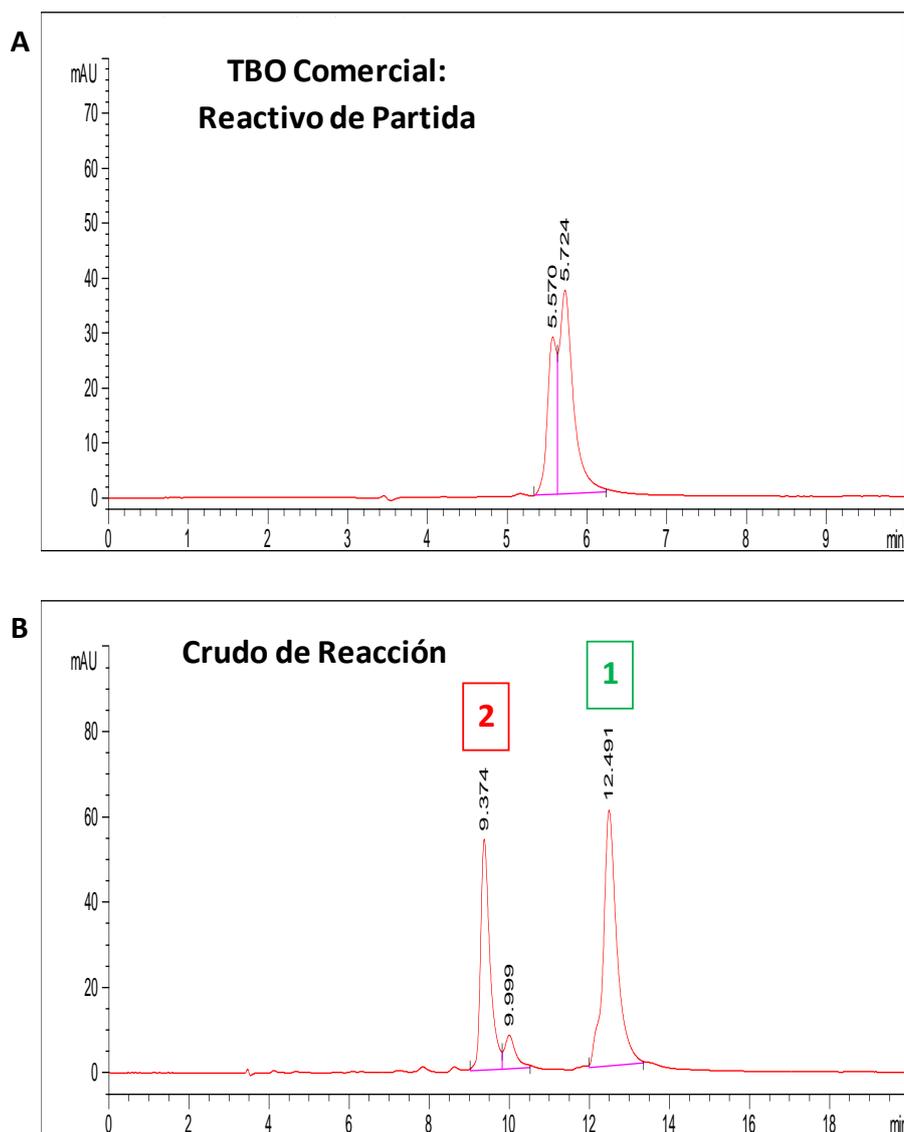


Figura 2.8: Cromatogramas HPLC: **A)** TBO comercial. **B)** Crudo de reacción. Condiciones óptimas: TBO:Br₂ 1,0:5,5; MeOH; 15 min y T° Amb. FM= MeOH:TEAP 83 mM 60:40 v/v y flujo 0,8 mL/min.

La purificación del crudo de reacción (Figura 2.9.A) se desarrolló aplicando cromatografía en columna con el gradiente Cl₂CH₂:EtOH. El producto N° 1 de t_R= 11,5±0,2 min con un 91 % de

pureza relativa por HPLC (Figura 2.9.**B**) se separó utilizando la fase móvil $\text{Cl}_2\text{CH}_2:\text{EtOH}$ 95:5 v/v y el derivado N° 2 de $t_R = 9,5 \pm 0,1$ min con un 86 % de pureza relativa, migró de la columna cromatográfica con la relación $\text{Cl}_2\text{CH}_2:\text{EtOH}$ 92:8 v/v, Figura 2.9.**C**.

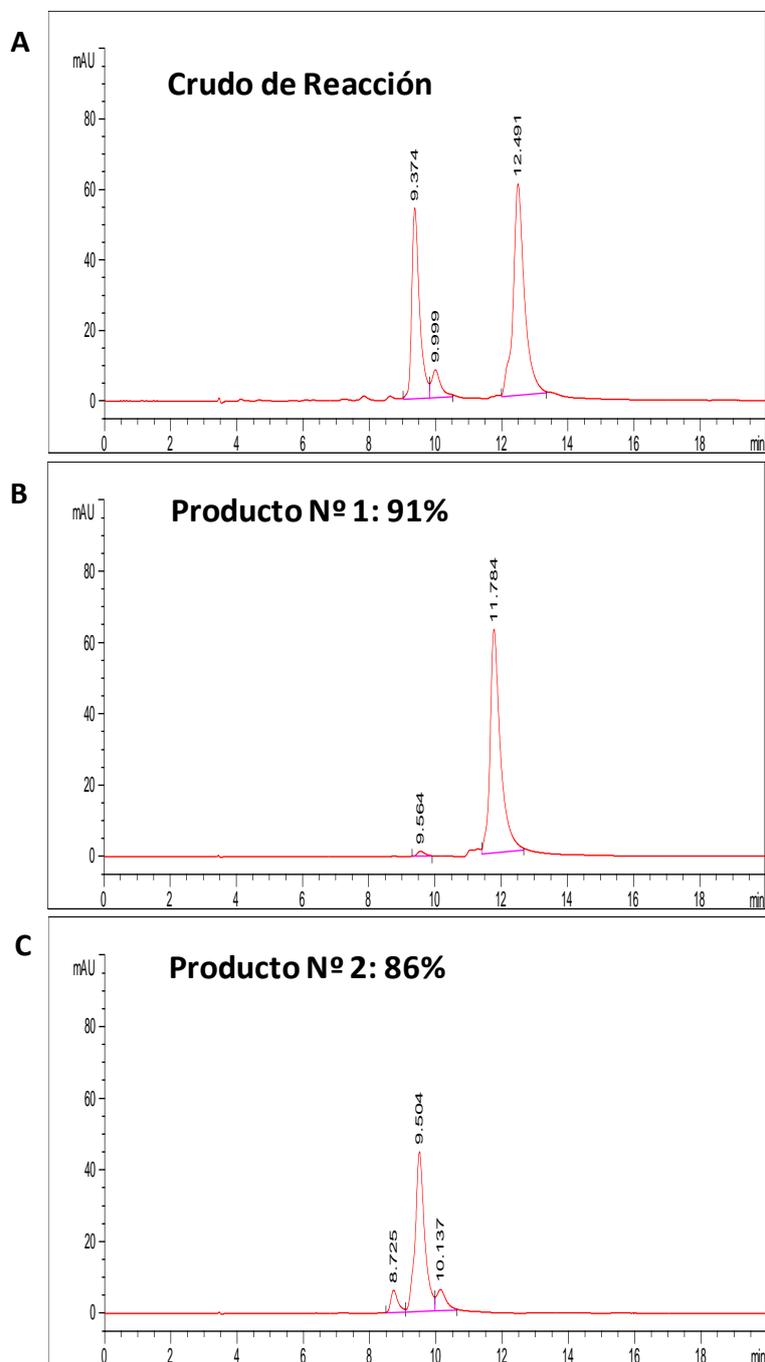


Figura 2.9: Cromatogramas HPLC: **A)** Crudo de reacción. **B)** Producto N° 1 purificado. **C)** Producto N° 2 purificado. FM= MeOH:TEAP 83 mM 60:40 v/v y flujo 0,8 mL/min.

Las muestras puras obtenidas por cromatografía en columna y evaluadas por HPLC se

analizaron por HRMS acorde al procedimiento descrito en la sección 2.2.1. Se determinó inequívocamente que el derivado N° 1 corresponde al compuesto dibromado de TBO (TBOBr₂) presentando el perfil típico de las estructuras químicas dibromadas, Figura 2.10.

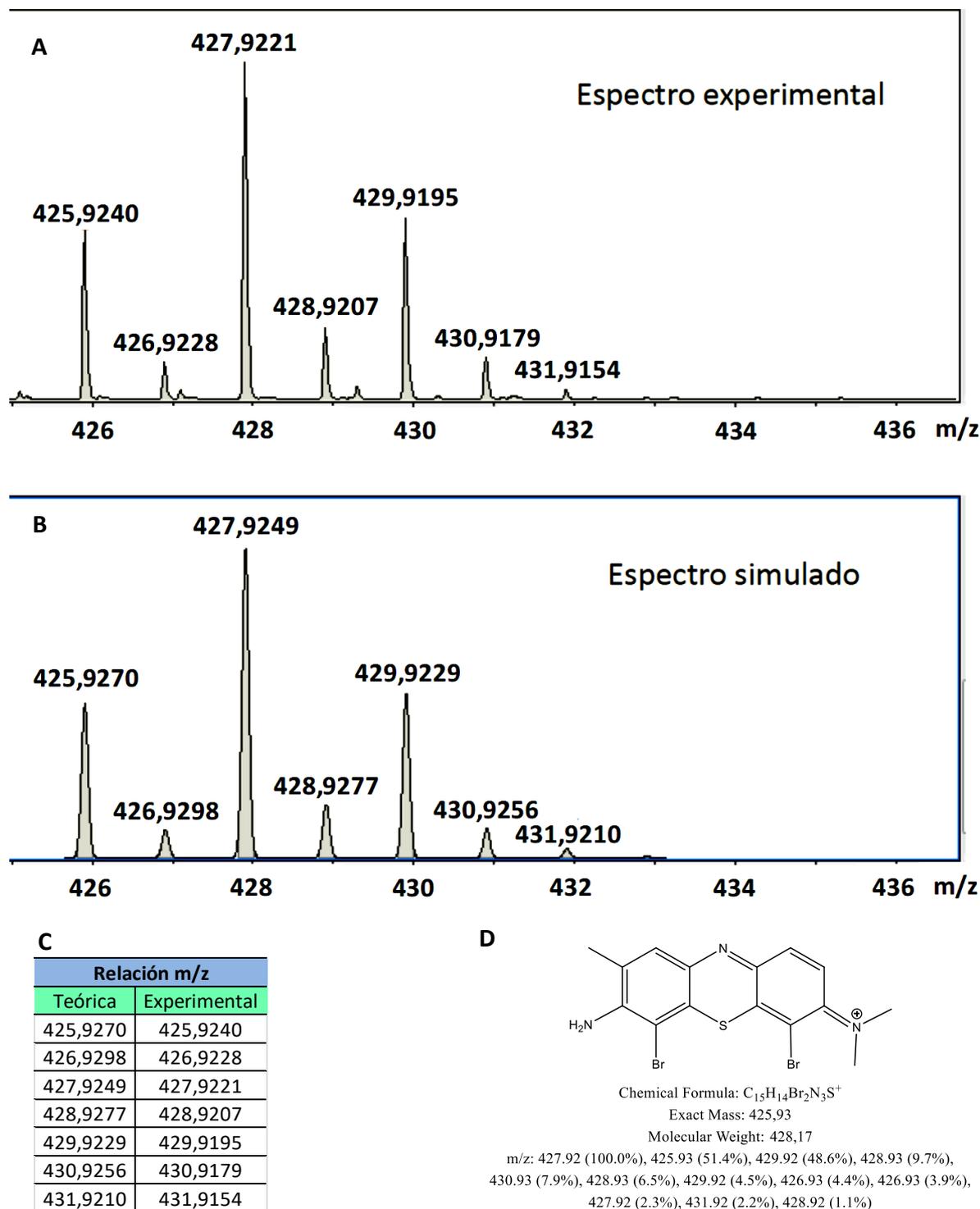


Figura 2.10: Análisis del nuevo derivado bromado de TBO por HRMS: **A)** Espectro de masas experimental. **B)** Espectro de masas simulado. **C)** Tabla de relaciones m/z. **D)** Datos calculados para TBOBr₂ (derivado N° 1).

Se evidenció la presencia del pico M^+ ($m/z = 425,9240$) junto con los picos isotópicos $M+2$ ($m/z = 427,9221$) y $M+4$ ($m/z = 429,9195$) y el patrón 1:2:1 entre los mismos característico de un compuesto con dos bromos en su estructura. El espectro experimental es coincidente con el perfil simulado de $TBOBr_2$. El análisis por HRMS correspondiente al derivado N° 2 indicó que la estructura es atribuible al producto dibromado de AzC ($AzCBr_2$). La Figura 2.11 muestra los espectros experimental y simulado.

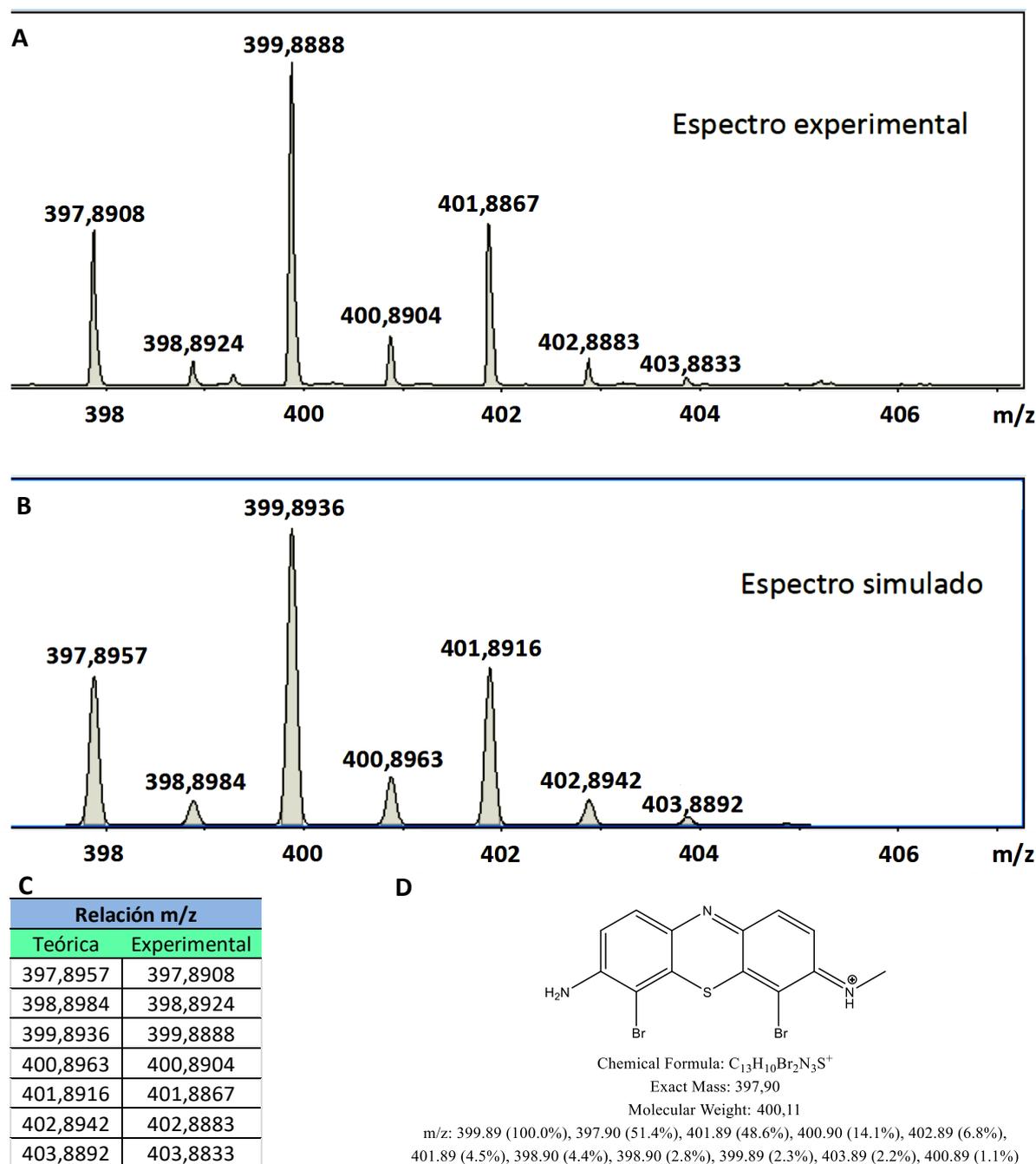


Figura 2.11: Análisis del nuevo derivado bromado de AzC por HRMS: **A)** Espectro de masas experimental. **B)** Espectro de masas simulado. **C)** Tabla de relaciones m/z. **D)** Datos calculados para $AzCBr_2$ (derivado N° 2).

Se observaron los picos M+, M+2 y M+4 a las m/z 397,8908; 399,8888 y 401,8867, respectivamente. Se visualizó el patrón isotópico 1:2:1 propio de los compuestos dibromados y un espectro experimental coincidente con el simulado de AzCBr₂.

Los nuevos derivados fenotiazínicos se caracterizaron estructuralmente por espectrometría de resonancia magnética nuclear de protones (¹H-RMN) en Acetona-*d*₆, molécula cuyos grupos metilos presentan un corrimiento químico (δ)= 2,05 ppm, permitiendo determinar sin dificultad los protones aromáticos pero no así la porción alifática, debido al eclipsamiento de las señales por el pico correspondiente al solvente deuterado. Reportes bibliográficos señalan la dificultad en la caracterización de derivados de TBO por ¹H-RMN empleando cloroformo deuterado (δ= 7,25 ppm) ya que las señales aromáticas son eclipsadas por las correspondientes al disolvente residual y por esta razón, los autores señalan que se evaluó la porción alifática de las moléculas ^{96,97}.

A diferencia de lo reportado por Robinson-Duggon y col en nuestro caso se realizó la caracterización por RMN de los nuevos derivados bromados mediante la porción aromática. El espectro en Acetona-*d*₆ correspondiente a TBOBr₂ permitió establecer que los protones en las posiciones 3 y 11 fueron sustituidos por átomos de Br (Figura 2.12.A y C).

TBOBr₂: ¹H-RMN (Acetona-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 7,60-7,70 (m, 2H, **6** y **13**); 7,91 (d, 1H, *J*_{orto}= 8,0 Hz, **14**).

Por otra parte, el espectro de ¹H-RMN del derivado AzCBr₂ en Acetona-*d*₆ permitió establecer las sustituciones por átomos de bromo correspondientes a los protones de los carbonos 3 y 11 y las *J*_{orto} atribuibles a las interacciones de los protones en las posiciones 13 y 14 (Figura 2.12.B y D).

AzCBr₂: ¹H-RMN (Acetona-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 7,52 (d, 1H, *J*_{orto}= 8,8 Hz, **1**); 7,69 (d, 1H, *J*_{orto}= 8,1 Hz, **13**); 7,91 (d, 1H, *J*_{orto}= 8,9 Hz, **14**); 8,03 (m, 1H, **6**).

Los espectros ¹H-RMN y los datos obtenidos por HRMS permitieron corroborar que los nuevos derivados corresponden inequívocamente a las estructuras dibromadas de TBO y AzC.

El análisis por espectrofotometría UV-Visible en la FM MeOH:TEAP 83 mM 60:40 v/v permitió observar para TBO y el derivado halogenado, un máximo de absorción a 625 nm y 621 nm respectivamente (Figura 2.13.A). El corrimiento hipsocrómico de la longitud de onda de máxima absorción se corresponde a la introducción de dos átomos de bromo en la estructura del prototipo.

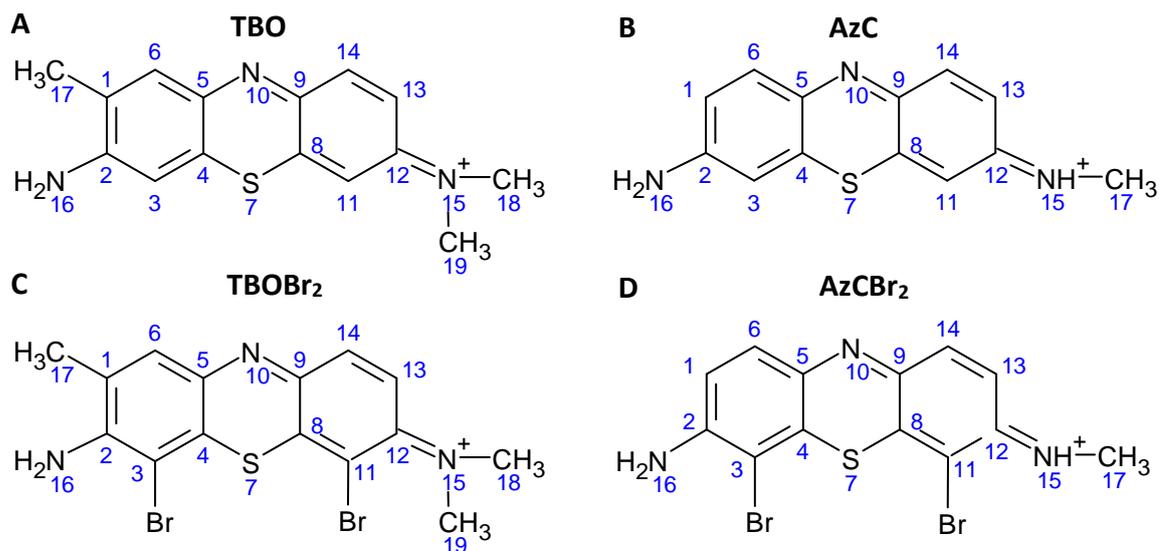


Figura 2.12: Estructuras químicas de los compuestos: **A)** TBO, **B)** AzC, **C)** TBOBr₂ y **D)** AzCBr₂.

Por otra parte, AzC presentó un máximo de absorción a 613 nm y AzCBr₂ a 606 nm mostrando un corrimiento hipsocrómico de la longitud de onda de máxima absorción (Figura 2.13.B).

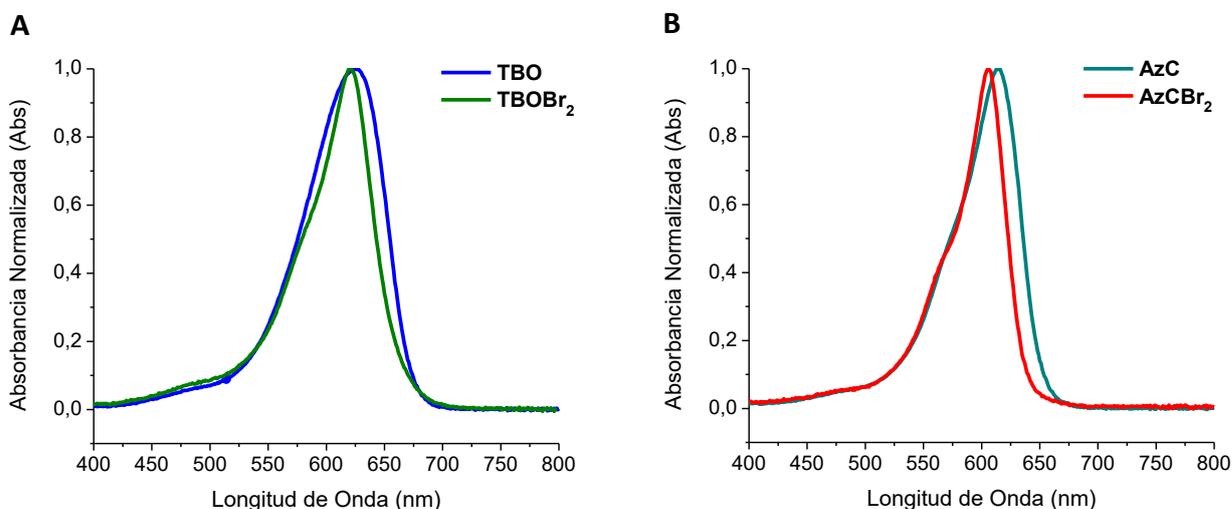


Figura 2.13: Análisis por espectrofotometría UV-Visible en FM= MeOH:TEAP 83 mM 60:40 v/v: **A)** Curvas espectrales de TBO y TBOBr₂. **B)** Curvas espectrales de AzC y AzCBr₂.

Los nuevos derivados dibromados mostraron en la FM estudiada (MeOH:TEAP 83 mM 60:40 v/v) un desplazamiento hipsocrómico de la longitud de onda de máxima absorción con respecto a los precursores. Estos resultados se corresponden con lo reportado en bibliografía la cual establece que los átomos de bromo por efecto inductivo atraen electrones disminuyendo la energía de los orbitales π y π^* del anillo aromático^{98,99}.

El comportamiento espectrofotométrico de los Fs en MeOH permitió determinar para TBO un máximo de absorción a 623 nm y para TBOBr₂ dos bandas a 493 nm y 612 nm, Figura 2.14.A. El derivado dibromado presentó un corrimiento hipsocrómico que coincide con los antecedentes del grupo de investigación⁹⁵. Los compuestos pertenecientes a la familia de las tiazinas, exhiben máximos de absorción próximos a los 500 nm atribuibles a las especies monoméricas lo que se corresponde con la banda de TBOBr₂ a 493 nm. Adicionalmente es reconocido que la introducción de átomos pesados estabiliza al monómero por impedimento estérico dificultando la agregación de los compuestos^{71,100}.

Por otra parte, la evaluación de AzC y el nuevo derivado dibromado en MeOH, evidenció para el prototipo de partida un máximo de absorción a 612 nm y para AzCBr₂ una banda significativa a 606 nm y otras menores a 565 y 516 nm, Figura 2.14.B.

Estos resultados se corresponden con lo descrito anteriormente para TBOBr₂ con relación a la estabilización de la especie monomérica en medios orgánicos.

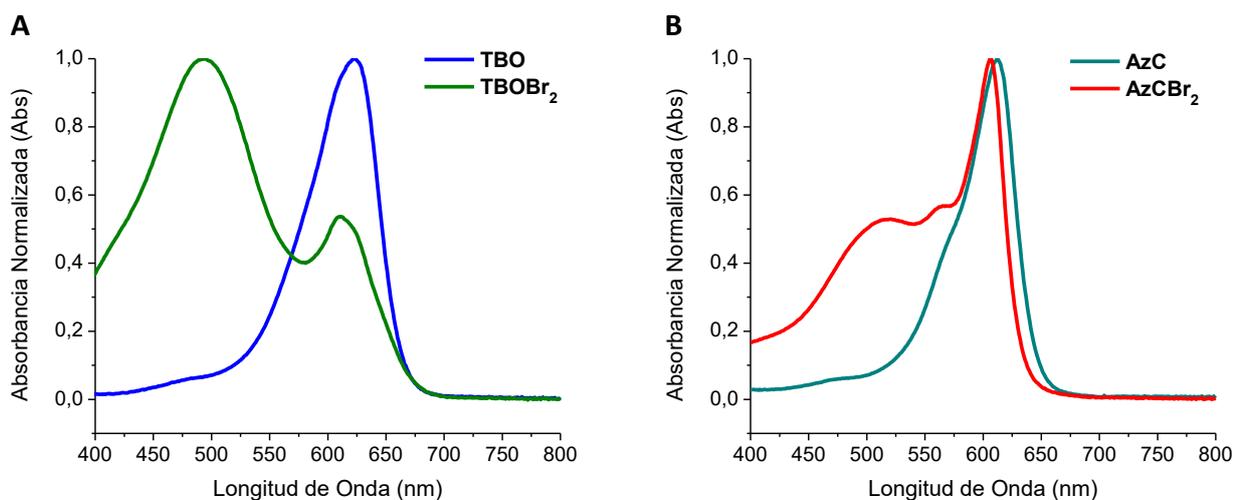


Figura 2.14: Análisis por Espectrofotometría UV-Visible en MeOH: **A)** Curvas espectrales de TBO y TBOBr₂. **B)** Curvas espectrales de AzC y AzCBr₂.

Los ensayos realizados y el análisis de los mismos marcaron la necesidad de abordar un estudio profundo del fenómeno de agregación, en diferentes medios y concentraciones del Fs, con el objetivo de determinar tanto las especies predominantes (monómeros, dímeros y agregados de orden superior) como así también las longitudes de onda de máxima absorción que las caracteriza (Capítulo 4).

2.4. ANÁLISIS DE AZURE A-COMERCIAL (AzA)

2.4.1. Materiales y métodos

El compuesto AzA (Colour Index N° 52005, CAS N° 531-53-3) se adquirió en Sigma-Aldrich (grado de pureza ≥ 70 %) y se evaluó mediante TLC empleando como FM EtOH:cloroformo (CHCl_3):HAc 8,0:1,0:2,0 v/v. Se utilizó como revelador luz ultravioleta y placas de TLC detalladas en la sección 2.2.1. El análisis por HPLC se realizó aplicando las condiciones descritas en bibliografía para las fenotiazinas MeOH:TEAP 70:30 v/v como FM, velocidad de flujo de 1,0 mL/min y $\lambda = 630$ nm⁹⁵. Se empleó la FE, el cromatógrafo y el software informados en la sección 2.2.1.

La purificación de AzA comercial se realizó por cromatografía en columna aplicando las condiciones definidas por McKamey MR y col⁸². Las fracciones eluidas presentaron un residuo blanco que se eliminó por extracción líquido-líquido (sección 2.2.1). Las muestras recuperadas en la fase orgánica se evaporaron a presión reducida en el evaporador rotatorio Büchi® Rotavapor R-114 equipado con un baño termostatzado Büchi B-480.

2.4.2. Resultados y discusión

La evaluación de AzA comercial por TLC frente a testigos se realizó en primer término aplicando la FM EtOH: CHCl_3 :HAc 8,5:1,0:0,5 v/v descripta por Loach KW la cual evidenció la presencia de AzC, AzB y MB (Figura 2.15.A)⁸⁵. En este caso se infirió la presencia de AzC como impureza del reactivo de partida considerando el R_f descripto en literatura para este compuesto. Con el objetivo de lograr una mejor resolución cromatográfica se ensayó como FM EtOH: CHCl_3 :HAc 8,0:1,0:2,0 v/v (Figura 2.15.B) obteniendo para el compuesto AzA un $R_f = 0,54 \pm 0,02$ (n=6). El análisis por HPLC en las condiciones cromatográficas descriptas en la sección 2.4.1 muestra un pico mayoritario con un $t_R = 3,4 \pm 0,1$ min (n=6) (Figura 2.16.A). Este resultado no se ajusta a lo observado por TLC, por tal motivo se evaluó el reactivo de partida utilizando como FM MeOH:TEAP 83 mM 60:40 v/v, flujo 1 mL/min a diferentes λ (285 nm, 488 nm, 610 nm, 630 nm y 645 nm). Este ensayo permitió evidenciar la presencia de distintas impurezas en la muestra comercial (Figura 2.16.B).

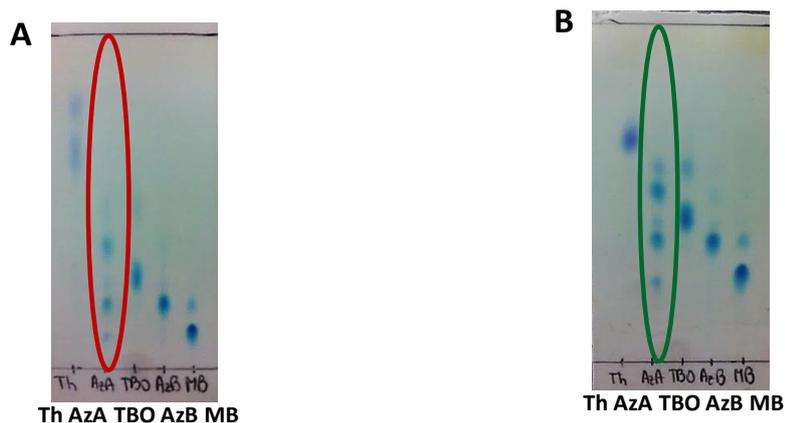


Figura 2.15: Evaluación de Fs Fenotiazínicos comerciales por TLC: **A)** FM= EtOH:CHCl₃:HAc 8,5:1,0:0,5 v/v. **B)** FM= EtOH:CHCl₃:HAc; 8,0:1,0:2,0 v/v. Se destacan las corridas correspondientes a AzA.

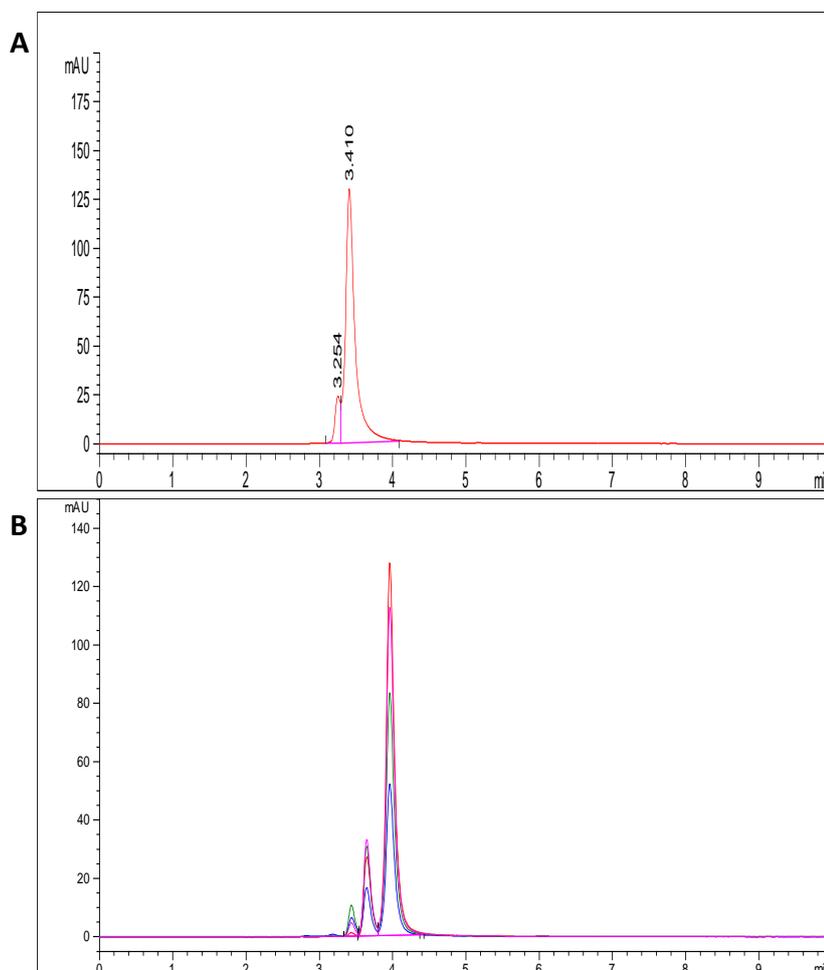


Figura 2.16: Análisis de AzA comercial por HPLC: **A)** FM= MeOH:TEAP 83 mM 70:30 v/v, flujo 1 mL/min y 630 nm. **B)** FM= MeOH:TEAP 83 mM 60:40 v/v, flujo 1 mL/min y diferentes λ (285 nm, 488 nm, 610 nm, 630 nm y 645 nm).

Los ensayos realizados aplicando cromatografía en columna y extracción líquido-líquido (sección 2.2.1) no permitieron aislar el compuesto AzA, con un buen grado de pureza, como consecuencia de la presencia de un sólido blanco y la inestabilidad del Fs en medios extremadamente básicos^{83,101,102}.

Por lo expuesto se dio curso a la derivatización de AzA sin purificación previa.

2.5. BROMACIÓN DE AzA

2.5.1. Materiales y métodos

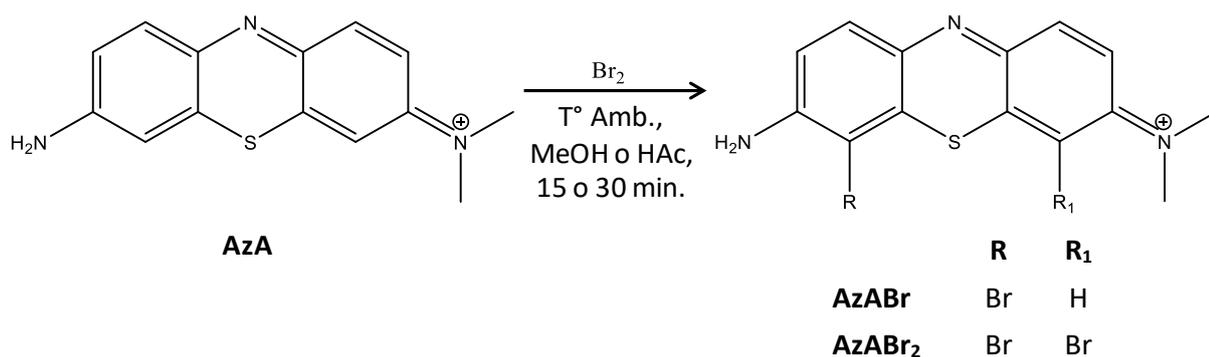
Los solventes y reactivos empleados se describen en la sección 2.3.1. La bromación de AzA sin purificación previa del precursor se realizó con Br₂ (Carlo Erba, 99,5% P/P) en campana de extracción de gases con los equipos de protección personal apropiados. Todas las reacciones se finalizaron mediante el burbujeo de N₂.

La relación Fs:Br₂, medios y tiempos de reacción se evaluaron aplicando las condiciones cromatográficas de TLC y HPLC descritas en la sección 2.4.1. Definidos los parámetros óptimos de síntesis se procedió a la purificación mediante cromatografía en columna en las condiciones descritas en la sección 2.2.1. Posteriormente se realizaron sucesivas extracciones con CH₂Cl₂ y los crudos de síntesis se analizaron por HPLC utilizando el cromatógrafo y las condiciones descritas en las secciones 2.2.1 y 2.4.1.

El producto de reacción purificado se evaluó por HRMS y se analizó por espectrofotometría UV-Visible en la FM empleada en HPLC (MeOH:TEAP 83 mM 70:30 v/v) y MeOH (sección 2.2.1).

2.5.2. Resultados y discusión

Los diferentes parámetros de síntesis evaluados permitirían la obtención de los compuestos de interés que se resumen en el Esquema 2.



Esquema 2: Esquema general de la bromación de AzA.

La Tabla 2.5 resume el estudio sistemático de las condiciones de reacción ensayadas a temperatura ambiente y evaluadas mediante HPLC. El análisis de distintos medios de reacción permitió establecer que con MeOH se obtiene un mayor rendimiento del producto de interés en comparación con HAc (entradas 3 y 10, respectivamente). No se presentaron diferencias significativas en los porcentajes relativos del producto de reacción en MeOH a 15 min y 30 min (entradas 4 y 9). El estudio de diferentes relaciones de reactantes indicó un aumento en el porcentaje relativo del producto bromado al incrementar la cantidad de Br₂ (entradas 1 a 4). Sin embargo no se evidenció un crecimiento significativo para las relaciones AzA:Br₂ correspondientes a las entradas 5 a 8.

Tabla 2.5: Ensayos de bromación de AzA

Entrada	Solvente de Reacción	Relación Molar AzA:Br ₂	Tiempo (min)	% Área* Producto
1	MeOH	1,0:0,4	15	7,41
2		1,0:0,6		39,2
3		1,0:0,8		52,8
4		1,0:1,0		55,7
5		1,0:1,2		59,2
6		1,0:1,5		56,9
7		1,0:1,8		56,1
8		1,0:2,0		47,5
9	HAc	1,0:1,0	30	53,3
10		1,0:0,8	15	8,74
11		1,0:2,4		48,2

*Valor relativo determinado por HPLC. Condiciones cromatográficas en sección 2.4.1.

Por lo expuesto, las condiciones óptimas de reacción para la bromación de AzA comercial es la relación molar de reactantes AzA:Br₂ 1,0:1,0; MeOH; 15 min y T° Amb. (entrada 4).

Los cromatogramas correspondientes al reactivo de partida y los productos de síntesis se muestran en las Figuras 2.17.A y 2.17.B, respectivamente. La purificación del crudo de reacción se realizó por cromatografía en columna en las condiciones descritas en la sección 2.3.1. La elución con CHCl₃: EtOH 87,5:12,5 v/v permitió obtener el producto de síntesis con un 96% de pureza relativa, Figura 2.17.C y las correspondientes fracciones se evaporaron a presión reducida, se conservaron al vacío y protegidas de la luz.

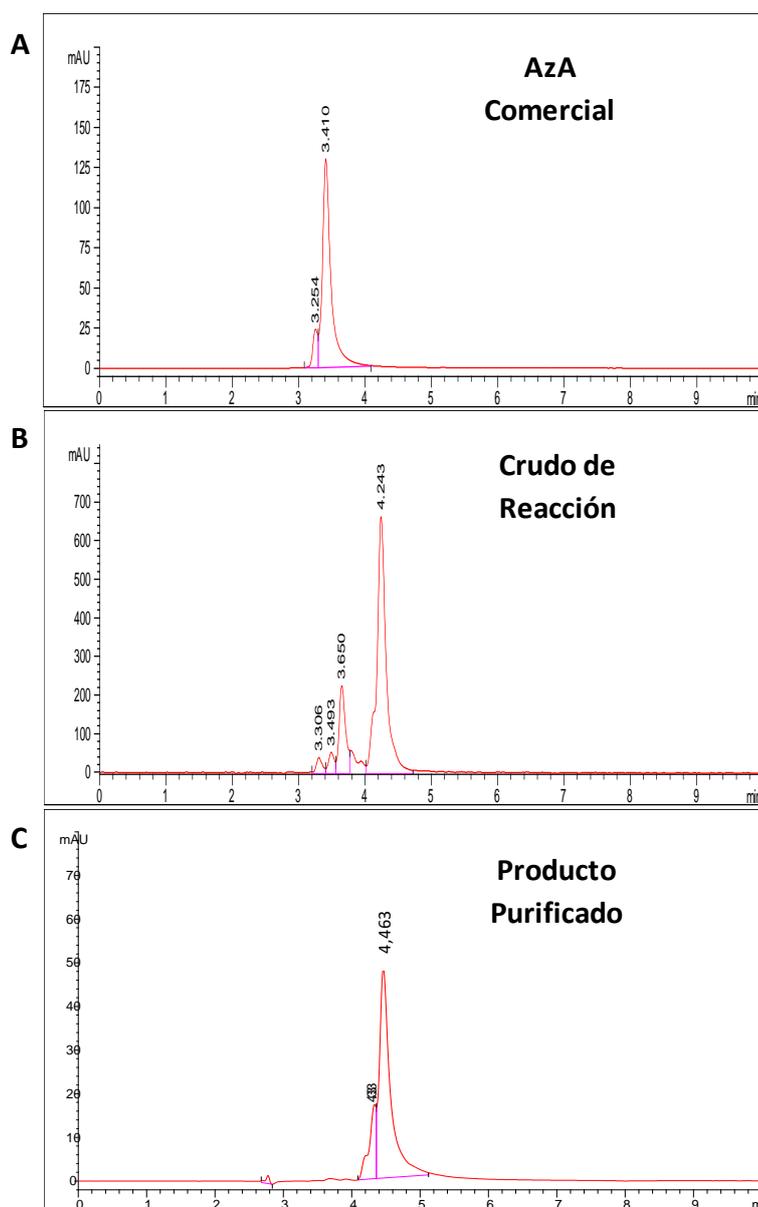


Figura 2.17: Cromatogramas HPLC. **A)** Reactivo de partida AzA. **B)** Crudo de reacción de bromación de AzA. Condiciones óptimas: AzA:Br₂ 1,0:1,0; MeOH; tiempo 15 min y T° Amb. **C)** Producto bromado de AzA purificado (96% de pureza relativa).

La muestra purificada del nuevo derivado halogenado se analizó por HRMS en las condiciones descritas en la sección 2.3.1. El espectro experimental fue coincidente con el espectro simulado de AzA dibromado y, por consiguiente, atribuible a AzABr₂, Figura 2.18.

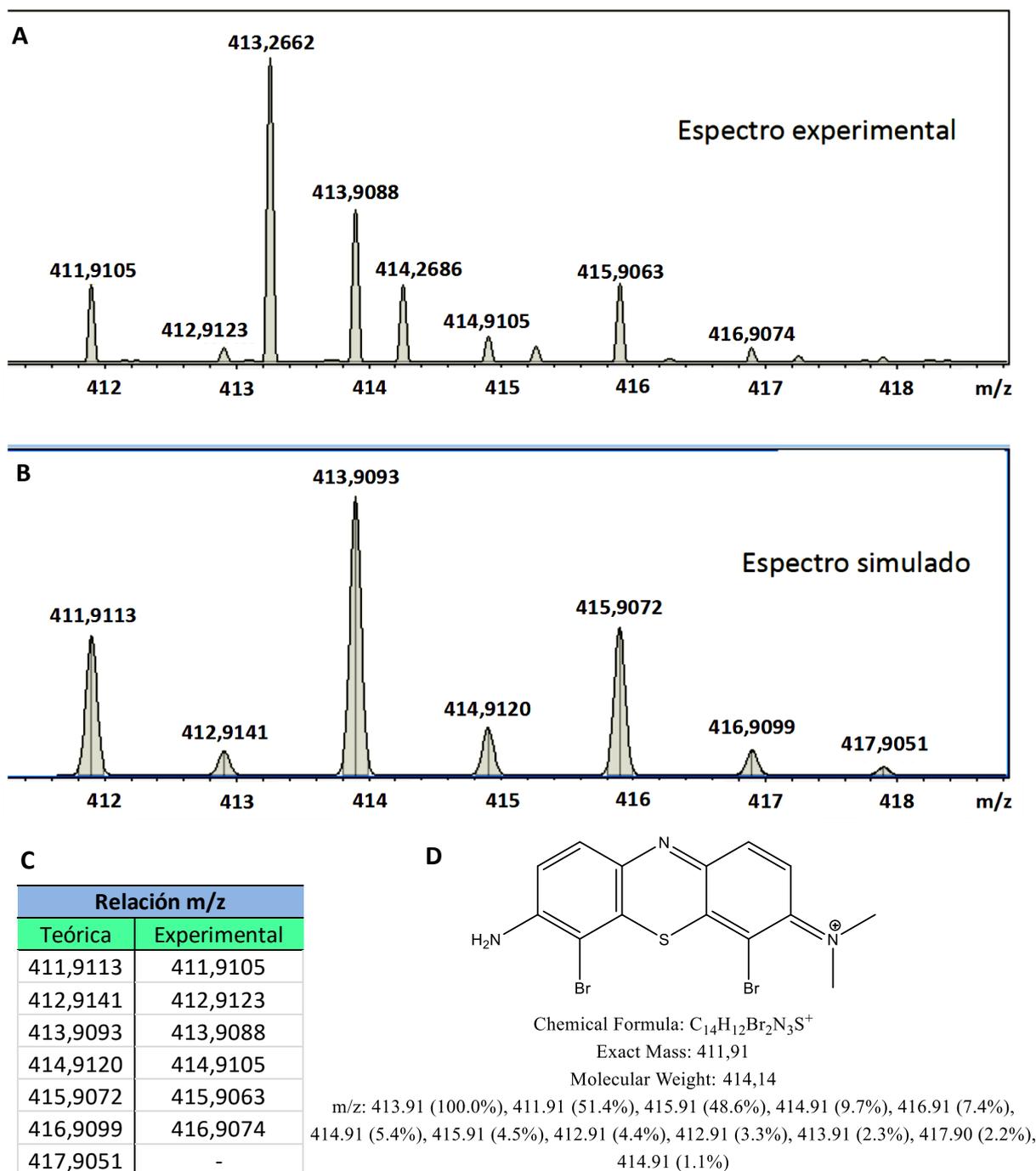


Figura 2.18: Análisis del nuevo derivado bromado de AzA por HRMS: **A)** Espectro de masas experimental. **B)** Espectro de masas simulado. **C)** Tabla de relaciones m/z. **D)** Datos calculados para AzABr₂.

El espectro experimental obtenido presenta el patrón 1:2:1 correspondiente a un producto con dos bromos en su estructura con los picos M+, M+2 y M+4 a las m/z de 411,9105, 413,9088 y 415,9063, respectivamente.

Debido a la relación molar de reactantes AzA:Br₂ 1,0:1,0 era esperable la obtención del producto monobromado (AzABr). La técnica de HRMS es altamente sensible permitiendo la detección de trazas de compuestos, en consecuencia, el espectro experimental de la muestra purificada evidenció la presencia de los derivados mono y dibromados de AzA. En la Figura 2.19 se presentan el espectro experimental con sus correspondientes ampliaciones y los respectivos simulados. Se observó el perfil isotópico 1:2:1 característico de las estructuras químicas dibromadas. Adicionalmente, se visualizó el patrón 1:1 correspondiente al compuesto con un átomo de bromo. El análisis del espectro indica la preponderancia del derivado AzABr₂ con intensidades cercanas a 1×10^5 , en comparación con el compuesto monobromado que es próxima a 6×10^3 . La formación de AzABr₂ como producto mayoritario de reacción se corresponde con los antecedentes bibliográficos que señalan el predominio del derivado dibromado^{103,104} y/o una mezcla de productos mono, di y tribromados de compuestos de las familias de 1-indanonas, naftalenos, del pirrol, pireno, anilinas y fenilfenotiazinas entre otras, en condiciones experimentales comparables a las ensayadas en el desarrollo de esta Tesis Doctoral^{103,105}. También se han reportado derivatizaciones de pirroles, triazaciclazinas y diferentes compuestos aromáticos con el agente halogenante NBS y la relación sustrato:halógeno 1,0:1,0 obteniendo resultados similares^{106–108}.

El nuevo derivado AzA dibromado se evaluó por TLC y HPLC obteniendo un $R_f = 0,50 \pm 0,02$ (FM= EtOH:CHCl₃:HAc 8:1:2 v/v (n=6)) y $t_R = 4,4 \pm 0,1$ min (FM= MeOH:TEAP 83 mM 70:30 v/v y flujo= 1 mL/min (n=6)).

Las curvas espectrales correspondientes a AzA y su derivado dibromado se muestran en la Figura 2.20. El análisis realizado en la FM empleada en HPLC permitió observar un corrimiento batocrómico de la λ_{max} del nuevo compuesto dibromado presentando un máximo de absorción a 630 nm siendo a 606 nm el correspondiente a AzA, Figura 2.20.A. Los resultados obtenidos son comparables con lo reportado en bibliografía para diferentes familias de Fs a las cuales se incorporan halógenos en la estructura química^{109–113}.

Por otra parte AzABr₂ y AzA en MeOH presentaron un máximo de absorción a 606 nm y 624 nm, respectivamente. El nuevo derivado dibromado en este medio se caracteriza por un corrimiento hipsocrómico de la λ_{max} , Figura 2.20.B.

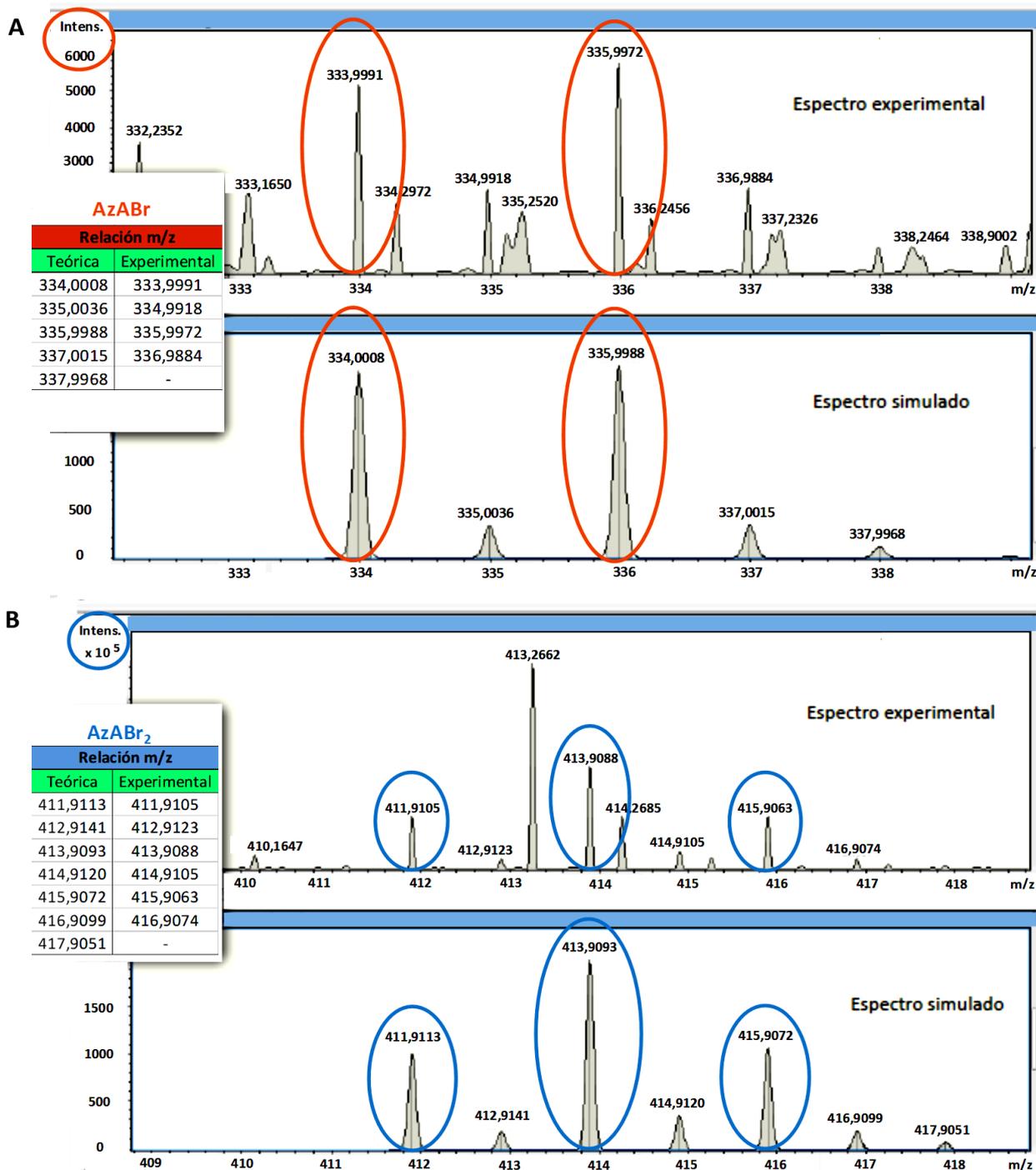


Figura 2.19: Análisis por HRMS del derivado bromado de AzA: **A) AzABr:** Ampliación del espectro de masas experimental y simulado. **B) AzABr₂:** Ampliación del espectro de masas experimental y simulado. Se señalan los perfiles típicos de los correspondientes compuestos mono y dibromados.

La evaluación de AzABr₂ en la FM evidenció una banda a 630 nm y un hombro a 608 nm; en tanto que en MeOH se observó a 606 nm y a 627 nm, Figura 2.21.

Antecedentes bibliográficos indican que los compuestos correspondientes a la familia de las fenotiazinas en diferentes medios y concentraciones del Fs experimentan el fenómeno de agregación⁹⁵, por lo tanto el comportamiento que evidenció AzABr₂ en la FM y MeOH podría explicarse mediante esta característica. Es ampliamente conocido que en medios acuosos está ampliamente favorecida la formación de dímeros y/o agregados de orden mayor que presentan diferentes longitudes de onda, en tanto que los solventes orgánicos tienden a desfavorecer la agregación^{71,114}.

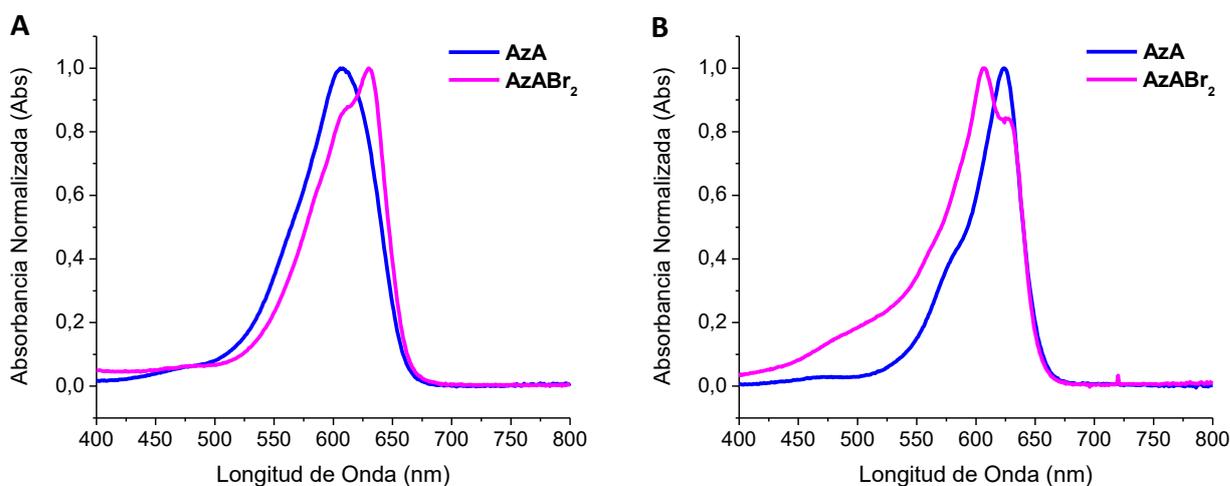


Figura 2.20: Análisis por Espectrofotometría UV-Visible: **A)** Curvas espectrales de AzA y AzABr₂ en FM= MeOH:TEAP 83 mM 70:30 v/v. **B)** Curvas espectrales de AzA y AzABr₂ en MeOH.

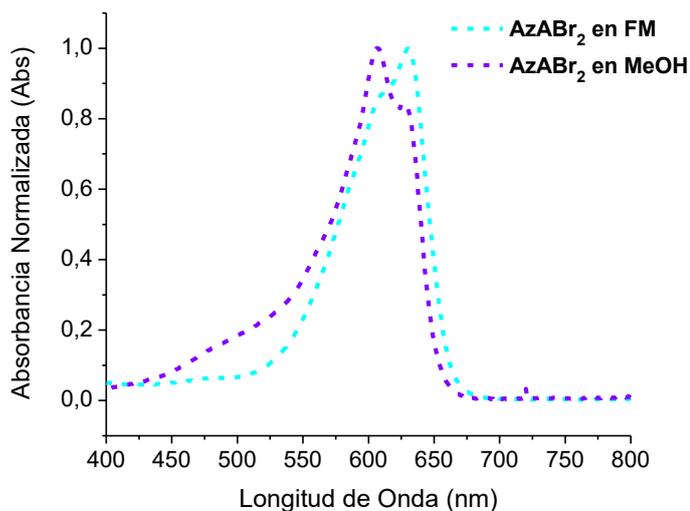


Figura 2.21: Curvas espectrales de AzABr₂ en FM y en MeOH.

La evaluación de AzABr₂ en distintas condiciones de almacenamiento y en ambiente de nitrógeno permitieron establecer que este derivado en estado sólido presentó degradación química a 4 °C y 25 °C determinada por HPLC. Esta inestabilidad imposibilitó completar su caracterización, como así también la determinación de las propiedades fisicoquímicas, fotoquímicas y la actividad fotocitotóxica.

2.6. SÍNTESIS DE BUCHWALD-HARTWIG

2.6.1. Materiales y métodos

Los reactivos de partida AzA y TBO comerciales se utilizaron sin purificación previa. Los solventes y reactivos empleados fueron de grado pro-análisis (Cicarelli, Sintorgan, Anedra o Sigma-Aldrich) y las soluciones acuosas se prepararon en agua ultrapura, obtenida del sistema de purificación de agua Milli-Q[®] (Millipore Corporation).

Los solventes de reacción ensayados, tolueno y DMF, se secaron sobre tamices moleculares previamente activados. La metodología de aminación de Buchwald-Hartwig se desarrolló en un tubo de reacción de cierre hermético adicionando en primer término el Fs y con posterioridad el catalizador (acetato de paladio- Pd (OAc)₂), el ligando (Xantphos[®]), el haluro de arilo (clorobenceno o 1,4 dibromobenceno), el solvente (tolueno o DMF) y finalmente se incorporó la base (Cs₂CO₃). Los ensayos se realizaron a temperaturas superiores a 90 °C, con agitación constante y en atmósfera de N₂.

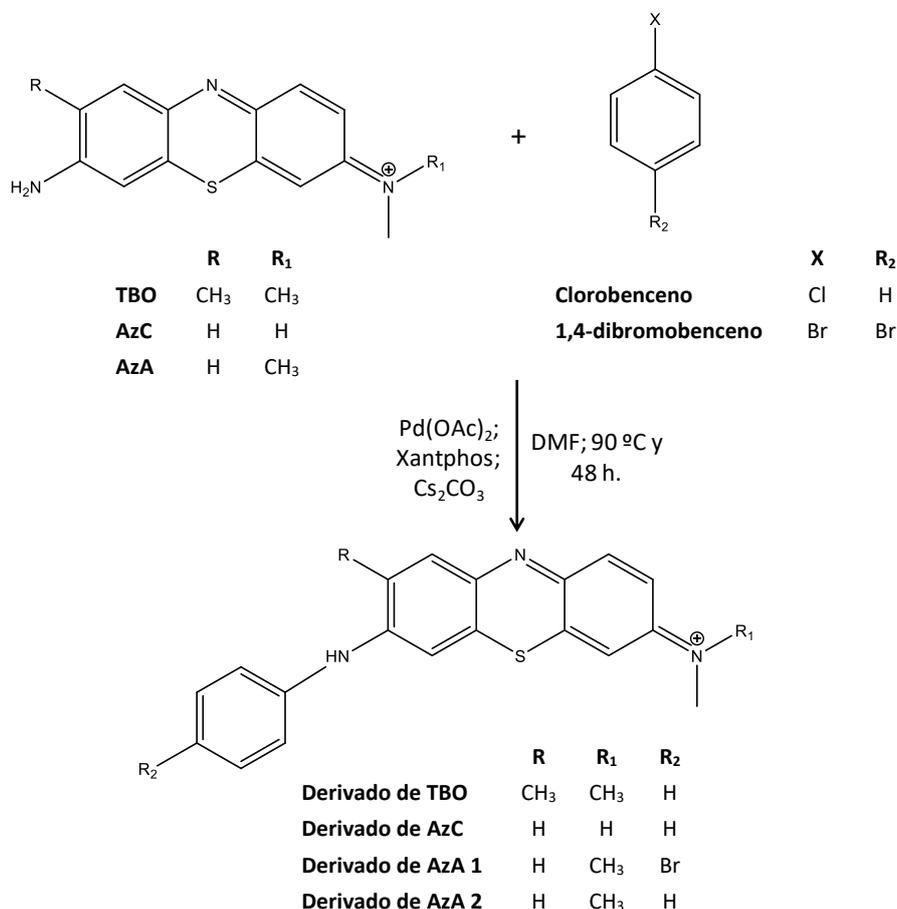
Cada crudo de síntesis se sometió a una extracción líquido-líquido utilizando H₂O Milli-Q - CH₂Cl₂. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó a presión reducida⁷⁶ obteniendo un residuo sólido. Las muestras se analizaron por HPLC y TLC.

2.6.2. Resultados y discusión

Esta estrategia de síntesis a TBO y AzA comerciales se aplicó con el objetivo de obtener los derivados que se resumen en el Esquema 3.

La síntesis de Buchwald-Hartwig permitiría a partir de la introducción de grupos arilos y alquilarilos en los sustituyentes amino de los Fs tiazínicos, obtener nuevos compuestos con

mejores propiedades que sus respectivos precursores (corrimiento batocrómico de la λ_{\max} y un incremento en la producción de $^1\text{O}_2$)⁴⁴.



Esquema 3: Esquema General de la Síntesis de Buchwald-Hartwig.

2.6.2.1. Aminación de Buchwald-Hartwig de TBO

En la Tabla 2.6 se presentan los resultados obtenidos para la derivatización de TBO. Se ensayó en primer término una relación molar de reactantes TBO: Clorobenceno 1:1, tolueno, 100 °C y 30 h evidenciando la ausencia de producto (entrada 1), lo cual podría atribuirse a la baja solubilidad del Fs en el solvente evaluado. La síntesis empleando DMF (entradas 2 y 3), relación de reactantes TBO:clorobenceno 1:10 y temperatura 90 °C indicó por HPLC la presencia de dos derivados, con $t_R = 21,6$ min y $t_R = 23,8$ min. La reacción desarrollada por 48 h de reacción (entrada 3) indicó que los productos obtenidos no superaron el 14 %.

Los rendimientos obtenidos en las condiciones ensayadas podrían atribuirse al impedimento estérico generado por el sustituyente metilo en la posición *orto* a la amina primaria. El grupo

amino participa en la formación del enlace C-N mediante el acoplamiento cruzado mediado por el catalizador Pd (OAc)₂ y haluros de arilo ⁷⁴.

Tabla 2.6: Reacción de TBO y clorobenceno.

Entrada	Relación de Reactantes		Solvente	T° (°C)	Tiempo (h)	Productos	
	TBO:clorobenceno					t _R (min) ^A	% Relativo ^A
1	1:1		Tolueno	100	30	21,6	ND
						23,8	ND
2	1:10		DMF	90	28	21,6	6,51
3						23,8	5,99
					48	21,6	9,01
23,8	13,8						

A: determinación por HPLC. **ND:** no detectado.

2.6.2.2. Aminación de Buchwald-Hartwig de AzA

La síntesis de Buchwald-Hartwig a partir de AzA comercial se ensayó en primera instancia aplicando como haluro de arilo el compuesto 1,4 dibromobenceno. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.7 y las entradas 1 y 2 señalan las condiciones de reacción que evidenciaron ausencia de producto (relación molar de reactantes 1:1, DMF, 90 °C, 24 y 48 h). Adicionalmente el ensayo a la relación de reactantes 1:5 permitió observar un nuevo derivado con un t_R= 6,63 min con un porcentaje relativo del 0,72 % (Tabla 2.7, entrada 3).

Tabla 2.7: Reacción de AzA y 1,4 dibromobenceno.

Entrada	Relación de Reactantes		Solvente	T° (°C)	Tiempo (h)	Producto	
	AzA: 1,4 dibromobenceno					t _R (min) ^A	% Relativo ^A
1	1:1		DMF	90	24	6,21	ND
2					48	6,21	ND
3	1:5				48	6,63	0,72

A: determinación por HPLC. **ND:** no detectado.

Por otra parte, la Tabla 2.8 muestra los resultados obtenidos para la reacción de aminación de Buchwald-Hartwig aplicada a AzA como reactivo de partida y clorobenceno como haluro de arilo. La relación molar de reactantes AzA:clorobenceno 1:10 se ensayó en tolueno y DMF, a 90 °C y 100 °C ^{74,115–117} y tiempos de reacción entre 3 h y 48 h. El producto de síntesis se evaluó

por HPLC y presentó un $t_R = 5,6$ min. Al emplear tolueno como solvente los porcentajes relativos del producto de reacción no superaron el 6 % (Tabla 2.8, entradas 1-4).

Cabe destacar que los diferentes tiempos de síntesis ensayados no señalaron cambios significativos en los resultados obtenidos.

Los resultados en DMF a 90 °C indicaron para el nuevo derivado rendimientos relativos inferiores al 3 % (Tabla 2.8, entradas 5 y 6). Al incrementar el tiempo de reacción entre 24 h y 48 h se observaron porcentajes relativos menores al 18 % (Tabla 2.8, entradas 7-13).

La aminación de Buchwald-Hartwig con AzA y dos haluros de arilo, clorobenceno y 1,4 dibromobenceno, indicaron que los porcentajes relativos para los nuevos productos obtenidos son inferiores al 18 % en todos los casos.

Los resultados alcanzados mediante esta estrategia de síntesis y considerando que una de las características de un Fs ideal es que debe ser un compuesto puro y de fácil obtención para su posterior escalado, no se dio continuidad al estudio y evaluación de los nuevos derivados a partir de los prototipos AzA y TBO.

Tabla 2.8: Reacción de AzA y clorobenceno.

Entrada	Solvente	T° (°C)	Tiempo (h)	Producto	
				t_R (min) ^A	% Relativo ^A
1	Tolueno	100	6	5,66	3,47
2			24	5,66	3,45
3			30	5,65	5,24
4			48	5,53	3,84
5	DMF	90	3	5,76	2,73
6			8	5,63	2,47
7			24	5,61	9,43
8			28	5,61	8,43
9			32	5,56	8,28
10			36	5,78	6,48
11			40	5,79	8,37
12			44	5,74	7,70
13			48	5,71	17,8

A: determinación por HPLC.

2.7. CONCLUSIONES PARCIALES

Las estrategias de derivatización ensayadas, bromación y reacción de Buchwald-Hartwig,

permitieron obtener nuevos derivados correspondientes a los compuestos fenotiazínicos TBO y AzA disponibles comercialmente.

La bromación de los prototipos se ensayó considerando diferentes parámetros tales como agente halogenante, relaciones de reactantes, solventes y tiempos de reacción. Las mejores condiciones de síntesis condujeron a los derivados dibromados de AzA, TBO y AzC con porcentajes de pureza relativa $\geq 86\%$ en todos los casos. La caracterización de los nuevos Fs se realizó por HRMS y $^1\text{H-RMN}$, técnicas que permitieron corroborar la obtención de los compuestos dihalogenados correspondientes. Los mismos se evaluaron por HPLC, TLC y espectrometría UV-Visible evidenciando el efecto de la sustitución de átomos de hidrógeno por bromo en la estructura de los prototipos.

Los derivados TBOBr_2 y AzCBr_2 mostraron un corrimiento hipsocrómico de la longitud de onda de máxima absorción como consecuencia de la introducción de átomos pesados en la estructura de TBO y AzC. Antecedentes bibliográficos indican que la sustitución por halógenos favorecería la presencia de las especies monoméricas del Fs 71 generando un incremento en la producción de oxígeno singlete $^{118-120}$ y una potencial actividad fotocitotóxica. Los monómeros de la familia de las tiazinas presentan máximos de absorción próximos a los 500 nm lo cual se corresponde con lo observado por espectrofotometría UV-Visible para los nuevos derivados.

La bromación de AzA produjo un corrimiento batocrómico de la longitud de onda de máxima absorción de AzABr_2 potenciando las posibles aplicaciones terapéuticas del nuevo Fs. Sin embargo este compuesto presentó inestabilidad química imposibilitando tanto la determinación de las propiedades fisicoquímicas y fotoquímicas, como así también, la evaluación del efecto fotocitotóxico.

Los resultados obtenidos correspondientes a la síntesis de Buchwald-Hartwig con los prototipos comerciales TBO y AzA empleando como haluros de arilo, clorobenceno y 1,4-dibromobenceno, condujeron a productos de reacción con porcentajes relativos del 18 % en las mejores condiciones experimentales ensayadas.

Por lo expuesto se seleccionaron los derivados TBOBr_2 y AzCBr_2 para dar continuidad al abordaje de los objetivos específicos de esta Tesis Doctoral.

2.8. BIBLIOGRAFÍA

1. Simões, J. C. S., Sarpaki, S., Papadimitroulas, P., Therrien, B. y Loudos, G. Conjugated photosensitizers for imaging and PDT in cancer research. *J. Med. Chem.* **63**, 14119-14150 (2020).
2. Frei, A. y col. Synthesis, characterization, and biological evaluation of new Ru(II) polypyridyl photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Med. Chem.* **57**, 7280-7292 (2014).
3. New, O. M. y Dolphin, D. Design and synthesis of novel phenothiazinium photosensitiser derivatives. *European J. Org. Chem.* **2009**, 2675-2686 (2009).
4. Zhao, X., Liu, J., Fan, J., Chao, H. y Peng, X. Recent progress in photosensitizers for overcoming the challenges of photodynamic therapy: from molecular design to application. *Chem. Soc. Rev.* **50**, 4185-4219 (2021).
5. Caruso, E., Banfi, S., Barbieri, P., Leva, B. y Orlandi, V. T. Synthesis and antibacterial activity of novel cationic BODIPY photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **114**, 44-51 (2012).
6. Ghorbani, J., Rahban, D., Aghamiri, S., Teymouri, A. y Bahador, A. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview. *Laser Ther.* **27**, 293-302 (2018).
7. Wozniak, A. y Grinholc, M. Combined antimicrobial activity of photodynamic inactivation and antimicrobials-state of the art. *Front. Microbiol.* **9**, 1-19 (2018).
8. Li, X., Lovell, J. F., Yoon, J. y Chen, X. Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **17**, 657-674 (2020).
9. Hamblin, M. R. Photodynamic therapy for cancer: what's past is prologue. *Photochem. Photobiol.* **96**, 506-516 (2020).
10. dos Santos, A. F., de Almeida, D. R. Q., Terra, L. F., Baptista, M. S. y Labriola, L. Photodynamic therapy in cancer treatment-an update review. *J. Cancer Metastasis Treat.* **5**, 1-20 (2019).
11. Baskaran, R., Lee, J. y Yang, S.-G. Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. *Biomater. Res.* **22**, 1-8 (2018).
12. Gomes, A. T. P. C., Neves, M. G. P. M. S. y Cavaleiro, J. A. S. Cancer, photodynamic therapy and porphyrin-type derivatives. *An. Acad. Bras. Cienc.* **90**, 993-1026 (2018).
13. Costa, L. D., Costa, J. I. T. y Tomé, A. C. Porphyrin macrocycle modification: pyrrole-

- contracted or -expanded porphyrinoids. *Molecules*. **21**, 1-30 (2016).
14. Kniebühler, G. y col. Photodynamic therapy for cholangiocarcinoma using low dose mTHPC (Foscan®). *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **10**, 220-228 (2013).
 15. Aslanoglu, B. y col. Optical properties of photodynamic therapy drugs in different environments: the paradigmatic case of temoporfin. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **22**, 16956-16964 (2020).
 16. Correia, J. H., Rodrigues, J. A., Pimenta, S., Dong, T. y Yang, Z. Photodynamic therapy review: principles, photosensitizers, applications and future directions. *Pharmaceutics*. **13**, 1-16 (2021).
 17. de Souza, A. L. R. y col. Comparing desferrioxamine and light fractionation enhancement of ALA-PpIX photodynamic therapy in skin cancer. *Br. J. Cancer*. **115**, 805-813 (2016).
 18. Nesi-Reis, V. y col. Contribution of photodynamic therapy in wound healing: a systematic review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **21**, 294-305 (2018).
 19. Manda, G. y col. Emerging therapeutic targets in oncologic photodynamic therapy. *Curr. Pharm. Des.* **24**, 1-28 (2018).
 20. Van Straten, D., Mashayekhi, V., De Bruijn, H. S., Oliveira, S. y Robinson, D. J. Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. *Cancers*. **9**, 1-54 (2017).
 21. McFarland, S. A., Mandel, A., Dumoulin-White, R. y Gasser, G. Metal-based photosensitizers for photodynamic therapy: the future of multimodal oncology? *Curr. Opin. Chem. Biol.* **56**, 23-27 (2020).
 22. Tim, M. Strategies to optimize photosensitizers for photodynamic inactivation of bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **150**, 2-10 (2015).
 23. Zhang, J. y col. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharm. Sin. B.* **8**, 137-146 (2018).
 24. Garland, M. J., Cassidy, C. M., Woolfson, D. y Donnelly, R. F. Designing photosensitizers for photodynamic therapy: strategies, challenges and promising developments. *Future Med. Chem.* **1**, 667-691 (2009).
 25. Moreira, L. M. y col. Phenothiazinium dyes as photosensitizers (PS) in photodynamic therapy (PDT): spectroscopic properties and photochemical mechanisms. en *Advanced Aspects of Spectroscopy* 393-422 (2011).

26. Wainwright, M. y Giddens, R. M. Phenothiazinium photosensitisers: choices in synthesis and application. *Dye. Pigment.* **57**, 245-257 (2003).
27. Schultz, E. W. y Krueger, A. P. Inactivation of *Staphylococcus bacteriophage* by methylene blue. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **280**, 100-101 (1928).
28. Clifton, C. E. y Lawler, T. G. Inactivation of *Staphylococcus bacteriophage* by toluidine blue. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **856**, 1041-1042 (1930).
29. Perdrau, J. R. y Todd, C. The photodynamic action of methylene blue on bacteriophage. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Contain. Pap. a Biol. Character.* **112**, 277-287 (1933).
30. Sakamaki, D., Kumano, D., Yashima, E. y Seki, S. A double hetero[4]helicene composed of two phenothiazines: synthesis, structural properties and cationic states. *Chem. Commun.* **51**, 17237-17240 (2015).
31. D'Alessandro, S. y Priefer, R. Non-porphyrin dyes used as photosensitizers in photodynamic therapy. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **60**, 1-14 (2020).
32. Plotino, G., Grande, N. M. y Mercade, M. Photodynamic therapy in endodontics. *Int. Endod. J.* **52**, 760-774 (2019).
33. Dichiara, M. y col. Recent advances in drug discovery of phototherapeutic non-porphyrinic anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **142**, 459-485 (2017).
34. Sobotta, L., Skupin-Mrugalska, P., Piskorz, J. y Mielcarek, J. Non-porphyrinoid photosensitizers mediated photodynamic inactivation against bacteria. *Dye. Pigment.* **163**, 337-355 (2019).
35. Franco, T. P. M., Dos Santos, A. P. P. y Canabarro, A. The effects of repeated applications of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of residual periodontal pockets: a systematic review. *Lasers Med. Sci.* **34**, 855-863 (2019).
36. Wainwright, M., O'Kane, C. y Rawthore, S. Phenothiazinium photosensitisers XI. Improved toluidine blue photoantimicrobials. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **160**, 68-71 (2016).
37. Nagata, J. Y. y col. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **9**, 122-131 (2012).
38. Wainwright, M., Meegan, K. y Loughran, C. Phenothiazinium photosensitisers IX. Tetra- and pentacyclic derivatives as photoantimicrobial agents. *Dye. Pigment.* **91**, 1-5 (2011).
39. Wainwright, M., Phoenix, D. A., Rice, L., Burrow, S. M. y Waring, J. Increased cytotoxicity

- and phototoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **40**, 233-239 (1997).
40. Gatto Raimundo, A. F. y col. The photodynamic and intrinsic effects of Azure B on mitochondrial bioenergetics and the consequences of its intrinsic effects on hepatic energy metabolism. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **35**, 1-15 (2021).
 41. Wainwright, M. Phenothiazinium photosensitisers V. Photobactericidal activities of chromophore-methylated phenothiazinium salts. *Dye. Pigment.* **73**, 7-12 (2007).
 42. Moreira, L. M. y col. Azure dyes as new photosensitizer prototypes to application in photodynamic therapy against *Candida spp.* *Spectroscopy.* **24**, 621-628 (2010).
 43. Montes de Oca, M. N., Vara, J., Milla, L., Rivarola, V. y Ortiz, C. S. Physicochemical properties and photodynamic activity of novel derivatives of triarylmethane and thiazine. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **346**, 255-265 (2013).
 44. Wainwright, M. y Mclean, A. Rational design of phenothiazinium derivatives and photoantimicrobial drug discovery. *Dye. Pigment.* **136**, 590-600 (2017).
 45. Wainwright, M. The development of phenothiazinium photosensitisers. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2**, 263-272 (2005).
 46. Nagata, J. Y. y col. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **9**, 122-131 (2012).
 47. Agazzi, M. L., Ballatore, M. B., Reynoso, E., Quiroga, E. D. y Durantini, E. N. Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of two cationic BODIPY derivatives with application in the photoinactivation of microorganisms. *Eur. J. Med. Chem.* **126**, 110-121 (2017).
 48. Malatesti, N., Munitic, I. y Jurak, I. Porphyrin-based cationic amphiphilic photosensitisers as potential anticancer, antimicrobial and immunosuppressive agents. *Biophys. Rev.* **9**, 149-168 (2017).
 49. Martins, D. y col. Photoinactivation of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit plants by cationic porphyrins. *Planta.* **248**, 409-421 (2018).
 50. Soukos, N. S., Ximenez-Fyvie, L. A., Hamblin, M. R., Socransky, S. S. y Hasan, T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2595-2601 (1998).
 51. Wiehe, A., O'Brien, J. M. y Senge, M. O. Trends and targets in antiviral phototherapy.

- Photochem. Photobiol. Sci.* **18**, 2565-2612 (2019).
52. Tuite, E. M. y Kelly, J. M. Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **21**, 103-124 (1993).
 53. Hosseini, N. y col. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to photodynamic therapy using four dyes as the photosensitizer. *J. Dent. Shiraz Univ. Med. Sci.* **17**, 354-360 (2016).
 54. de Souza, S. C. y col. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **83**, 34-38 (2006).
 55. Wilson, M. y Mia, N. Effect of environmental factors on the lethal photosensitization of *Candida albicans* *in vitro*. *Lasers Med. Sci.* **9**, 105-109 (1994).
 56. Bacellar, I. O. L. y col. Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers. *Photochem. Photobiol.* **90**, 801-813 (2014).
 57. Wainwright, M., Meegan, K., Loughran, C. y Giddens, R. M. Phenothiazinium photosensitisers, part VI: photobactericidal asymmetric derivatives. *Dye. Pigment.* **82**, 387-391 (2009).
 58. Hamblin, M. R. y Abrahamse, H. Inorganic salts and antimicrobial photodynamic therapy: mechanistic conundrums? *Molecules.* **23**, 1-18 (2018).
 59. Rajan, D. y Ilanchelian, M. Exploring the interaction of Azure dyes with t-RNA by hybrid spectroscopic and computational approaches and its applications toward human lung cancer cell line. *Int. J. Biol. Macromol.* **113**, 1052-1061 (2018).
 60. Almeida, A. M., Oliveira, O. N. y Aoki, P. H. B. Role of toluidine blue O binding mechanism for photooxidation in bioinspired bacterial membranes. *Langmuir.* **35**, 16745-16751 (2019).
 61. Tardivo, J. P., Del Giglio, A., Paschoal, L. H. y Baptista, M. S. New photodynamic therapy protocol to treat AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Photomed. Laser Surg.* **24**, 528-531 (2006).
 62. Wasif Baig, M., Pederzoli, M., KÝvala, M., Cwiklik, L. y Pittner, J. Theoretical investigation of the effect of alkylation and bromination on intersystem crossing in BODIPY-based photosensitizers. *J. Phys. Chem. B* **125**, 11617–11627 (2021).
 63. Gorbe, M. y col. Halogen-containing BODIPY derivatives for photodynamic therapy. *Dye. Pigment.* **160**, 198-207 (2019).

64. Zakavi, S., Naderloo, M., Heydari-turkmani, A., Alghooneh, L. y Eskandari, M. Effects of β -bromine substitution and core protonation on photosensitizing properties of porphyrins: long wavelength photosensitizers. *J. Catal.* **380**, 236-246 (2019).
65. Pucelik, B. y col. Properties of halogenated and sulfonated porphyrins relevant for the selection of photosensitizers in anticancer and antimicrobial therapies. *PLOS ONE*. **12**, 1-22 (2017).
66. Urrutia, M. N. y Ortiz, C. S. Spectroscopic characterization and aggregation of azine compounds in different media. *Chem. Phys.* **412**, 41-50 (2013).
67. Urrutia, M. N. y Ortiz, C. S. Novel oxazine and oxazone dyes: aggregation behavior and physicochemical properties. *New J. Chem.* **40**, 10161-10171 (2016).
68. Kumar, P. P. P., Yadav, P., Shanavas, A. y Neelakandan, P. P. Aggregation enhances luminescence and photosensitization properties of a hexaiodo-BODIPY. *Mater. Chem. Front.* **4**, 965-972 (2020).
69. Lee, J. M. y col. Synergistic effects of photoinduced electron transfer and heavy atom effect based on BODIPY for efficient triplet photosensitizers. *Dye. Pigment.* **196**, 1-9 (2021).
70. Gorman, A. y col. In vitro demonstration of the heavy-atom effect for photodynamic therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 10619-10631 (2004).
71. Gualdesi, M. S., Vara, J., Aiassa, V., Alvarez Igarzabal, C. I. y Ortiz, C. S. Thionine in the design of new photosensitizers: bromination and vehiculization in polymeric nanoparticles. *J. Mol. Liq.* **310**, 1-9 (2020).
72. Gualdesi, M. S. y col. Halogenated phenothiazine as photoantimicrobial agent against *Staphylococcus aureus*. Evaluation of the vehiculization in polymeric nanoparticles. *Dye. Pigment.* **170**, 1-8 (2019).
73. Dorel, R., Grugel, C. P. y Haydl, A. M. The Buchwald-Hartwig amination after 25 years. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **58**, 17118-17129 (2019).
74. Heravi, M. M., Kheilkordi, Z., Zadsirjan, V., Heydari, M. y Malmir, M. Buchwald-Hartwig reaction: an overview. *J. Organomet. Chem.* **861**, 17-104 (2018).
75. Liu, Y. y col. Application of a 2-aryl indenylphosphine ligand in the Buchwald-Hartwig cross-coupling reactions of aryl and heteroaryl chlorides under the solvent-free and aqueous conditions. *Org. Biomol. Chem.* **15**, 5805-5810 (2017).
76. Ribone, S. R. y col. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of 4,6-

- diarylpyrimidines and diarylbenzenes as novel non-nucleosides HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **58**, 485-492 (2012).
77. Surry, D. S. y Buchwald, S. L. Dialkylbiaryl phosphines in Pd-catalyzed amination: a user's guide. *Chem. Sci.* **2**, 27-50 (2011).
78. Cao, Q., Nicholson, W. I., Jones, A. C. y Browne, D. L. Robust Buchwald-Hartwig amination enabled by ball-milling. *Org. Biomol. Chem.* **17**, 1722-1726 (2019).
79. Nirmala, M. y col. Organonickel complexes encumbering bis-imidazolylidene carbene ligands: synthesis, X-ray structure and catalytic insights on Buchwald-Hartwig amination reactions. *J. Organomet. Chem.* **831**, 1-10 (2017).
80. Veisi, H., Tamoradi, T., Karmakar, B. y Hemmati, S. Green tea extract-modified silica gel decorated with palladium nanoparticles as a heterogeneous and recyclable nanocatalyst for Buchwald-Hartwig C-N cross-coupling reactions. *J. Phys. Chem. Solids.* **138**, 1-7 (2020).
81. Christensen, H., Kiil, S. y Dam-Johansen, K. Effect of solvents on the product distribution and reaction rate of a Buchwald-Hartwig amination reaction. *Org. Process Res. Dev.* **10**, 762-769 (2006).
82. McKamey, M. R. y Spitznagle, L. Chromatographic, mass spectral and visible light absorption characteristics of toluidine blue O and related dyes. *J. Pharm. Sci.* **64**, 1456-1462 (1975).
83. Mills, A., Hazafy, D., Parkinson, J., Tuttle, T. y Hutchings, M. G. Effect of alkali on methylene blue (C. I. Basic Blue 9) and other thiazine dyes. *Dye. Pigment.* **88**, 149-155 (2011).
84. Horobin, R. W., Stockert, J. C. y Rashid-Doubell, F. Fluorescent cationic probes for nuclei of living cells: why are they selective? A quantitative structure-activity relations analysis. *Histochem Cell Biol.* **126**, 165-175 (2006).
85. Loach, K. W. Thin-Layer Chromatographic separation of methylene blue and related thiazine dyes. *J. Chromatogr.* **60**, 119-126 (1971).
86. Rogers, D. A. y col. Organic dye-catalyzed, visible-light photoredox bromination of arenes and heteroarenes using N-bromosuccinimide. *ACS Omega.* **3**, 12868-12877 (2018).
87. Petrova, M. y col. Experimental and theoretical studies of bromination of diethyl 2,4,6-trimethyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate. *Heteroat. Chem.* **25**, 114-126 (2014).

88. Hoffmann, K. J. y Carlsen, P. H. J. Study of an efficient and selective bromination reaction of substituted thiophenes. *Synth. Commun.* **29**, 1607-1610 (1999).
89. Wu, Y. Q. y col. A convenient and efficient H₂SO₄-promoted regioselective monobromination of phenol derivatives using *N*-bromosuccinimide. *Synth. Commun.* **50**, 813-822 (2020).
90. Bovonsombat, P. y col. Regioselective monobromination of aromatics via a halogen bond acceptor-donor interaction of catalytic thioamide and *N*-bromosuccinimide. *Tetrahedron.* **73**, 6564-6572 (2017).
91. Vekariya, R. H. y Patel, H. D. Synthesis of α -bromocarbonyl compounds: recent advances. *Tetrahedron.* **70**, 3949-3961 (2014).
92. Zysman-Colman, E., Arias, K. y Siegel, J. S. Synthesis of arylbromides from arenes and *N*-bromosuccinimide (NBS) in acetonitrile - A convenient method for aromatic bromination. *Can. J. Chem.* **87**, 440-447 (2009).
93. Ganguly, N. C., De, P. y Dutta, S. Mild regioselective monobromination of activated aromatics and heteroaromatics with *N*-bromosuccinimide in tetrabutylammonium bromide. *Synthesis.* **7**, 1103-1108 (2005).
94. Cammidge, A. N., Crepy, K. V y Fugier, M. Convenient ring-bromination of alkylnaphthalenes using *N*-bromosuccinimide in acetonitrile. *Synth. Commun.* 4159-4162 (1997).
95. Vara, J. y Ortiz, C. S. Thiazine dyes: Evaluation of monomeric and aggregate forms. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **166**, 112-120 (2016).
96. Robinson-Duggon, J. y col. Fatty acid conjugates of toluidine blue O as amphiphilic photosensitizers: synthesis, solubility, photophysics and photochemical properties. *Photochem. Photobiol.* **97**, 71-79 (2021).
97. Claridge, T. D. W. High-resolution NMR techniques in organic chemistry. *Elsevier.* (2016).
98. Shimizu, S. y col. Benzo[c,d]indole-Containing Aza-BODIPY dyes: asymmetrization-induced solid-state emission and aggregation-induced emission enhancement as new properties of a well-known chromophore. *Chem. A Eur. J.* **21**, 12996-13003 (2015).
99. Loutfy, R. y Sharp, J. H. Electronic properties of furaquinone pigments. Correlation between photosensitivity and emissivity. *J. Phys. Chem.* **83**, 1208-1212 (1979).
100. Zhang, X.-F. y Xu, H. Influence of halogenation and aggregation on photosensitizing

- properties of zinc phthalocyanine (ZnPC). *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **89**, 3347-3351 (1993).
101. Cooksey, C. J. Quirks of dye nomenclature. 8. Methylene blue, azure and violet. *Biotech. Histochem.* **92**, 347-356 (2017).
 102. Plater, M. J. A degradation product of methylene blue. *Ark. Free J. Org. Chem.* **2003**, 37-42 (2003).
 103. Saikia, I., Borah, A. J. y Phukan, P. Use of bromine and bromo-organic compounds in organic synthesis. *Chem. Rev.* **116**, 6837-7042 (2016).
 104. Choi, T. y Ma, E. Simple and regioselective bromination of 5,6-disubstituted-indan-1-ones with Br₂ under acidic and basic conditions. *Molecules.* **12**, 74-85 (2007).
 105. Jovanovic, M. V y Biehl, E. R. Bromination of 10-phenylphenothiazine and 10-phenylphenoxazine. *J. Org. Chem.* **49**, 1905-1908 (1984).
 106. Chhattise, P. K., Ramaswamy, A. V. y Waghmode, S. B. Regioselective, photochemical bromination of aromatic compounds using *N*-bromosuccinimide. *Tetrahedron Lett.* **49**, 189-194 (2008).
 107. Alberola, A., Álvaro, R., González Ortega, A. y Sañudo, C. Synthesis of [1] benzopyrano [2,3-*b*] pyrrol-4 (1H)-ones. *Tetrahedron.* **53**, 16185-16194 (1997).
 108. Ceder, O. y Vernmark, K. Synthesis of the 1,3,4-triaza- and 1,4-diazacycl[3.3.3]azine systems. *Acta Chem. Scand. B.* **31**, 235-238 (1977).
 109. Somashekharappa, G. M., Paul, M., Govind, C., Mathew, R. y Karunakaran, V. Ultrafast intermolecular interaction dynamics between NIR-absorbing unsymmetrical squaraines and PCBM: effects of halogen substitution. *J. Phys. Chem. B.* **126**, 4509-4519 (2022).
 110. Piskorz, J. y col. BODIPY-based photosensitizers as potential anticancer and antibacterial agents: role of the positive charge and the heavy atom effect. *ChemMedChem.* **15**, 1-14 (2020).
 111. Serra, A. C. y col. Halogen atom effect on photophysical and photodynamic characteristics of derivatives of 5,10,15,20-tetrakis(3-hydroxyphenyl) porphyrin. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **92**, 59-65 (2008).
 112. Lacerda, S. H. D., Abraham, B., Stringfellow, T. C. y Indig, G. L. Photophysical, photochemical and tumor-selectivity properties of bromine derivatives of Rhodamine-123. *Photochem. Photobiol.* **81**, 1430-1438 (2005).
 113. Alvarez, M. G., Montes de Oca, M. N., Milanesio, M. E., Ortiz, C. S. y Durantini, E. N.

- Photodynamic properties and photoinactivation of *Candida albicans* mediated by brominated derivatives of triarylmethane and phenothiazinium dyes. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **11**, 148-155 (2014).
114. Vecchio, D. y col. Structure-function relationships of Nile blue (EtNBS) derivatives as antimicrobial photosensitizers. *Eur. J. Med. Chem.* **75**, 479-491 (2014).
115. Cook, A., Clément, R. y Newman, S. G. Reaction screening in multiwell plates: high-throughput optimization of a Buchwald-Hartwig amination. *Nat. Protoc.* **16**, 1152-1169 (2021).
116. Kashani, S. K., Jessiman, J. E. y Newman, S. G. Exploring homogeneous conditions for mild Buchwald-Hartwig amination in batch and flow. *Org. Process Res. Dev.* **24**, 1948-1954 (2020).
117. Forero-Cortés, P. A. y Haydl, A. M. The 25th anniversary of the Buchwald-Hartwig amination: development, applications and outlook. *Org. Process Res. Dev.* **23**, 1478-1483 (2019).
118. Dilber, G., Durmuş, M. y Kantekin, H. Non-aggregated zwitterionic zinc (II) phthalocyanine complexes in water with high singlet oxygen quantum yield. *Dye. Pigment.* **160**, 267-284 (2019).
119. Bennett, L. E., Ghiggino, K. P. y Henderson, R. W. Singlet oxygen formation in monomeric and aggregated porphyrin c. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **3**, 81-89 (1989).
120. Vara, J., Gualdesi, M. S., Bertolotti, S. G. y Ortiz, C. S. Two phenothiazine dyes as photosensitizers for the production of singlet oxygen. Photophysics, photochemistry and effects of aggregation. *J. Mol. Struct.* **1181**, 1-7 (2019).

CAPÍTULO 3

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y FOTOQUÍMICAS



PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y FOTOQUÍMICAS

3.1. IMPACTO EN EL DESARROLLO DE NUEVOS FOTOSENSIBILIZADORES

El estudio de las propiedades fisicoquímicas y fotoquímicas de nuevos derivados está estrechamente relacionado con la potencial aplicación en TFD y TFDA, impactando directamente en la capacidad de generar EROs responsables del efecto terapéutico ¹⁻³.

Los antecedentes bibliográficos demuestran la importancia de los Fs fenotiazínicos debido a sus diversas propiedades fisicoquímicas y fotoquímicas. Esta familia exhibe una prometedora actividad biológica frente a distintas patologías ⁴⁻⁷, siendo el efecto terapéutico el resultado de la interacción del farmacóforo y el sistema de anillo tricíclico. El carácter lipofílico cobra relevancia porque impacta en la penetración del Fs en las membranas biológicas ⁸. Las características estructurales de los compuestos fenotiazínicos les proporcionan la capacidad de absorber luz a una longitud de onda entre 600-660 nm, presentar una mínima toxicidad frente a las células humanas y una elevada capacidad de producir ¹O₂ ^{9,10}. Adicionalmente las fenotiazinas son compuestos relativamente económicos y ampliamente disponibles ¹¹.

La evaluación de las propiedades fisicoquímicas y fotoquímicas de los derivados TBOBr₂ y AzCBr₂ permitirá realizar una comparación con sus precursores.

La constante de ionización o disociación ácida (pK_a) tiene un impacto significativo en las propiedades fisicoquímicas tales como solubilidad y lipofilicidad, incidiendo en la velocidad de disolución y absorción del Fs ^{12,13}.

Por otra parte la estabilidad fotoquímica es importante ya que afecta la seguridad y la eficacia del tratamiento fotodinámico. La degradación del compuesto a causa de la irradiación con luz disminuye la biodisponibilidad y modifica la intensidad de absorción y/o fluorescencia, lo cual impacta en la reactividad fotoquímica conduciendo a la formación de productos tóxicos ¹⁴⁻¹⁶.

La determinación del rendimiento cuántico de formación de ¹O₂ (Φ_{Δ}) es quizás una de las propiedades más relevantes, siendo responsable directo del efecto terapéutico. Los antecedentes bibliográficos indican que los Fs tiazínicos, como por ejemplo MB, presenta baja toxicidad y alta producción de ¹O₂ con muy buenos resultados en ensayos *in vitro* e *in vivo* ^{17,18}. Otros Fs fenotiazínicos, tales como nuevo azul de metileno (NMB) y violeta de metileno

(MV), generan $^1\text{O}_2$ luego de la irradiación con luz visible demostrando la inactivación fotodinámica de microorganismos ^{19,20}.

3.2. CONSTANTE DE IONIZACIÓN

La constante de ionización (pK_a) es de relevancia fundamental en diversos campos de investigación tales como la química, biología, medicina e industria alimentaria ²¹.

El desarrollo de nuevos ingredientes farmacéuticos activos (IFAs) requiere determinar el grado de disociación o ionización, ya que el pK_a tiene efecto sobre los parámetros farmacocinéticos y la formulación farmacéutica. El grado de ionización depende en gran medida del pH del medio, por lo cual el vehículo se ajusta a un valor de pH que permita alcanzar un nivel de ionización del fármaco que favorezca la solubilidad y estabilidad del mismo ^{22,23}. Por otra parte desde el punto de vista de la farmacocinética, el estado de ionización de los IFAs influye significativamente en el proceso ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) impactando en la biodisponibilidad y en la acción farmacológica ^{24,25}.

El pK_a de una molécula se corresponde con el pH al cual la misma se presenta protonada en un 50 % (Ecuación 3.2.1) ^{26,27}.

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \text{Log}_{10} \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad \text{Ecuación 3.2.1}$$

La mayoría de los fármacos presentan grupos funcionales ácidos y/o básicos, por lo que el estado de ionización es controlado por el pH del medio y el valor de pK_a , permitiendo predecir el grado de ionización en los fluidos biológicos ²⁸. Las especies químicas (catiónica, neutra o aniónica) exhiben propiedades diferentes con respecto a la solubilidad en agua, volatilidad, absorción UV-Visible y reactividad ^{29,30}.

La determinación experimental del pK_a se realiza mediante espectroscopia infrarroja, espectrofotometría UV-Visible, fluorescencia, valoraciones potenciométricas, titulaciones y resonancia magnética nuclear, entre otras ³¹⁻³⁴.

Los Fs fenotiazínicos son compuestos catiónicos que presentan una intensa absorción en la zona roja del espectro electromagnético entre 600 nm y 660 nm ^{35,36}. Estudios previos demuestran que los compuestos fenotiazínicos con sustituyentes amino primario o

secundario, tales como Th, AzA, AzB, AzC y TBO, se desprotonan en medios fuertemente básicos generando soluciones que presentan longitudes de onda de máxima absorción (λ_{\max}) próximas a los 500 nm ^{37,38}. El equilibrio ácido-base de TBO se muestra en la Figura 3.2.1.

Los valores de pK_a descriptos para los Fs fenotiazínicos permiten inferir que la especie catiónica está presente en los medios fisiológicos confiriéndoles gran selectividad. Los antecedentes bibliográficos indican que las membranas celulares presentan una carga global neta negativa, por lo cual los fármacos con carga positiva pueden adherirse a las células blanco por atracción electrostática ³⁹.

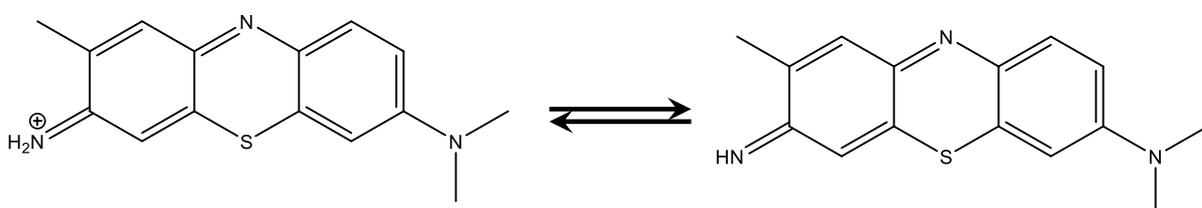


Figura 3.2.1: Equilibrio de ionización de TBO.

Los Fs fenotiazínicos actúan principalmente a nivel mitocondrial como consecuencia de la atracción electrostática entre el Fs catiónico y el potencial de membrana. Las propiedades físicoquímicas y el balance lipofílico-hidrofílico también influyen en la capacidad de estos agentes fototerapéuticos para atravesar las membranas de células cancerígenas ⁴⁰⁻⁴³.

Por otra parte los Fs catiónicos se acumulan selectivamente en bacterias, en estado planctónico y formando biofilms, debido a que la membrana de Gram-positivas y Gram-negativas presentan ácido lipoteicoico y lipopolisacáridos, respectivamente. Estos componentes les confieren a los microorganismos una carga superficial negativa que genera importantes sitios de unión para sustratos con densidad positiva ⁴⁴⁻⁴⁶.

En base a lo expuesto, se determinaron los valores de pK_a de TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂ utilizando adicionalmente el dato correspondiente a AzC reportado en bibliografía. Se evaluó el efecto de los átomos de bromo y el grado de ionización de los nuevos Fs a diferentes valores de pH.

3.2.1. Materiales y métodos

El valor de pK_a de TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂ se determinó por espectrofotometría de absorción en

diferentes soluciones reguladoras con valores de pH comprendidos entre 1,20 y 13,2. Se empleó como cosolvente dimetilsulfóxido (grado pro-análisis, Biopack) 20 % v/v con el objetivo de favorecer la solubilidad de los derivados dibromados. Las soluciones de los Fs se prepararon a una concentración final de 9,81 μM (TBO); 76,9 μM (TBOBr₂) y 156 μM (AzCBr₂). Las soluciones reguladoras de pH (Tabla 3.2.1) se prepararon con agua ultrapura provista por el sistema de purificación de agua Milli-Q[®] (Millipore Corporation) y utilizando reactivos de calidad pro-análisis.

Tabla 3.2.1: Composición de las soluciones reguladoras de pH.

pH	Composición					
	mL	Reactivo 1	M	mL	Reactivo 2	M
1,20	2,5	KCl	0,2	4,24	HCl	0,2
2,90		KC ₈ H ₅ O ₄	0,1	1,28		
4,40				KH ₂ PO ₄	0,1	0,33
5,80						
6,50						
7,40	5,0					
8,00		Bórax	0,025	1,03	HCl	0,2
9,00						
11,0		NaHCO ₃	0,05	2,27	NaOH	0,2
11,3		Na ₂ HPO ₄		0,37		
12,0		KCl	0,2	0,60		
12,5	2,5			2,04		
13,0				6,60		
13,2				7,50		

La fuerza iónica se ajustó a 0,5 M con cloruro de sodio (NaCl) en todos los casos y el pH se determinó con un pHmetro Altronix MOD. EZDO-PC.

Las soluciones de los Fs se analizaron por espectrofotometría UV-Visible entre 200 nm y 800 nm empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV-Visible 160A y una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico (Sigma). Todas las experiencias se realizaron por duplicado y los resultados obtenidos se procesaron con el programa OriginPro 8 SR0.

Los valores de pK_a se determinaron mediante la representación gráfica del grado de ionización en función del pH. El porcentaje del grado de ionización (GI) se ajustó según la Ecuación 3.2.2, estableciendo la relación de absorbancias (a la longitud de onda de máxima absorción) de las

especies catiónicas y neutras ($Abs_{\lambda \text{ ácido}}/Abs_{\lambda \text{ base}}$) a los diferentes valores de pH ensayados 1,47.

$$GI = \frac{\left(\frac{Abs_{\lambda \text{ ácido}}}{Abs_{\lambda \text{ base}}}\right)_{pH} - \left(\frac{Abs_{\lambda \text{ ácido}}}{Abs_{\lambda \text{ base}}}\right)_{pH \text{ mayor}}}{\left(\frac{Abs_{\lambda \text{ ácido}}}{Abs_{\lambda \text{ base}}}\right)_{pH \text{ menor}} - \left(\frac{Abs_{\lambda \text{ ácido}}}{Abs_{\lambda \text{ base}}}\right)_{pH \text{ mayor}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.2.2}$$

3.2.2. Resultados y discusión

La constante de ionización se determinó a partir del pH atribuible al 50 % de la ionización del Fs (Figura 3.2.2).

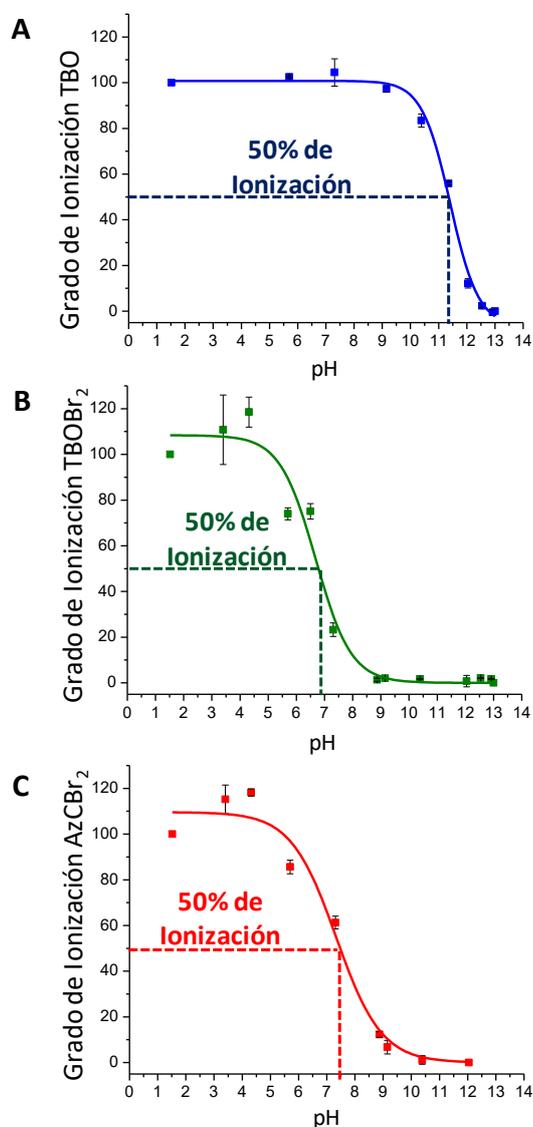


Figura 3.2.2: Representación gráfica del grado de ionización en función del pH. **(A)** TBO, **(B)** TBOBr₂ y **(C)** AzCBr₂.

Los valores de pK_a correspondientes a TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂ se muestran en la Tabla 3.2.2.

Tabla 3.2.2: Valores de pK_a obtenidos experimentalmente.

Fs	pK_a
TBO	11,34 ± 0,01
TBOBr ₂	6,78 ± 0,06
*AzC	11,5
AzCBr ₂	7,48 ± 0,08

* Valor de literatura (Mills y col. 2011).

Diversos autores señalan datos de pK_a para TBO y AzC comercial igual a 11,6 y 11,5 respectivamente, lo cual brinda confiabilidad a los resultados obtenidos ^{38,48}.

Los valores de pK_a correspondientes a los nuevos Fs permiten observar que la introducción de dos átomos de bromo en las estructuras de TBO y AzC, disminuye hasta 4 unidades con relación al prototipo. Este fenómeno está asociado con la electronegatividad del sustituyente bromo que por efecto inductivo desplaza la nube de electrones e incrementa la fuerza del ácido ^{49,50}. Antecedentes bibliográficos indican que con la incorporación de átomos de halógenos en la estructura química los valores de pK_a son menores ^{51,52}. Esta disminución que presentan los nuevos Fs dibromados podría resultar prometedora ya que en el sistema biológico se combinarían especies neutras y catiónicas. Esta situación permitiría la incorporación y acumulación de TBOBr₂ y AzCBr₂ en diferentes condiciones fisiológicas, favoreciendo la selectividad y la posible aplicación en TFD y TFDA ⁵⁰.

3.3. ESTABILIDAD FOTOQUÍMICA

La estabilidad fotoquímica de un Fs es una propiedad que tiene incidencia en la seguridad y eficacia del tratamiento fotodinámico. La degradación del compuesto disminuye la biodisponibilidad, modifica la intensidad de absorción y/o fluorescencia inicial, influye en la reactividad fotoquímica y puede conducir a la formación de productos tóxicos ¹⁵.

Diferentes autores sostienen que se requiere una óptima fotoestabilidad de los Fs que se aplican a la detección tumoral mediante TFD lo que permite un monitoreo de las células malignas durante periodos prolongados ^{53,54} .

Varios trabajos científicos relativos a estudios de Fs porfirínicos y no porfirínicos establecen una correlación entre la estabilidad fotoquímica y la eficacia fotodinámica ^{16,55,56}. La mayoría de los fármacos fotosensibles correspondientes a la familia de las porfirinas, clorinas y ftalocianinas que se aplican en TFD, no son fotoestables. Tanto en soluciones simples como en entornos complejos, los Fs sufren modificaciones inducidas por la luz lo que conduce a una disminución de la absorción inicial y de la intensidad de fluorescencia. Este proceso se denomina fotodegradación o fotoblanqueo y se define como la transformación química de la sustancia fotosensibilizadora al ser irradiada con luz (fototransformación) conduciendo a la formación de nuevos fotoproductos absorbentes ⁵⁷. Por otra parte el trabajo realizado por Gomes y col., indica que algunas porfirinas presentan alta fotoestabilidad y muy buena generación de ¹O₂, siendo por lo tanto eficientes Fs para su aplicación en TFDA ⁵⁸.

En este contexto numerosos autores sugieren que es relevante determinar la fotoestabilidad de nuevos fármacos ya que se relaciona fuertemente con la eficacia fotodinámica ^{16,55,56,59}.

Además los estudios de la estabilidad fotoquímica de MB y nuevos derivados de este precursor, indican que aquellos compuestos más inestables presentan una menor fototoxicidad ⁶⁰.

Antecedentes previos señalan que los Fs fenotiazínicos son estables fotoquímicamente en condiciones fisiológicas ^{1,61} por lo cual en este trabajo de Tesis se evaluó la estabilidad fotoquímica de TBO y los derivados dibromados, TBOBr₂ y AzCBr₂ (sección 3.3.1).

3.3.1. Materiales y métodos

La estabilidad fotoquímica de TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂ se determinó empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV-Visible 160A y una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico (Sigma) ^{62,63}. Los Fs se evaluaron a una concentración aproximada de 10⁻⁵ M en solución fisiológica:DMF (80:20 v/v). El empleo de DMF como cosolvente es debido a la baja solubilidad acuosa de los derivados dibromados y la solución fisiológica de NaCl 0,9 % presenta la misma osmolaridad que los fluidos corporales ²³. Las muestras se irradiaron a temperatura ambiente

con una lámpara LED Parathom[®] (5 W - OSRAM) que presenta un rango de emisión en la región visible del espectro electromagnético (luz blanca fría). La intensidad de irradiación, a 5 cm de distancia, fue de 8,4 mW/cm² por un periodo de 150 min. La dosis total de luz determinada por la intensidad de la lámpara, la distancia de irradiación y el tiempo de exposición fue de 75,6 J/cm²⁶⁴. Los ensayos se desarrollaron por duplicado y los resultados se procesaron aplicando el programa OriginPro 8 SR0.

3.3.2. Resultados y discusión

La representación gráfica de la absorbancia en función del tiempo de irradiación permitió determinar que TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂ son fotoestables en las condiciones ensayadas (Figura 3.3.1). El análisis de los resultados obtenidos indica que la incorporación de dos átomos de bromo en las estructuras de TBO y AzC no influyó en la estabilidad fotoquímica de esta familia de compuestos (Figura 3.3.1 A, B y C).

Algunos estudios relacionados a la fotoestabilidad de los Fs fenotiazínicos señalan algunas discrepancias que es oportuno destacar. El trabajo publicado por Felgenträger y col., indica que MB es estable fotoquímicamente cuando se compara con una serie de nuevos derivados⁶⁰. Por otra parte nuestro grupo de investigación demostró que el compuesto monobromado de AzB (AzBBr) es más fotoinestable que su precursor en las condiciones experimentales antes descritas¹. También se estudió la fotoestabilidad de Th y su derivado dibromado, indicando que éste presenta mayor estabilidad fotoquímica que su reactivo de partida². Los resultados obtenidos en el desarrollo de esta Tesis Doctoral evidenciaron que TBOBr₂ y AzCBr₂ son estables fotoquímicamente.

Los antecedentes bibliográficos señalan que los derivados dibromados de otras familias de compuestos, tales como BODIPYs y aza-BODIPYs, presentan fotoestabilidad aún en diferentes condiciones experimentales de irradiación (tiempo y fuentes de luz), solventes (metanol, etanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano entre otros) y soluciones acuosas^{65,66}.

Por lo expuesto, los resultados obtenidos para TBOBr₂ y AzCBr₂ son promisorios para su potencial aplicación en TFD y TFDA.

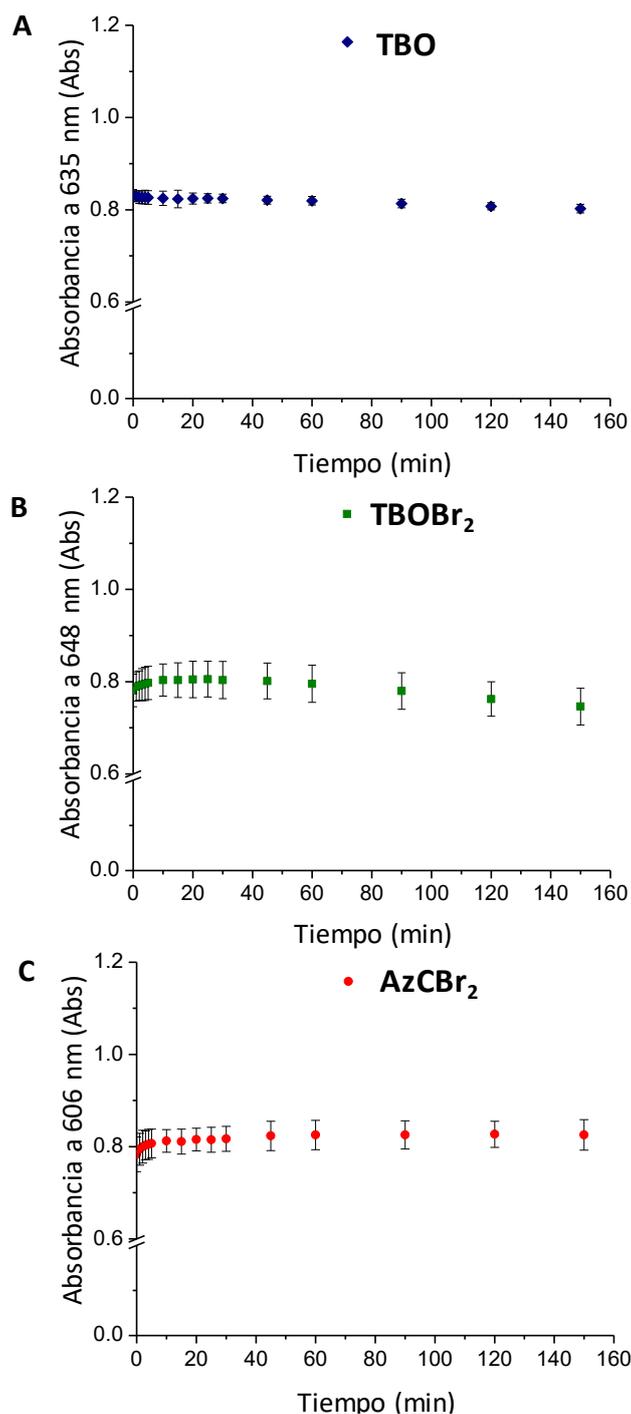


Figura 3.3.1: Representación gráfica de absorbancia en función del tiempo de irradiación. **(A)** TBO, **(B)** TBOBr₂ y **(C)** AzCBr₂.

3.4. PRODUCCIÓN DE OXÍGENO SINGLETE

El primer estado electrónicamente excitado del oxígeno molecular (O₂) denominado oxígeno singlete (¹O₂) es la principal especie citotóxica generada en la TFD y TFDA ⁶⁷.

La TFD es en la actualidad un proceso eficaz frente a diferentes microorganismos tales como virus, bacterias, protozoos y hongos. El $^1\text{O}_2$ constituye una especie altamente tóxica que produce daño en la célula microbiana atacando los lípidos de la membrana, proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares ⁶⁸.

La muerte microbiana y el daño celular se produce a través de tres mecanismos: inactivación de enzimas y proteínas esenciales, daño en el ADN y deterioro de la membrana celular. También se incluyen entre otros el entrecruzamiento entre proteínas, un importante daño oxidativo de los ácidos nucleicos y la oxidación de los lípidos de membrana y aminoácidos con la subsiguiente alteración del normal funcionamiento del metabolismo del patógeno ⁶⁹.

El $^1\text{O}_2$ cataliza una serie de reacciones químicas en cadena que derivan en la disrupción de la membrana plasmática, alteraciones en las proteínas y el material genético de las células microbianas a través de una vía oxidativa no tóxica para el huésped. Esto es consecuencia de los mecanismos más complejos de protección desarrollados por las células eucariotas. Los organismos constituidos por éstas han generado un sistema endógeno, enzimático y no enzimático, que evita el daño oxidativo producido por diferentes EROs en respuesta al proceso de respiración aeróbica ⁷⁰.

La TFD aplicada a patologías oncológicas y no oncológicas se caracteriza por la selectividad del Fs frente a las células malignas como se expuso en el capítulo 1 sección 1.3. Al irradiar solo la zona a tratar se produce la activación del Fs con la consecuente formación de diferentes EROs ($^1\text{O}_2$ o radicales libres), responsables de la destrucción celular y tejidos tumorales ⁷¹.

El $^1\text{O}_2$ es una de las especies más relevantes biológicamente capaz de reaccionar de manera eficaz con los componentes celulares. La mayoría de las biomoléculas presentan elementos insaturados en su estructura que son excelentes sustratos para el $^1\text{O}_2$. Tal es el caso de la guanina (base nitrogenada presente en el ADN), ácidos grasos poliinsaturados, colesterol (lípidos de la membrana plasmática) y numerosos aminoácidos incluido el triptófano, tirosina, histidina, metionina y cisteína (componentes estructurales de las proteínas). La interacción entre el $^1\text{O}_2$ y estos componentes celulares genera una importante oxidación de los ácidos nucleicos, lípidos insaturados de membrana y/o proteínas ⁷².

Antecedentes bibliográficos recientes indican que el daño oxidativo a nivel del ADN causado por la aplicación de la TFD involucra principalmente la reacción entre el $^1\text{O}_2$ y la base nitrogenada guanina, la cual presenta el menor potencial de oxidación. Esta reacción conduce

a la formación de varios intermediarios entre los que se destaca 8-oxo-7,8-dihidroguanina, el cual se incorpora al ADN pudiendo alterar la replicación del mismo ^{73,74}.

La reacción de ¹O₂ con lípidos insaturados presentes en la membrana plasmática, conlleva a la formación de hidroperóxidos lipídicos (reacciones eno) que podrían generar consecuencias severas. Éstos son inestables y desencadenan reacciones de peroxidación en cadena, cuya formación en el interior de la bicapa lipídica altera la estructura y función de las membranas conduciendo a la lesión y muerte celular ⁷⁵⁻⁷⁷.

Por otra parte los aminoácidos triptófano, tirosina, histidina, metionina, cisteína y cistina presentes en diferentes proteínas se oxidan significativamente en presencia de ¹O₂ a pH fisiológico dando origen a diferentes hidroperóxidos y endoperóxidos ^{19,76,78}.

Todos los mecanismos antes mencionados indican que el estrés oxidativo causado por el tratamiento fotodinámico puede ocasionar una alteración en la permeabilidad de las membranas celulares, causar daño e inestabilidad a nivel genómico, disminuir la actividad de ciertas enzimas y generar proteínas más susceptibles a la degradación proteolítica. Estas alteraciones afectan al metabolismo celular e inducen a la muerte por apoptosis o necrosis ⁷⁹.

La interpretación cuantitativa del efecto fotodinámico en los sistemas biológicos y la acción antimicrobiana de los Fs requieren la determinación del rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) ⁸⁰. Esta propiedad involucra la eficiencia del Fs frente a un impacto lumínico para transformar el O₂ (estado fundamental) en ¹O₂ ⁸¹.

El valor de Φ_{Δ} de un Fs se evalúa de modo directo mediante la determinación por luminiscencia del ¹O₂ generado, midiendo la fosforescencia resuelta en el tiempo a 1270 nm. Las metodologías indirectas se basan en una reacción química que se desarrolla entre el ¹O₂ y una molécula que actúa como atrapador químico del ¹O₂. Ésta produce la descomposición del sustrato químico que se evalúa mediante diferentes metodologías tales como RMN, espectrofotometría de absorción UV-Visible o fluorescencia. La disminución de la concentración del atrapador químico está directamente relacionada con la cantidad de ¹O₂.

Los compuestos más utilizados como atrapadores del ¹O₂ son: 1,3-difenilisobenzofurano, triptófano, 9,10-dimetilantraceno (DMA), ácido 9,10-antracenedipropiónico y ácido dimalónico de 9,10-dimetilantraceno (ABDA, por sus siglas en inglés), entre otros ⁸²⁻⁸⁴.

La determinación del valor de Φ_{Δ} de los nuevos Fs se desarrolló aplicando las metodologías descritas en 3.4.1 y 3.4.2.

3.4.1. Metodología directa: Luminiscencia del oxígeno singlete

3.4.1.1. Materiales y métodos

Este ensayo se desarrolló en un equipo de láser flash fotólisis y los valores de ϕ_{Δ} se determinaron mediante el análisis de fosforescencia a tiempo cero, con posterioridad a la excitación de los Fs, aplicando diferentes intensidades de irradiación. Se prepararon soluciones de los fotosensibilizadores TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂ en DMF (solvente monomerizante) con valores de absorbancia próximos a 0,3 ($\lambda_{\text{max}} = 532 \text{ nm}$). La elección del solvente se sustenta en antecedentes bibliográficos que indican que la especie monomérica de los Fs tiazínicos presentarían un mayor valor de ϕ_{Δ} en comparación con sus respectivas especies agregadas (dímeros, trímeros y agregados de orden superior)⁸⁵⁻⁸⁷. La evaluación correspondiente a los agregados se realizó en agua deuterada (D₂O), la cual aumenta el tiempo de vida del ¹O₂ facilitando la detección⁸⁸.

Los ensayos de agregación relativos a los nuevos Fs se presentan en el capítulo 4, sección 4.3.1. Todas las determinaciones se realizaron empleando Rosa de Bengala (RB) como referencia, cuyo máximo de absorción a 562 nm es comparable a la longitud de onda atribuible a las especies monoméricas de los Fs tiazínicos⁸⁹.

Las soluciones se prepararon a la concentración de los agentes Fs correspondientes a un valor de absorbancia $\approx 0,3$ a la longitud de onda de excitación. Las muestras se irradiaron a 532 nm con pulsos de 18 ns utilizando un láser de Nd: YAG (Spectron Laser SL400). La luz emitida por el láser se filtró apropiadamente a fin de variar la energía de irradiación que es proporcional a la transmitancia porcentual (T%) del filtro utilizado. La emisión fosforescente del ¹O₂ generado se detectó a 1270 nm con posterioridad a los 4-6 μs del impulso láser utilizando un detector de germanio amplificado (Judson J16/8SP). La salida del detector se acopló a un osciloscopio digital y a una computadora que permitió realizar el procesamiento de datos. Se promediaron las señales de 10 pulsos del láser y la traza obtenida se ajustó a una función monoexponencial de tiempo caracterizado por el valor de ϕ_{Δ} .

La representación gráfica de la intensidad de la fosforescencia de ¹O₂ a tiempo cero (I_0) en función de la T% permitió determinar la pendiente (p) correspondiente a cada uno de los compuestos ensayados (Ecuación 3.4.1). Aplicando la Ecuación 3.4.2 se calculó el valor de ϕ_{Δ}

comparando las (p) obtenidas para los Fs, la referencia (RB) y los valores de absorbancia a la $\lambda_{\max}(A_\lambda)$ correspondientes. Los datos se procesaron utilizando el programa OriginPro 8 SR0.

$$I_0 = p T\% \quad \text{Ecuación 3.4.1}$$

$$\Phi_{\Delta}^{Sens} = \frac{\Phi_{\Delta}^{Ref} p^{Sens} A_{\lambda}^{Ref}}{p^{Ref} A_{\lambda}^{Sens}} \quad \text{Ecuación 3.4.2}$$

3.4.1.2. Resultados y discusión

La producción de 1O_2 de TBO, TBOBr₂, AzCBr₂ y RB se evaluó mediante luminiscencia en DMF y D₂O. Los resultados obtenidos en DMF para las especies monoméricas de los nuevos Fs indicaron una importante dispersión (Figura 3.4.1), que se representa en los valores de coeficiente de correlación (r^2) obtenidos en el ajuste lineal de los datos.

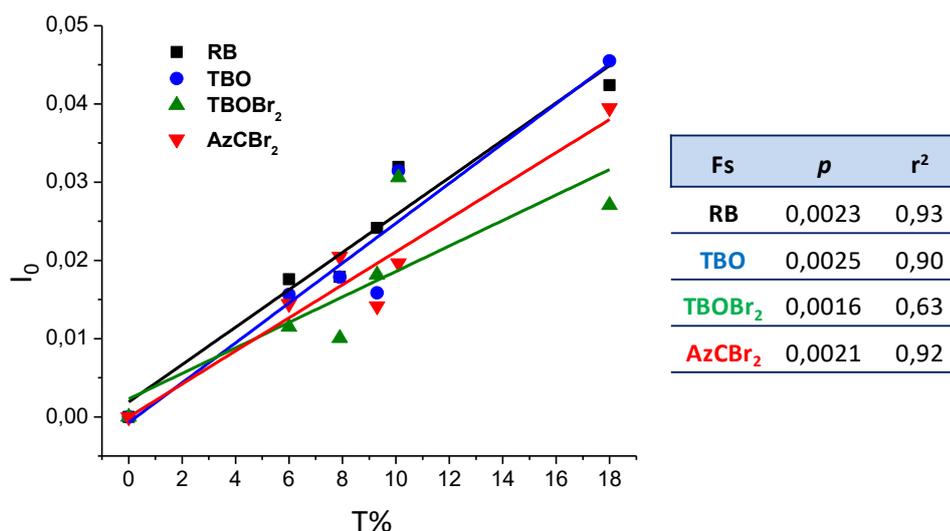


Figura 3.4.1: Gráfico de I_0 en función de % de transmitancia correspondiente a la referencia y los nuevos Fs.

Los espectros de fosforescencia obtenidos en DMF para RB, TBO y TBOBr₂ a una energía de irradiación (E) equivalente a 7,4 %, 12,3 % y 7,4 % de transmitancia respectivamente, se muestran en la Figura 3.4.2. La representación gráfica de fosforescencia de 1O_2 resuelta en el tiempo para la referencia RB, muestra un tiempo de vida del 1O_2 (τ) de 10 μ s (Figura 3.4.2 A) consistente con el informado en bibliografía⁹⁰⁻⁹². Los resultados correspondientes a TBO y TBOBr₂ indicaron en ambos casos, un τ menor a 6 μ s (Figuras 3.4.2 B y C). Estas

determinaciones están en el límite de detección del sistema y explican la dispersión que se observa en la Figura 3.4.1. Las condiciones experimentales evaluadas y la metodología aplicada no permitieron calcular el valor de ϕ_{Δ} de los nuevos Fs.

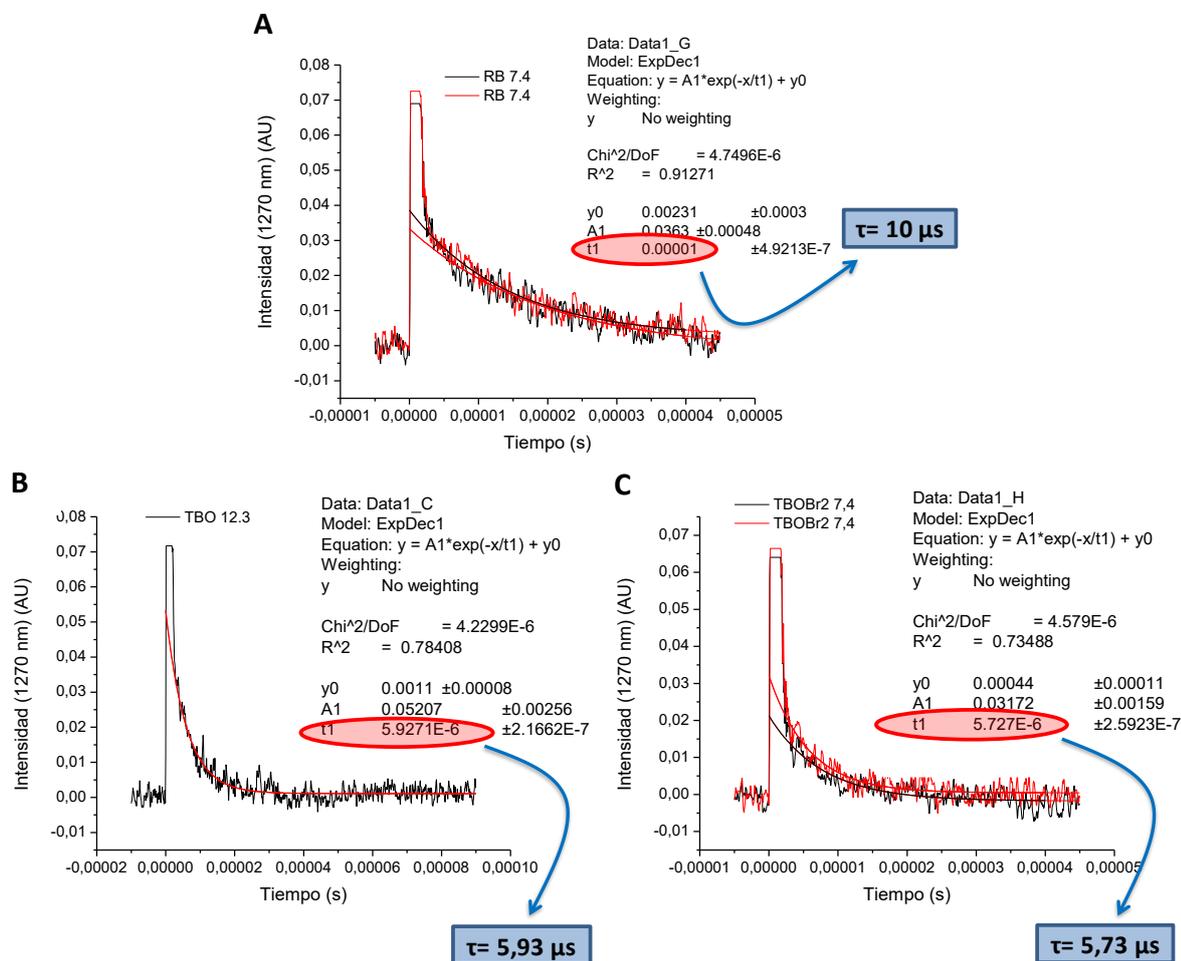


Figura 3.4.2: Espectros de fosforescencia de $^1\text{O}_2$ en DMF resuelta en el tiempo para (A) RB, (B) TBO y (C) TBOBr₂.

Numerosas referencias bibliográficas señalan una interacción entre el $^1\text{O}_2$ y un compuesto desactivante o *quencher* que conduce a la formación de un complejo excitado, denominado exciplejo, el cual se desactiva mediante distintos procedimientos que involucran transferencia de energía o reacciones químicas^{93,94}.

Los mecanismos que implican transferencia de energía se denominan desactivación física y se caracterizan por la formación de un complejo o exciplejo entre el $^1\text{O}_2$ en el estado triplete

excitado y el compuesto desactivante en el estado fundamental. La desactivación por *quencher*s físicos no genera nuevos productos de reacción^{95,96}.

Por otra parte el mecanismo correspondiente a la reacción química entre el *quencher* y el $^1\text{O}_2$ es conocido como desactivación química. Generalmente en estos casos la molécula desactivante se oxida dando origen a diferentes productos de degradación^{97,98}.

Numerosas publicaciones científicas indican que aminas alifáticas y aromáticas, hidrazinas, fenoles, metoxibencenos y numerosos compuestos biológicos (vitamina E, porfirinas, ascorbato y aminoácidos) actúan como desactivantes físicos del $^1\text{O}_2$ mediado por la transferencia reversible de carga que involucra la formación de un excíplejo con transferencia parcial de electrones (Figura 3.4.3)^{96,99–103}.

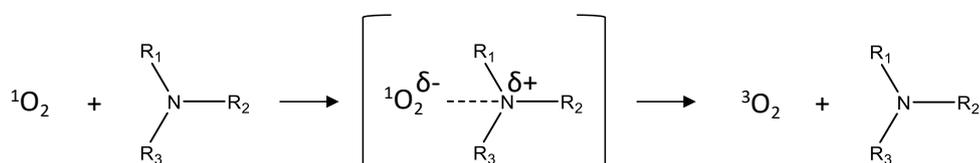


Figura 3.4.3: Esquema representativo de la desactivación física del $^1\text{O}_2$ por aminas, mediante la transferencia parcial de electrones (formación de un excíplejo).

Las aminas primarias y derivados de anilinas son efectivos inhibidores físicos del $^1\text{O}_2$ ^{99,104}. Los Fs tiazínicos y los nuevos derivados dibromados presentan en sus estructuras químicas estos grupos químicos (Figura 3.4.4), por lo cual podrían actuar tanto como Fs y desactivantes físicos del $^1\text{O}_2$ ¹⁰⁵ impidiendo la determinación del valor de ϕ_{Δ} .

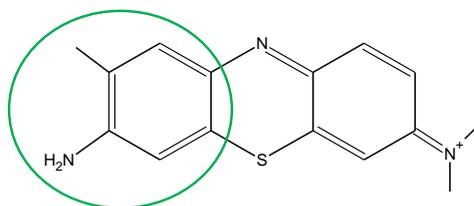


Figura 3.4.4: Estructura química de toluidine blue O.

Además cabe agregar que los ensayos desarrollados en D_2O donde predominan las especies agregadas correspondientes a los Fs dibromados, indicaron severos problemas de solubilidad imposibilitando la reproducibilidad del ensayo y en consecuencia la determinación del valor de ϕ_{Δ} .

Por lo expuesto, se procedió a aplicar metodologías indirectas para la evaluación de la producción de $^1\text{O}_2$ de TBOBr₂ y AzCBr₂.

3.4.2. Metodologías indirectas: Fotooxidación de ácido dimalónico de 9,10-dimetilantraceno y 9,10-dimetilantraceno

3.4.2.1. Materiales y métodos

Las metodologías indirectas aplicables a la determinación del valor de ϕ_{Δ} requirieron la preparación de soluciones de TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂ en agua Milli-Q y el atrapador químico de $^1\text{O}_2$ denominado ácido dimalónico de 9,10-dimetilantraceno (ABDA, por sus siglas en inglés). También fue necesario disolver los Fs en DMF y DMF:ácido acético glacial (DMF:HAc) empleando en este caso 9,10-dimetilantraceno (DMA, por sus siglas en inglés) como atrapador del $^1\text{O}_2$ en solvente orgánico. El empleo de ABDA y DMA (Figura 3.4.5) se corresponde con la mayor solubilidad de cada atrapador de $^1\text{O}_2$ en los medios evaluados. Las soluciones de los Fs, ABDA y DMA se prepararon a valores de concentración correspondientes a absorbancias de 0,2; 0,3 y 0,6 respectivamente (a la λ_{max})^{2,106}. La irradiación se realizó con una lámpara Led Osram Parathom[®] de 5 W por un tiempo total de 360 segundos a una distancia de 5 cm de la muestra (Dosis de Luz= 8,4 mW/cm²). El decaimiento en los valores de absorbancia de ABDA y DMA a 379 nm se determinó en un espectrofotómetro Shimadzu UV-Visible 160A a intervalos de 30 y 60 segundos. Las constantes de velocidad observadas (K_{obs}) se determinaron mediante el ajuste lineal de la representación gráfica del $\text{Ln}(A_0/A_t)$ en función del tiempo de irradiación. Los valores de A_0 y A_t corresponden a los valores de absorbancia de ABDA o DMA a tiempo cero y diferentes de cero.

El valor de ϕ_{Δ} en soluciones acuosas y solventes orgánicos se determinó aplicando la Ecuación 3.4.3, siendo Abs_0 la absorbancia inicial a la λ_{max} correspondiente a cada compuesto, Ref la referencia (TBO) y Fs el fotosensibilizador a evaluar. Los ensayos se realizaron por duplicado y los datos fueron procesados con el programa OriginPro 8 SRO (OriginLab Corporation). Como etapa previa se corroboró que los Fs, ABDA y DMA no presentaran fotodescomposición en las condiciones del diseño experimental.

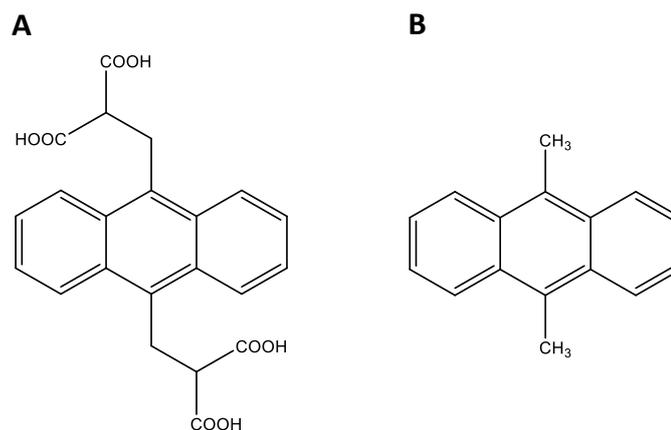


Figura 3.4.5: Estructuras químicas de los atrapadores de 1O_2 : **A)** ABDA y **B)** DMA.

$$\Phi_{\Delta}^{Fs} = \frac{\Phi_{\Delta}^{Ref} k_{obs}^{Fs} Abs_0^{Ref}}{k_{obs}^{Ref} Abs_0^{Fs}} \quad \text{Ecuación 3.4.3}$$

3.4.2.2. Resultados y discusión

3.4.2.2.1. Fotooxidación de ácido dimalónico de 9,10-dimetilantraceno en N,N-dimetilformamida

La determinación de los valores de Φ_{Δ} en soluciones acuosas correspondientes a los Fs evaluados se muestran en la Tabla 3.4.1. A la referencia TBO se le asignó de manera arbitraria el valor de $\Phi_{\Delta} = 1,00$ a fin de permitir las comparaciones pertinentes.

Tabla 3.4.1: Ensayo de fotodescomposición de ABDA en agua.

Fs	Abs ₀ ^{Fs}	k _{obs} (x10 ⁻⁴ ; s ⁻¹)	Φ _Δ
TBO	0,175±0,003	14,4±1,4	1,00
TBOBr ₂	0,20±0,01	1,2±0,5	0,08±0,03
AzCBr ₂	0,203±0,005	2,5±0,2	0,15±0,02

Los resultados obtenidos indican que en las condiciones ensayadas los nuevos Fs dibromados no son mejores productores de 1O_2 que TBO. Los espectros de absorción de TBO y TBOBr₂ en agua y en soluciones acuosas de ABDA se muestran en la Figura 3.4.6. Se observan cambios

en las curvas espectrales de los Fs con un desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorción de 3 nm para TBO (Figura 3.4.6 A y B) y de 33 nm para los derivados dibromados de TBO (Figura 3.4.6 C y D) y AzC (Figura 3.4.6 E y F).

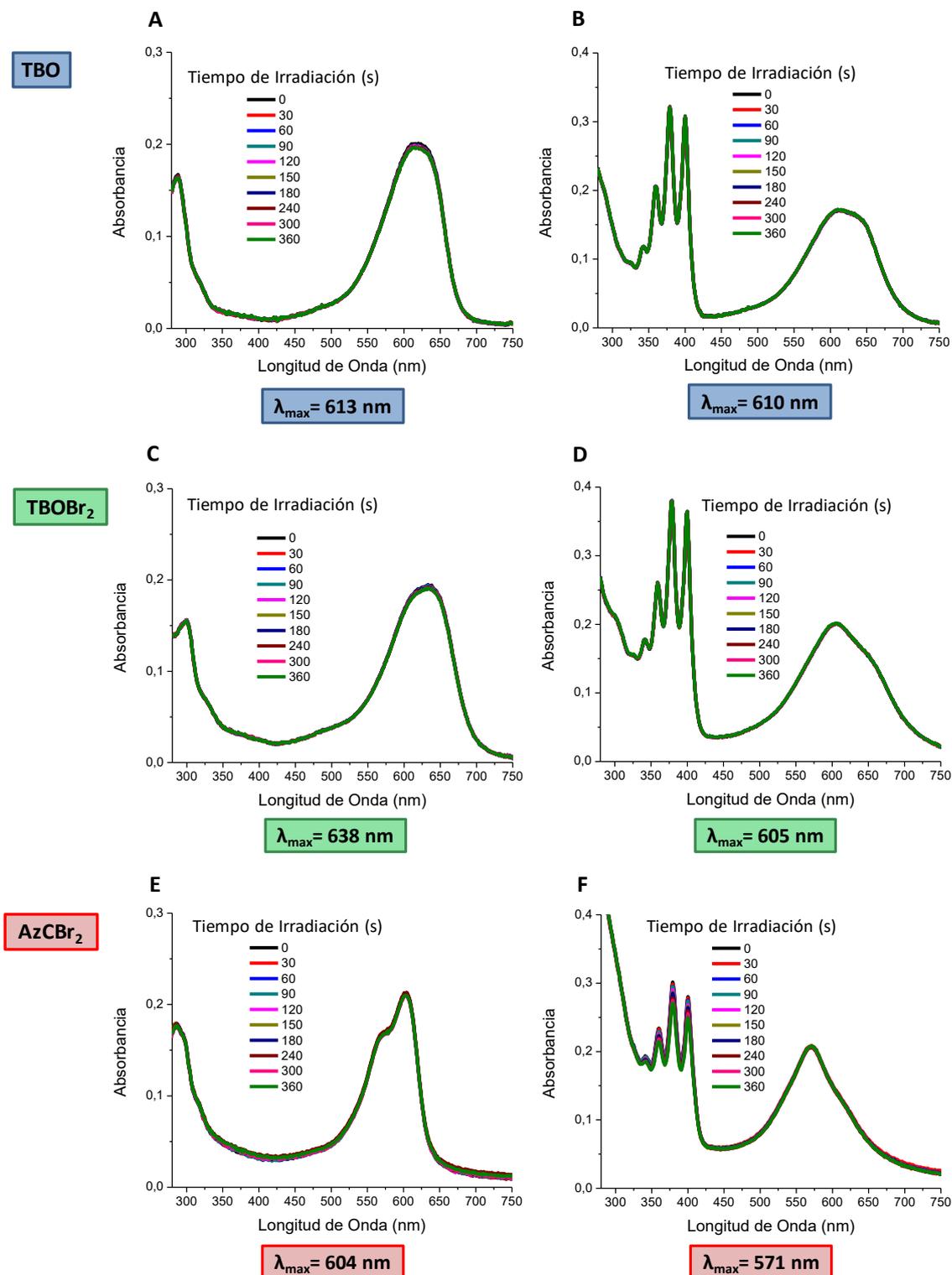


Figura 3.4.6: Espectros de absorción de TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂ en agua (A, C y E) y en solución acuosa de ABDA (B, D y F).

Los estudios realizados por Lei W. y col., indican que ABDA en soluciones acuosas neutras está totalmente desprotonado (presenta 4 cargas negativas en su estructura) y formaría un complejo (Figura 3.4.7) por atracción electrostática e interacciones π - π con Coralyne, que presenta carga positiva y una estructura aromática plana (semejante a los compuestos tiazínicos) ¹⁰⁷.

Los trabajos científicos publicados por Wu H. y col. y Martínez G.R. y col., proponen que los atrapadores de $^1\text{O}_2$ aniónicos y solubles en agua, interaccionan con MB que presenta una estructura fenotiazínica al igual que TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂ ^{108,109}.

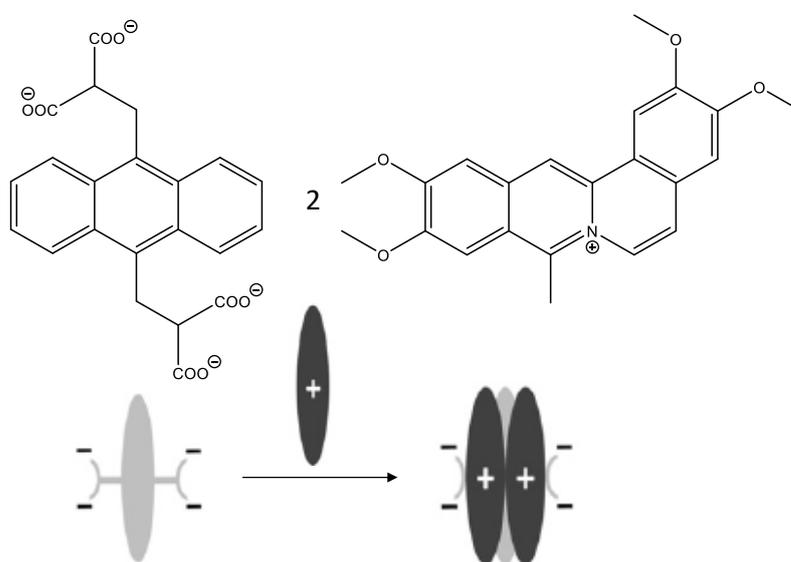


Figura 3.4.7: Interacción entre ABDA y Coralyne propuesto por Lei W. y col.

Por otra parte los autores Nardello V. y col. demostraron que los atrapadores aniónicos típicos como difenilantraceno-2,3,6,7-tetracarboxilato de potasio (DPATC) y difenilantraceno-2,7-disulfonato de sodio (DPADS) interaccionan con MB modificando la curva espectral y por consiguiente la eficiencia del Fs ¹¹⁰. En la Figura 3.4.8 se muestran las curvas espectrales correspondientes a MB con el agregado de atrapadores aniónicos del $^1\text{O}_2$ tales como DPATC y DPADS, observando en todos los casos un cambio en la longitud de onda de máxima absorción.

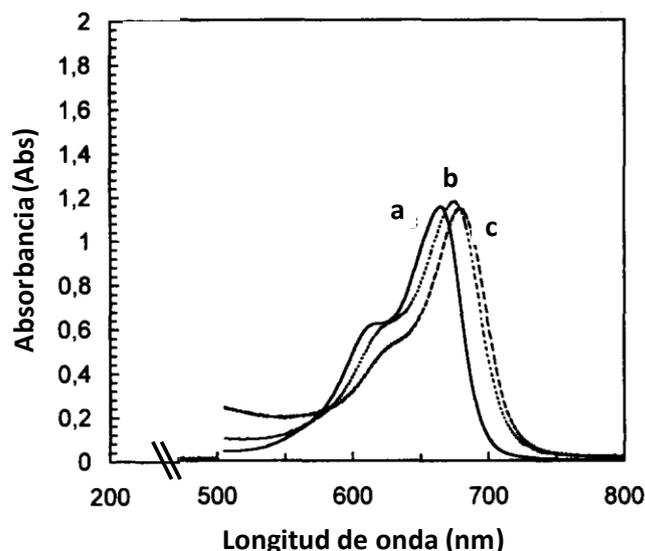


Figura 3.4.8: Espectros UV-Visible en H₂O Nardello y col. **a)** MB 3x10⁻⁵ M; **b)** MB en presencia de DPATC 1x10⁻² M y **c)** MB en presencia de DPADS 1x10⁻² M.

La bibliografía respaldatoria permitió inferir que en las condiciones experimentales ensayadas, los nuevos Fs tiazínicos catiónicos podrían formar un complejo con ABDA mediante atracciones electrostáticas e interacciones π-π. Esto se evidenció en las curvas espectrales registradas tanto en agua como en solución acuosa de ABDA (Figura 3.4.6).

3.4.2.2.2. Fotooxidación de 9,10-dimetilantraceno en N,N-dimetilformamida

Antecedentes bibliográficos indican que los monómeros de diferentes Fs son más fotoactivos que los respectivos agregados ^{1,111,112}, por lo cual la producción de ¹O₂ de las especies monoméricas de TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂ se determinó en DMF (solvente monomerizante) ¹¹³⁻¹¹⁵. Los resultados obtenidos que se muestran en la Tabla 3.4.2 evidencian una disminución en los valores de ϕ_{Δ} de los nuevos derivados dibromados con relación a TBO.

Tabla 3.4.2: Fotodescomposición de DMA en DMF.

Fs	Abs ₀ ^{Fs}	k _{obs} (x10 ⁻⁴ ; s ⁻¹)	ϕ_{Δ}
TBO	0,200±0,003	22,3±2,0	1,00
TBOBr ₂	0,202±0,002	2,1±0,1	0,095±0,002
AzCBr ₂	0,305±0,004	1,33±0,02	0,039±0,003

El análisis de las curvas espectrales (Figura 3.4.9) muestra que en DMF, TBO presenta dos bandas de absorción mientras que TBOBr₂ y AzCBr₂ una única banda, a 484 nm y 504 nm respectivamente.

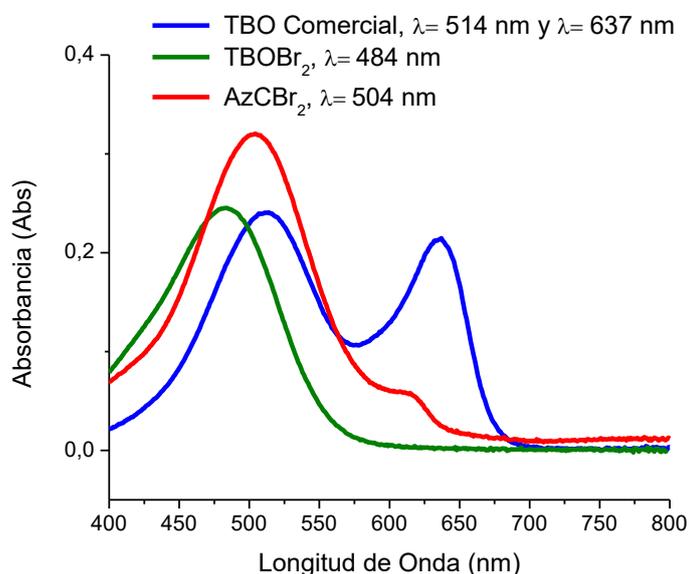


Figura 3.4.9: Espectros de absorción UV-Visible de TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂ en DMF.

Los resultados obtenidos indican que TBO en DMF presenta un equilibrio entre las especies monomérica y agregada, en tanto que los nuevos derivados dibromados estarían presentes solo como monómeros. Los valores de Φ_{Δ} determinados señalan que las especies monoméricas podrían interactuar con DMA, disminuyendo su fotodegradación y en consecuencia el valor de Φ_{Δ} de los nuevos compuestos⁸⁹. De lo expuesto se desprende la necesidad de un diseño experimental que permita, para todos los Fs, la presencia de una única especie con el objetivo de realizar una correcta comparación y evitar la potencial interacción con DMA.

3.4.2.2.3. Fotooxidación de 9,10-dimetilantraceno en N,N-dimetilformamida con ácido acético

En este caso los Fs se evaluaron en DMF con el agregado de ácido acético (DMF-HAc) a fin de desplazar el equilibrio hacia una única especie agregada lo que se evidenció por espectrofotometría UV-Visible (Figura 3.4.10).

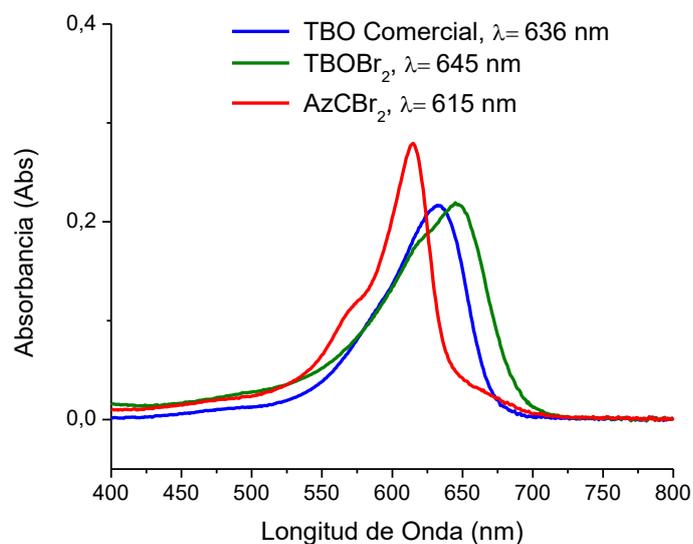


Figura 3.4.10: Espectros de Absorción UV-Visible de TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂ en DMF-HAc.

Las evaluaciones en DMF-HAc demostraron que la única especie preponderante correspondería a la forma agregada de los Fs, determinando que los derivados dibromados TBOBr₂ y AzCBr₂ presentaron valores de ϕ_{Δ} comparables o superiores a TBO.

Los valores de ϕ_{Δ} obtenidos en estas condiciones experimentales se muestran en la Tabla 3.4.3. Se observó que AzCBr₂ presentó una mayor producción de ¹O₂ en comparación con la referencia TBO.

Tabla 3.4.3: Fotodescomposición de DMA en DMF-HAc.

Fs	Abs ₀ ^{Fs}	k _{obs} (x10 ⁻³ ; s ⁻¹)	ϕ_{Δ}
TBO	0,20±0,01	3,2±0,2	1,00
TBOBr ₂	0,208±0,001	2,7±0,4	0,81±0,10
AzCBr ₂	0,30±0,02	7,5±0,5	1,562±0,001

Los resultados obtenidos para la fotodescomposición de DMA, correspondientes a los Fs dibromados en DMF-HAc podría explicarse por “efecto del átomo pesado” ya que la introducción de halógenos, genera un incremento de las transiciones del estado singlete excitado al estado triplete excitado (cruce entre sistemas) y en consecuencia, en la producción de ¹O₂^{116–118}.

Estos resultados se corresponden con lo observado por Vara J. y col. para los derivados AzB y AzBBr aplicando la metodología indirecta (fotodescomposición de DMA) y directa (luminiscencia de $^1\text{O}_2$). Los autores señalan un valor de Φ_{Δ} significativamente menor en presencia de los monómeros, lo cual se sustenta en que el estado excitado de los Fs interacciona con DMA disminuyendo la fotodegradación. Esta interacción con el atrapador de $^1\text{O}_2$ no se observa con el predominio de las especies agregadas ⁸⁹.

3.5. CONCLUSIONES PARCIALES

La evaluación de las propiedades fisicoquímicas y fotoquímicas de TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂ de relevancia biológica y farmacéutica, permitieron inferir la eficacia de estos compuestos como potenciales Fs.

La determinación del pK_a correspondiente a TBOBr₂ y AzCBr₂ demostró que la introducción de átomos de bromo produce una disminución de hasta cuatro unidades con relación a los respectivos precursores. Estos resultados señalan que en medios fisiológicos los nuevos derivados estarían presentes como una combinación de especies neutras y catiónicas, permitiendo la incorporación y acumulación en diferentes células blanco.

Con relación a la estabilidad fotoquímica, se demostró que la incorporación de átomos de bromo en las moléculas de TBO y AzC no influyó en la fotoestabilidad de los nuevos agentes terapéuticos. Antecedentes bibliográficos indican una importante correlación entre Fs fotoestables y eficacia fotodinámica. Los agentes fototerapéuticos que presentan una óptima estabilidad fotoquímica, generalmente son buenos productores de EROs y por lo tanto responsables del daño celular en TFD y TFDA ^{119,120}.

En las condiciones experimentales ensayadas (fotodescomposición de ABDA en medio acuoso) los Fs tiazínicos catiónicos formarían un complejo con ABDA mediante interacciones electrostáticas y π - π , lo cual imposibilitó una determinación confiable del Φ_{Δ} . En tal sentido, los ensayos realizados en DMF-HAc, revelaron la presencia de una única especie agregada para TBOBr₂ y AzCBr₂ presentando Φ_{Δ} comparables o significativamente superiores a TBO, lo cual es un resultado promisorio para futuras aplicaciones en TFD y TFDA.

3.6. BIBLIOGRAFÍA

1. Vara, J., Gualdesi, M. S., Aiassa, V. y Ortiz, C. S. Evaluation of physicochemical properties and bacterial photoinactivation of phenothiazine photosensitizers. *Photochem. Photobiol. Sci.* **18**, 1576-1586 (2019).
2. Gualdesi, M. S., Vara, J., Aiassa, V., Alvarez Igarzabal, C. I. y Ortiz, C. S. Thionine in the design of new photosensitizers: bromination and vehiculization in polymeric nanoparticles. *J. Mol. Liq.* **310**, 1-9 (2020).
3. Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F. y Kiesslich, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med. Sci.* **24**, 259-268 (2009).
4. Monteiro, J. S. C. y col. Enhancement of photodynamic inactivation of planktonic cultures of *Staphylococcus aureus* by DMMB-AuNPs. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **31**, 1-7 (2020).
5. Sobotta, L., Skupin-Mrugalska, P., Piskorz, J. y Mielcarek, J. Non-porphyrinoid photosensitizers mediated photodynamic inactivation against bacteria. *Dye. Pigment.* **163**, 337-355 (2019).
6. Franco, T. P. M., Dos Santos, A. P. P. y Canabarro, A. The effects of repeated applications of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of residual periodontal pockets: a systematic review. *Lasers Med. Sci.* **34**, 855-863 (2019).
7. Gopi, C., Girija, V. y Dasaratha, M. Synthesis, spectroscopic characterization, X-ray crystallography, structural activity relationship and antimicrobial activity of novel 4-(5-(10-(3-*N,N*-dimethylamino)propyl)-10*H*-phenothiazine-3-yl)-1,3,4-thiadiazole-2-yl) Azo dye/Schiff base derivatives. *Futur. J. Pharm. Sci.* **3**, 79-89 (2017).
8. Pluta, K., Morak-Mlodawska, B. y Jelén, M. Recent progress in biological activities of synthesized phenothiazines. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 3179-3189 (2011).
9. Monteiro, J. S. C. y col. Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy (AmPDT) on *Staphylococcus aureus* using phenothiazine compound with red laser. *Lasers Med. Sci.* **32**, 29-34 (2017).
10. Garcia, V. G. y col. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J. Periodontal Res.* **49**, 584-594 (2014).

11. Calzavara-Pinton, P., Rossi, M. T., Sala, R. y Venturini, M. Photodynamic antifungal chemotherapy. *Photochem. Photobiol.* **88**, 512-522 (2012).
12. Mfouo-Tynga, I. S., Dias, L. D., Inada, N. M. y Kurachi, C. Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **34**, 1-11 (2021).
13. Glass, S., Rüdiger, T., Griebel, J., Abel, B. y Schulze, A. Uptake and release of photosensitizers in a hydrogel for applications in photodynamic therapy: the impact of structural parameters on intrapolymer transport dynamics. *RSC Adv.* **8**, 41624-41632 (2018).
14. Beltrán, A. y col. A photobleaching resistant polymer supported hexanuclear molybdenum iodide cluster for photocatalytic oxygenations and photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus*. *J. Mater. Chem. B* **4**, 5975-5979 (2016).
15. Blessy, M., Patel, R. D., Prajapati, P. N. y Agrawal, Y. K. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - a review. *J. Pharm. Anal.* **4**, 159-165 (2014).
16. Ferreira, J. y col. Photostability of different chlorine photosensitizers. *Laser Phys. Lett.* **5**, 156-161 (2008).
17. Lv, J., Wu, G., He, Y., Zhang, L. y Yi, Y. Methylene blue-loaded gold nanobipyramids @SiO₂ enhanced singlet oxygen generation for phototherapy of cancer cells. *Opt. Mater. Express* **7**, 409-414 (2017).
18. AL-Akhras, M. A., Aljarrah, K., Albiss, B. y Bala, A. A. Continuous and delayed photohemolysis sensitized with methylene blue and iron oxide nanoparticles (Fe₃O₄). *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **92**, 1-13 (2015).
19. Hirakawa, K. y Ishikawa, T. Phenothiazine dyes photosensitize protein damage through electron transfer and singlet oxygen generation. *Dye. Pigment.* **142**, 183-188 (2017).
20. Ronzani, F. y col. Comparison of the photophysical properties of three phenothiazine derivatives: transient detection and singlet oxygen production. *Photochem. Photobiol. Sci.* **12**, 2160-2169 (2013).
21. Ghalami-Choobar, B. y Ghiami-Shomami, A. Theoretical calculation of pKa values of the nortryptiline and amitryptiline drugs in aqueous and non-aqueous solvents. *Comput. Theor. Chem.* 66-70 (2013).
22. Silva, F. V. L., Resende, S., Araújo, A. N. y Prior, J. A. V. Determination of pKa(s) of

- nilutamide through UV-visible spectroscopy. *Microchem. J.* **138**, 303-308 (2018).
23. Allen, L. V., Popovich, N. G. y Ansel, H. C. Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems. *Kluwer, Wolters*. 2010.
 24. Snigur, D. V., Chebotarev, A. N. y Bevziuk, K. V. Acid-base properties of azo dyes in solution studied using spectrophotometry and colorimetry. *J. Appl. Spectrosc.* **85**, 21-26 (2018).
 25. Manallack, D. T. The acid-base profile of a contemporary set of drugs: implications for drug discovery. *SAR QSAR Environ. Res.* **20**, 611-655 (2009).
 26. Zbacnik, T. J. y col. Role of buffers in protein formulations. *J. Pharm. Sci.* **106**, 713-733 (2017).
 27. Shayesteh, T. H., Radmehr, M., Khajavi, F. y Mahjub, R. Application of chemometrics in determination of the acid dissociation constants (pKa) of several benzodiazepine derivatives as poorly soluble drugs in the presence of ionic surfactants. *Eur. J. Pharm. Sci.* **69**, 44-50 (2015).
 28. Chaurasia, G. A review on pharmaceutical preformulation studies in formulation and development of new drug molecules. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **7**, 2313-2320 (2016).
 29. Scott, D. O., Ghosh, A., Di, L. y Maurer, T. S. Passive drug permeation through membranes and cellular distribution. *Pharmacol. Res.* **117**, 94-102 (2017).
 30. Narasimham, L. y Barhate, V. D. Physico-chemical characterization of some beta blockers and anti-diabetic drugs-potentiometric and spectrophotometric pKa determination in different co-solvents. *Eur. J. Chem.* **2**, 36-46 (2011).
 31. Daldal, Y. D. y Demiralay, E. Ç. Chromatographic and UV-visible spectrophotometric pKa determination of some purine antimetabolites. *J. Mol. Liq.* **317**, 1-8 (2020).
 32. Pobudkowska, A., Ràfols, C., Subirats, X., Bosch, E. y Avdeef, A. Phenothiazines solution complexity-determination of pKa and solubility-pH profiles exhibiting sub-micellar aggregation at 25 and 37 °C. *Eur. J. Pharm. Sci.* **93**, 163-176 (2016).
 33. Kantar, C., Mavi, V., Baltaş, N., Islamoğlu, F. y Şaşmaz, S. Novel zinc (II) phthalocyanines bearing azo-containing schiff base: determination of pKa values, absorption, emission, enzyme inhibition and photochemical properties. *J. Mol. Struct.* **1122**, 88-99 (2016).
 34. Neira, J. L., Rizzuti, B. y Iovanna, J. L. Determinants of the pKa values of ionizable residues in an intrinsically disordered protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **598**, 18-27 (2016).

35. Maliszewska, I., Wanarska, E., Thompson, Alex C., Saluel, I. D. W. y Matczyszyn, K. Biogenic gold nanoparticles decrease methylene blue photobleaching and enhance antimicrobial photodynamic therapy. *Molecules*. **26**, 357-375 (2021).
36. Wainwright, M. Phenothiazinium photosensitisers V. Photobactericidal activities of chromophore-methylated phenothiazinium salts. *Dye. Pigment*. **73**, 7-12 (2007).
37. Horobin, R. W., Stockert, J. C. y Rashid-Doubell, F. Fluorescent cationic probes for nuclei of living cells: why are they selective? A quantitative structure-activity relations analysis. *Histochem Cell Biol*. **126**, 165-175 (2006).
38. Mills, A., Hazafy, D., Parkinson, J., Tuttle, T. y Hutchings, M. G. Effect of alkali on methylene blue (C. I. Basic Blue 9) and other thiazine dyes. *Dye. Pigment*. **88**, 149-155 (2011).
39. Muehlmann, L. A., Joanitti, G. A., Silva, J. R., Longo, J. P. F. y Azevedo, R. B. Liposomal photosensitizers: potential platforms for anticancer photodynamic therapy. *Brazilian J. Med. Biol. Res*. **44**, 729-737 (2011).
40. Petrellis, M. C. y col. Proinflammatory effects of photoactivated methylene blue on rat model of walker 256 carcinosarcoma. *Exp. Oncol*. **41**, 112-122 (2019).
41. Beckham, T. H. y col. LCL124, a cationic analog of ceramide, selectively induces pancreatic cancer cell death by accumulating in mitochondria. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. **344**, 167-178 (2013).
42. Ngen, E. J., Rajaputra, P. y You, Y. Evaluation of delocalized lipophilic cationic dyes as delivery vehicles for photosensitizers to mitochondria. *Bioorganic Med. Chem*. **17**, 6631-6640 (2009).
43. Morgan, J. y Oseroff, A. R. Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev*. **49**, 71-86 (2001).
44. Oniszczyk, A., Wojtunik-kulesza, K. A., Oniszczyk, T. y Kasprzak, K. The potential of photodynamic therapy (PDT)-experimental investigations and clinical use. *Biomed. Pharmacother*. **83**, 912-929 (2016).
45. Han, H. M., Gopal, R. y Park, Y. Design and membrane-disruption mechanism of charge-enriched AMPs exhibiting cell selectivity, high-salt resistance and anti-biofilm properties. *Amin. Acids*. **48**, 505-522 (2016).
46. Shrestha, A. y Kishen, A. Polycationic chitosan-conjugated photosensitizer for antibacterial photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol*. **88**, 577-583 (2012).

47. Goicoechea, J., Arregui, F. J., Corres, J. M. y Matias, I. R. Study and optimization of self-assembled polymeric multilayer structures with neutral red for pH sensing applications. *J. Sensors*. **2008**, 1-7 (2008).
48. Salim, H. A. M. y col. Photo-catalytic degradation of toluidine blue dye in aqueous medium under fluorescent light. *Int. Conf. Adv. Sci. Eng.* 384-388 (2018).
49. Dandriyal, J., Singla, R., Kumar, M. y Jaitak, V. Recent developments of C-4 substituted coumarin derivatives as anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **119**, 141-168 (2016).
50. Gualdesi, M. S. y col. Halogenated phenothiazine as photoantimicrobial agent against *Staphylococcus aureus*. Evaluation of the vehiculization in polymeric nanoparticles. *Dye. Pigment.* **170**, 1-8 (2019).
51. Radunz, S., Tschiche, H. R., Moldenhauer, D. y Resch-Genger, U. Broad range ON/OFF pH sensors based on pKa tunable fluorescent BODIPYs. *Sensors Actuators B.* **251**, 490-494 (2017).
52. Martínez, C. H. R. y col. Lowering the pKa of a bisimidazoline lead with halogen atoms results in improved activity and selectivity against *Trypanosoma brucei* in vitro. *Eur. J. Med. Chem.* **101**, 806-817 (2015).
53. de Souza, T. D. y col. Evaluation of photodynamic activity, photostability and in vitro drug release of zinc phthalocyanine-loaded nanocapsules. *Eur. J. Pharm. Sci.* **83**, 88-98 (2016).
54. Moan, J. Effect of bleaching of porphyrin sensitizers during photodynamic therapy. *Cancer Lett.* **33**, 45-53 (1986).
55. Jana, B. y col. Self-assembly of mitochondria-targeted photosensitizer to increase photostability and photodynamic therapeutic efficacy in hypoxia. *Chem. A Eur. J.* **26**, 10695-10701 (2020).
56. Arnaut, L. G. y col. Photodynamic therapy efficacy enhanced by dynamics: the role of charge transfer and photostability in the selection of photosensitizers. *Chem. A Eur. J.* **20**, 5346-5357 (2014).
57. Ferreira, J. y col. Can efficiency of the photosensitizer be predicted by its photostability in solution? *Laser Phys.* **19**, 1932-1938 (2009).
58. Gomes, M. C. y col. Photodynamic inactivation of *Penicillium chrysogenum* conidia by cationic porphyrins. *Photochem. Photobiol. Sci.* **10**, 1735-1743 (2011).
59. Lincoln, R. y col. *meso*-Acetoxymethyl BODIPY dyes for photodynamic therapy:

- improved photostability of singlet oxygen photosensitizers. *Photochem. Photobiol. Sci.* **16**, 178-184 (2017).
60. Felgenträger, A., Maisch, T., Dobler, D. y Späth, A. Hydrogen bond acceptors and additional cationic charges in methylene blue derivatives: photophysics and antimicrobial efficiency. *Biomed Res. Int.* **2013**, 1-12 (2013).
 61. Moreira, L. M. y col. Phenothiazinium dyes as photosensitizers (PS) in photodynamic therapy (PDT): spectroscopic properties and photochemical mechanisms. en *Advanced Aspects of Spectroscopy* 393-422 (2011).
 62. Xiao, Q. y col. Pyridine embedded phenothiazinium dyes as lysosome-targeted photosensitizers for highly efficient photodynamic antitumor therapy. *J. Med. Chem.* (2020).
 63. Gualdesi, M. S., Aiassa, V., Vara, J., Igarzabal, C. I. A. y Ortiz, C. S. Development and evaluation of novel nanophotosensitizers as photoantimicrobial agents against *Staphylococcus aureus*. *Mater. Sci. Eng. C* **94**, 303-309 (2019).
 64. Wydra, J. W., Cramer, N. B., Stansbury, J. W. y Bowman, C. N. The reciprocity law concerning light dose relationships applied to BisGMA/TEGDMA photopolymers: Theoretical analysis and experimental characterization. *Dent. Mater.* **30**, 605-612 (2014).
 65. Valdez-Calderón, A. y col. Brominated BODIPYs as potential photosensitizers for photodynamic therapy using a low irradiance excitation. *Polyhedron.* **176**, 1-8 (2020).
 66. Obłozna, M., Łapok, Ł., Pędziński, T. y Nowakowska, M. A beneficial effect of bromination on the photophysical and photochemical properties of Aza-BODIPY dyes with electron-donating groups. *Asian J. Org. Chem.* **8**, 1879-1892 (2019).
 67. Robinson-Duggon, J. y col. Supramolecular reversible on-off switch for singlet oxygen using cucurbit[*n*]uril inclusion complexes. *J. Phys. Chem.* **121**, 21782-21789 (2017).
 68. Misba, L., Zaidi, S. y Khan, A. U. Efficacy of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* biofilm: role of singlet oxygen. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **183**, 16-21 (2018).
 69. Kashef, N. y Hamblin, M. R. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? *Drug Resist. Updat.* **31**, 31-42 (2017).
 70. Rocha, M. P., Rosa, C. F. S. y Rosa, L. P. Chemical and biological systems of the activity oxygen singlete in the destruction of microbial cells in photodynamic therapy. *SM J.*

Nanotechnol. Nanomedicine **2**, 1-6 (2017).

71. Zou, Z., Chang, H., Li, H. y Wang, S. Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for cancer therapy. *Apoptosis* **22**, 1321-1335 (2017).
72. Di Mascio, P. y col. Singlet molecular oxygen reactions with nucleic acids, lipids, and proteins. *Chem. Rev.* **119**, 2043-2086 (2019).
73. Vázquez- Ortega, F., Lagunes, I. y Trigos, Á. Cosmetic dyes as potential photosensitizers of singlet oxygen generation. *Dye. Pigment.* **176**, 1-7 (2020).
74. Thapa, B., Munk, B. H., Burrows, C. J. y Schlegel, H. B. Computational study of oxidation of guanine by singlet oxygen ($^1\Delta_g$) and formation of guanine: lysine cross-links. *Chem. A Eur. J.* **23**, 5804-5813 (2017).
75. Bacellar, I. O. L. y col. Photosensitized membrane permeabilization requires contact-dependent reactions between photosensitizer and lipids. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 9606-9615 (2018).
76. Bacellar, I. O. L., Tsubone, T. M., Pavani, C. y Baptista, M. S. Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 20523-20559 (2015).
77. Wang, H. P. y col. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase protects against singlet oxygen-induced cell damage of photodynamic therapy. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 825-835 (2001).
78. Baptista, S. y col. Type I and type II photosensitized oxidation reactions: guidelines and mechanistic pathways. *Photochem. Photobiol.* **93**, 912-919 (2017).
79. Barrera, G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol.* **2012**, 1-21 (2012).
80. Usui, Y. Determination of quantum yield of singlet oxygen formation by photosensitization. *Chem. Lett.* 743-744 (1973).
81. Lutkus, L. V, Rickenbach, S. S. y McCormick, T. M. Singlet oxygen quantum yields determined by oxygen consumption. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **378**, 131-135 (2019).
82. Krajczewski, J., Rucińska, K., Townley, H. E. y Kudelski, A. Role of various nanoparticles in photodynamic therapy and detection methods of singlet oxygen. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **26**, 162-178 (2019).
83. Pibiri, I., Buscemi, S., Piccionello, A. P. y Pace, A. Photochemically produced singlet oxygen: applications and perspectives. *ChemPhotoChem Rev.* **2**, 535-547 (2018).

84. Gerola, A. P. y col. Chemical determination of singlet oxygen from photosensitizers illuminated with LED: new calculation methodology considering the influence of photobleaching. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **232**, 14-21 (2012).
85. Fujimura, T. y col. Stabilization of cationic zinc phthalocyanine monomers by adsorption on clay nanosheet colloid and photogeneration of singlet oxygen. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **390**, 1-5 (2020).
86. Dilber, G., Durmuş, M. y Kantekin, H. Non-aggregated zwitterionic zinc(II) phthalocyanine complexes in water with high singlet oxygen quantum yield. *Dye. Pigment.* **160**, 267-284 (2019).
87. Khan, S. y col. Photoinactivation of multidrug resistant bacteria by monomeric methylene blue conjugated gold nanoparticles. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **174**, 150-161 (2017).
88. Al-Nu'airat, J. y col. Reaction of phenol with singlet oxygen. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **21**, 171-183 (2019).
89. Vara, J., Gualdesi, M. S., Bertolotti, S. G. y Ortiz, C. S. Two phenothiazine dyes as photosensitizers for the production of singlet oxygen. Photophysics, photochemistry and effects of aggregation. *J. Mol. Struct.* **1181**, 1-7 (2019).
90. Vinklársek, I. S., Scholz, M., Dedic, R. y Hála, J. Singlet oxygen feedback delayed fluorescence of protoporphyrin IX in organic solutions. *Photochem. Photobiol. Sci.* **16**, 507-518 (2017).
91. Oelckers, S., Hanke, T. y Röder, B. Quenching of singlet oxygen in dimethylformamide. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **132**, 29-32 (2000).
92. Wilkinson, F., Helman, W. P. y Ross, A. B. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **24**, 663-1021 (1995).
93. Agrachev, M. y col. Understanding and controlling the efficiency of Au₂₄M(SR)₁₈ nanoclusters as singlet-oxygen photosensitizers. *Chem. Sci.* **11**, 3427-3440 (2020).
94. Fatima, K., Masood, N. y Luqman, S. Quenching of singlet oxygen by natural and synthetic antioxidants and assessment of electronic UV/Visible absorption spectra for alleviating or enhancing the efficacy of photodynamic therapy. *Biomed. Res. Ther.* **3**, 514-527 (2016).
95. Cagan, D. A. y col. Chemistry of singlet oxygen with a cadmium-sulfur cluster: physical

- quenching versus photooxidation. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 67-71 (2019).
96. Schweitzer, C. y Schmidt, R. Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chem. Rev.* **103**, 1685-1757 (2003).
 97. Klaper, M., Fudickar, W. y Linker, T. The role of distance in singlet oxygen applications: a model system. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 7024-7029 (2016).
 98. Ramel, F. y col. Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. *Plant Physiol.* **158**, 1267-1278 (2012).
 99. Barrios, B., Mohrhardt, B., Doskey, P. V. y Minakata, D. Mechanistic insight into the reactivities of aqueous-phase singlet oxygen with organic compounds. *Environ. Sci. Technol.* **55**, 8054-8067 (2021).
 100. Foti, M. C., Amorati, R., Baschieri, A. y Rocco, C. Singlet oxygen quenching- and chain-breaking antioxidant-properties of a quercetin dimer able to prevent age-related macular degeneration. *Biophys. Chem.* **243**, 17-23 (2018).
 101. Oliveira, M. S. y col. Quenching of singlet molecular oxygen, $O_2(^1\Delta_g)$, by dipyridamole and derivatives. *Photochem. Photobiol.* **83**, 1379-1385 (2007).
 102. Darmanyan, A. P., Jenks, W. S. y Jardon, P. Charge-transfer quenching of singlet oxygen $O_2(^1\Delta_g)$ by amines and aromatic hydrocarbons. *J. Phys. Chem. A* **102**, 7420-7426 (1998).
 103. Young, R. H. y col. On the mechanism of quenching by amines: a new method for investigation of interactions with triplet states. *Can. J. Chem.* **52**, 2889-2893 (1974).
 104. Bayer, P., Pérez-Ruiz, R. y Jacobi von Wangelin, A. Stereoselective photooxidations by the schenck ene reaction. *ChemPhotoChem* **2**, 559-570 (2018).
 105. Gambetta, C., Natera, J., Massad, W. A. y García, N. A. Methyl anthranilate as generator and quencher of reactive oxygen species: a photochemical study. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **269**, 27-33 (2013).
 106. Alvarez, M. G., Montes de Oca, M. N., Milanesio, M. E., Ortiz, C. S. y Durantini, E. N. Photodynamic properties and photoinactivation of *Candida albicans* mediated by brominated derivatives of triarylmethane and phenothiazinium dyes. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **11**, 148-155 (2014).
 107. Lei, W. y col. Ratiometric fluorescence sensing of bacterial lipopolysaccharide by a simple combination of a cationic dye and an anionic dye. *Sensors Actuators B Chem.* **166-167**, 853-858 (2012).
 108. Wu, H., Song, Q., Ran, G., Lu, X. y Xu, B. Recent developments in the detection of singlet

- oxygen with molecular spectroscopic methods. *Trends Anal. Chem.* **30**, 133-141 (2011).
109. Martinez, G. R. y col. Synthesis of a hydrophilic and non-ionic anthracene derivative, the *N,N*-di-(2,3-dihydroxypropyl)-9,10-anthracenedipropanamide as a chemical trap for singlet molecular oxygen detection in biological systems. *Tetrahedron.* **62**, 10762-10770 (2006).
110. Nardello, V. y Aubry, J. M. Synthesis and properties of a new cationic water-soluble trap of singlet molecular oxygen. *Tetrahedron Lett.* **38**, 7361-7364 (1997).
111. Lim, C. K. y col. Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer. *Cancer Lett.* **334**, 176-187 (2013).
112. Ogunsipe, A. y Nyokong, T. Photophysical and photochemical studies of sulphonated non-transition metal phthalocyanines in aqueous and non-aqueous media. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **173**, 211-220 (2005).
113. Baigorria, E. y col. Amphiphilic tricationic Zn(II)phthalocyanine provides effective photodynamic action to eradicate broad-spectrum microorganisms. *Photochem. Photobiol. Sci.* **20**, 939-953 (2021).
114. Kostka, M. y col. Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **178**, 16-25 (2006).
115. Dakiky, M. y Nemcova, I. Aggregation of *o,o'*-dihydroxyazo dyes - 1. Concentration, temperature, and solvent effect. *Dye. Pigment.* **40**, 141-150 (1999).
116. Lee, J. M. y col. Synergistic effects of photoinduced electron transfer and heavy atom effect based on BODIPY for efficient triplet photosensitizers. *Dye. Pigment.* **196**, 1-9 (2021).
117. Gan, S. y col. Heavy atom effect of bromine significantly enhances exciton utilization of delayed fluorescence luminogens. *Appl. Mater. Interfaces* **10**, 17327-17334 (2018).
118. Montes de Oca, M. N., Vara, J., Milla, L., Rivarola, V. y Ortiz, C. S. Physicochemical properties and photodynamic activity of novel derivatives of triarylmethane and thiazine. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **346**, 255-265 (2013).
119. Lai, Y. C., Su, S. Y. y Chang, C. C. Special reactive oxygen species generation by a highly photostable BODIPY-based photosensitizer for selective photodynamic therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **5**, 12935-12943 (2013).
120. Yogo, T., Urano, Y., Ishitsuka, Y., Maniwa, F. y Nagano, T. Highly efficient and

photostable photosensitizer based on BODIPY chromophore. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 12162-12163 (2005).

CAPÍTULO 4

ESTUDIOS DE AGREGACIÓN



ESTUDIOS DE AGREGACIÓN

4.1. INTRODUCCIÓN

La agregación que experimentan los compuestos químicos implica la asociación entre moléculas individuales (monómeros), cuyo ensamble, conduce a la formación de dímeros y agregados de orden superior. Estos eventos tienen lugar cuando las interacciones intermoleculares son energéticamente más favorables que aquellas entre las moléculas del compuesto y el solvente. Este fenómeno puede involucrar la interacción entre dos o más moléculas de diferentes sustratos (hetero-agregación), no obstante la mayoría de los ejemplos estudiados implican la autoagregación ¹.

La teoría del excitón molecular relativa al acoplamiento dipolo-dipolo es una de las herramientas que permite explicar la formación de los diferentes tipos de agregados moleculares. Según este modelo los agregados paralelos (agregados H) exhiben una banda de absorción a longitudes de onda más cortas que sus monómeros, mientras que los agregados de cabeza-cola (agregados J) presentan una banda de absorción a longitudes de onda mayores en relación con la especie monomérica (Figura 4.1) ²⁻⁴.

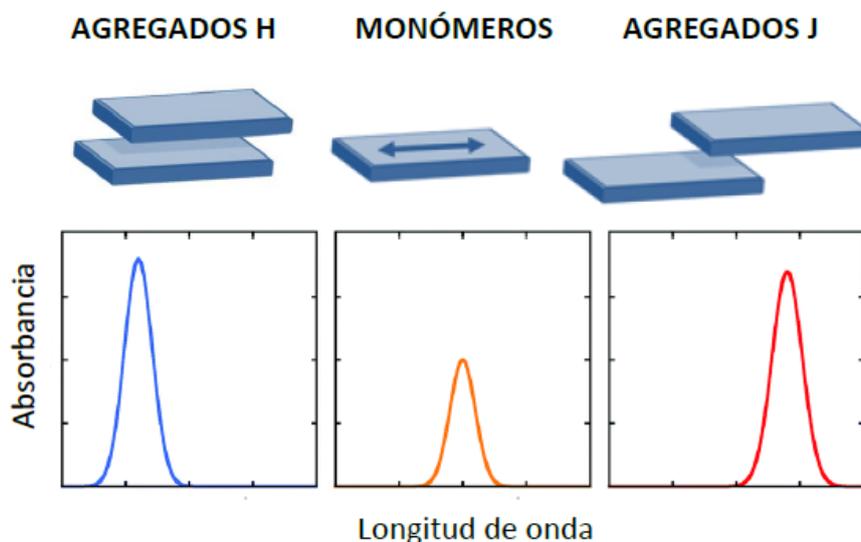


Figura 4.1: Formación de diferentes tipos de agregados moleculares.

Las moléculas agregadas se mantienen unidas por fuerzas de interacción débiles que pueden incluir enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones π - π , electrostáticas o hidrofóbicas dependiendo de las características estructurales de las mismas ^{5,6}.

La asociación molecular puede ser fuertemente afectada por varios parámetros tales como la estructura y concentración del compuesto, temperatura, fuerza iónica y naturaleza del solvente (orgánico, acuoso o mezclas de ambos) ^{7,8}.

Con relación a la estructura química es importante destacar que el fenómeno de agregación está asociado a la planaridad molecular. Claramente, cuanto mayor es ésta, más favorecidas están las interacciones de diferentes tipos las cuales provocan un aumento de la agregación ^{9,10}.

Los Fs fenotiazínicos son moléculas catiónicas compuestas por un sistema aromático tricíclico plano que actúa como cromóforo ¹¹⁻¹³. Los Fs TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂ pertenecen a esta familia siendo importante evaluar el fenómeno de agregación. Éste tiende a aumentar con el incremento de la fuerza iónica del medio o la concentración del compuesto ¹⁴. Por otro lado, el mismo disminuye con el aumento de la temperatura o la adición de solventes orgánicos ^{8,15,16}. Además, grupos del tipo sulfonato en la estructura del compuesto pueden disminuir la agregación, en tanto que las cadenas alquílicas producen un aumento debido al incremento de las interacciones hidrofóbicas en solución ^{6,17}.

El diseño de Fs que presenten un reducido comportamiento de agregación se logra mediante la inclusión de grupos químicos voluminosos y/o cargados causando una mayor repulsión intermolecular.

Las moléculas que conforman el agregado no son impactadas por la luz incidente por lo tanto, la fotosensibilización es solo posible en la superficie siendo menor la transferencia de energía al oxígeno ^{18,19}.

Por otro lado se podría esperar que las especies monoméricas, a diferencia de los agregados, interaccionen con las biomoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, entre otras) de forma más efectiva como consecuencia del menor volumen que presentan ²⁰⁻²².

En TFD y TFDA se requiere una concentración adecuada del Fs en el sitio de acción para producir daño a nivel celular. La formación de agregados podría alterar significativamente la actividad biológica siendo las especies monoméricas más fotoactivas ^{6,23}. La presencia de los agregados juega un papel importante en procesos químicos y biológicos.

La agregación de compuestos fenotiazínicos es un fenómeno conocido y numerosos investigadores han reportado datos espectrales, en particular de MB en solución acuosa²⁴⁻²⁶. Los antecedentes bibliográficos sugieren para los derivados fenotiazínicos, la formación de dímeros y agregados de orden superior^{6,27,28}.

Numerosos reportes indican que la presencia de agregados en diferentes medios produce cambios significativos en los espectros de absorción y de emisión, impactando en la respuesta fotoquímica, ya que este fenómeno provoca una disminución en los rendimientos cuánticos de formación de los estados excitados y en consecuencia una menor generación de las diferentes EROs²⁹⁻³².

Se ha encontrado que estudios de agregación relativos a compuestos fenotiazínicos, principalmente Th y MB, indican que los resultados obtenidos pueden ser inconsistentes y contradictorios¹⁷. Por ejemplo, el máximo de absorción en solución acuosa para la especie monomérica de MB y Th se asignan a $\lambda = 664$ nm y $\lambda = 600$ nm respectivamente. Estos ensayos destacan que la forma monomérica está presente en soluciones acuosas a altas concentraciones del Fs^{33,34}. Otros investigadores señalan que la agregación está favorecida en medios acuosos ya que los Fs tiazínicos evidencian este fenómeno principalmente debido al carácter hidrofóbico de la estructura molecular^{8,35,36}. En nuestro grupo de investigación se corroboró el último comportamiento descrito a partir de diferentes estudios de agregación realizados en distintos medios⁶.

Por otra parte, en la actualidad se dispone de información relativa a la agregación de compuestos fenotiazínicos en solventes monomerizantes y a bajas concentraciones del Fs. Estos estudios permitieron identificar inequívocamente a la especie monomérica de Th, MB, AzB y de otras familias de Fs como azinas, oxazinas y oxazonas^{6,30,37}.

Teniendo presente la importancia del estado de agregación de los Fs para su aplicación en TFD y TFDA, se desarrollaron estudios de agregación de TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂ en diferentes medios y en función de la concentración de Fs con el objetivo de identificar las especies predominantes.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

TBO (Certificado Aldrich, N° CAS: 92-31-9, Lote 19804BA-472) se utilizó sin purificación previa, mientras que TBOBr₂ y AzCBr₂ fueron sintetizados y purificados mediante las metodologías

antes descritas (capítulo 2, sección 2.3). La pureza de estos Fs fue corroborada por HPLC utilizando un cromatógrafo líquido Agilent 1100 Series, una columna Phenomenex Gemini C18 110A de fase reversa (25 cm de longitud y 5 μm de tamaño de partícula) y como FM MeOH:TEAP 83 mM 60:40 v/v. Se inyectaron volúmenes de muestra de 20 μL a 25°C y una velocidad de flujo de 0,8 mL/min. La adquisición de los datos cromatográficos se realizó mediante el software Agilent ChemStation (Rev. B.03.01).

Los estudios de agregación se desarrollaron en *N,N*-dimetilformamida (DMF), metanol (MeOH) y etanol (EtOH) de grado Pro-Análisis (Cicarelli, Sintorgan, Anedra y BioPack). Se utilizó agua ultrapura del sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore Corporation, EEUU) para la preparación de las soluciones acuosas y las mezclas DMF:H₂O y EtOH:H₂O.

A partir de la solución madre correspondiente a cada Fs (0,4 mg/2 mL), se prepararon diferentes diluciones para obtener concentraciones en el rango de 1,31 μM -59,0 μM para TBO y 4,65 μM -233 μM para TBOBr₂. También se analizó el comportamiento en mezclas DMF:H₂O y EtOH:H₂O a una concentración fija de Fs (TBO= 1,31 $\times 10^{-5}$ M; TBOBr₂= 4,67 $\times 10^{-5}$ M y AzCBr₂= 1,99 $\times 10^{-4}$ M) en proporciones de 0 % a 85 % H₂O. Todos los ensayos se realizaron por duplicado empleando un espectrofotómetro Varian Cary 50. Las curvas espectrales se analizaron utilizando el programa OriginPro 8 SRO (OriginLab Corporation).

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Evaluación de TBO y TBOBr₂ en *N,N*-dimetilformamida

Los espectros de absorción correspondientes a diferentes concentraciones de TBO en DMF (Figura 4.2.A) presentan dos bandas a 514 nm y 637 nm. Los datos bibliográficos indican que las especies monoméricas de estos compuestos absorben aproximadamente a 500 nm, lo cual permite señalar que la banda a 514 nm correspondería a la especie monomérica de TBO⁶. Por otra parte, los monómeros de otras familias de Fs tales como azinas y oxazinas presentan máximos de absorción entre 470-480 nm^{30,37}. También es ampliamente conocido que DMF es un solvente que favorece la presencia de las especies monoméricas³⁸⁻⁴¹.

El análisis del espectro de absorción normalizado de TBO (Figura 4.2.B) permite observar un equilibrio entre monómeros y agregados con el incremento de la banda a 637 nm en función de la concentración del Fs, la cual correspondería a la especie agregada. Por lo expuesto es

importante destacar que a bajas concentraciones predomina la especie monomérica y a concentraciones superiores a 20 μM , la forma agregada.

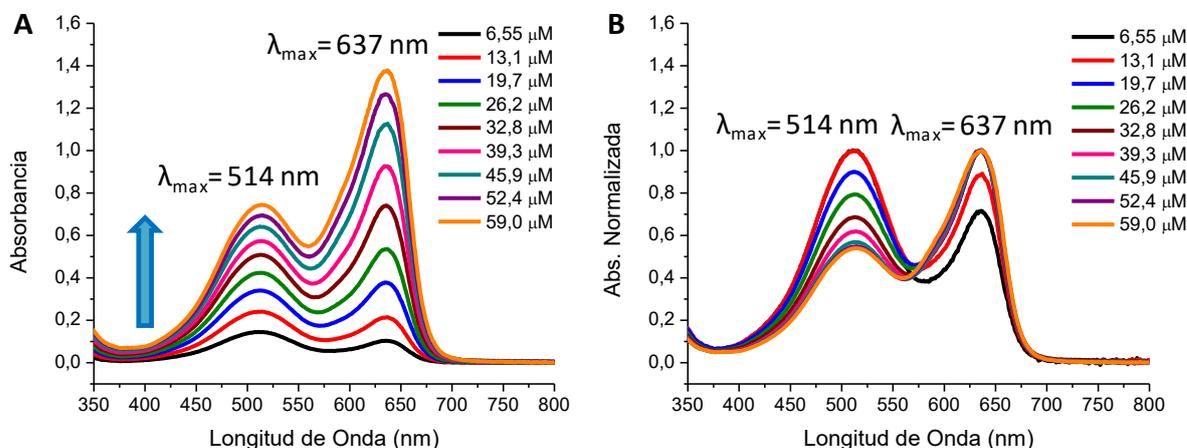


Figura 4.2: (A) Espectros de absorción de TBO en DMF en función de la concentración (6,55 μM -59,0 μM). (B) Espectros de absorción normalizados a las longitudes de onda de máxima absorción.

Las especies monoméricas están presentes cuando las fuerzas que favorecen la solvatación son más intensas que las interacciones Fs-Fs^{1,6,42}. La estructura de TBO presenta un grupo amino primario cuyos átomos de hidrógeno podrían interactuar con las moléculas del disolvente, DMF en este caso⁴³⁻⁴⁶. Esta experiencia permitió identificar la banda atribuible a la forma monomérica del Fs ($\lambda_{\text{max}} = 514 \text{ nm}$).

Algunos estudios referidos al comportamiento de TBO asignan la banda de absorción a 631 nm como correspondiente a la especie monomérica^{26,47-51}. Sin embargo, en estas investigaciones TBO no fue evaluado en solventes monomerizantes, tales como DMF y DMSO y en todos los casos se ensayaron concentraciones del Fs mayores a las estudiadas en esta Tesis Doctoral. Los estudios se desarrollaron en soluciones acuosas de polielectrólitos⁵², surfactantes^{48,50,51,53}, biopolímeros⁵⁴, albumina sérica humana⁴⁷, materia orgánica natural⁴⁹, suspensiones bacterianas²⁶ y encapsulado en nanopartículas⁵⁵. Por lo expuesto, el análisis de TBO a diferentes concentraciones del Fs en un solvente monomerizante, en este caso DMF, permitió identificar la banda de absorción atribuible a la especie monomérica a 514 nm y la correspondiente al agregado a 637 nm.

Por otra parte, los espectros de absorción de TBOBr_2 en DMF en función de la concentración (Figura 4.3.A) evidencian una única banda a 485 nm asignada a la especie monomérica.

Los espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción (Figura 4.3.B) permiten corroborar la presencia del monómero observando a todas las concentraciones ensayadas, una única banda espectral.

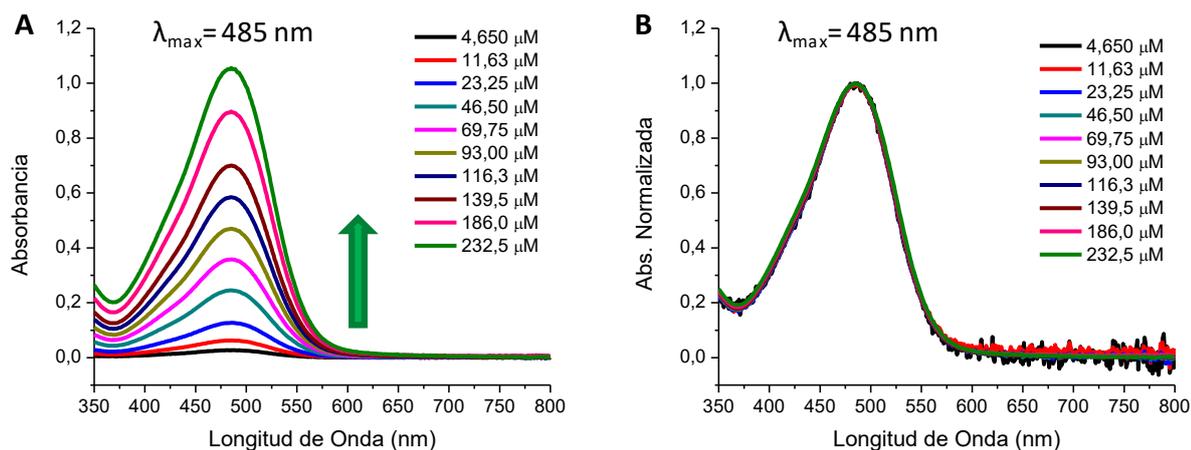


Figura 4.3: (A) Espectros de absorción de TBOBr_2 en DMF en función de la concentración (4,65 μM -233 μM). (B) Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción de TBOBr_2 .

Antecedentes bibliográficos señalan que la agregación de diversos compuestos fotoactivables puede disminuir en solventes orgánicos mediante la sustitución periférica del Fs por largas cadenas alquílicas o sustituyentes voluminosos^{19,30,37,56}. Del mismo modo se conoce que DMF podría desestabilizar la forma agregada de los Fs por la ruptura de los enlaces puente hidrógeno intermoleculares⁴¹.

El estudio del comportamiento de agregación en DMF permitió identificar la presencia de la especie monomérica de TBO y corroborar para TBOBr_2 que la bromación estabiliza el monómero y evita la formación de agregados.

4.3.2. Evaluación de TBO y TBOBr_2 en metanol

Los espectros de absorción en función de la concentración de TBO en MeOH, solvente orgánico menos monomerizante que DMF, se muestran en la Figura 4.4.A. Generalmente las

desviaciones de la ley de Lambert-Beer en compuestos orgánicos se atribuyen al fenómeno de agregación y esto se ha observado para rangos de concentración en el orden de 10^{-6} M a 10^{-4} M^{42,57-59}. En el caso de TBO las concentraciones evaluadas cumplen con la ley Lambert-Beer evidenciando la presencia de una única especie del Fs a la $\lambda_{\max} = 625$ nm. El rango de concentraciones ensayadas permitió identificar la especie agregada de TBO a 625 nm y establecer que el desplazamiento de las bandas de absorción en MeOH, a mayores longitudes de onda, corresponde a agregados J por comparación con la forma monomérica descrita en DMF (sección 4.3.1)⁶⁰⁻⁶³.

Los espectros de absorción normalizados a 625 nm (Figura 4.4.B) muestran que el agregado J es la única especie presente en MeOH.

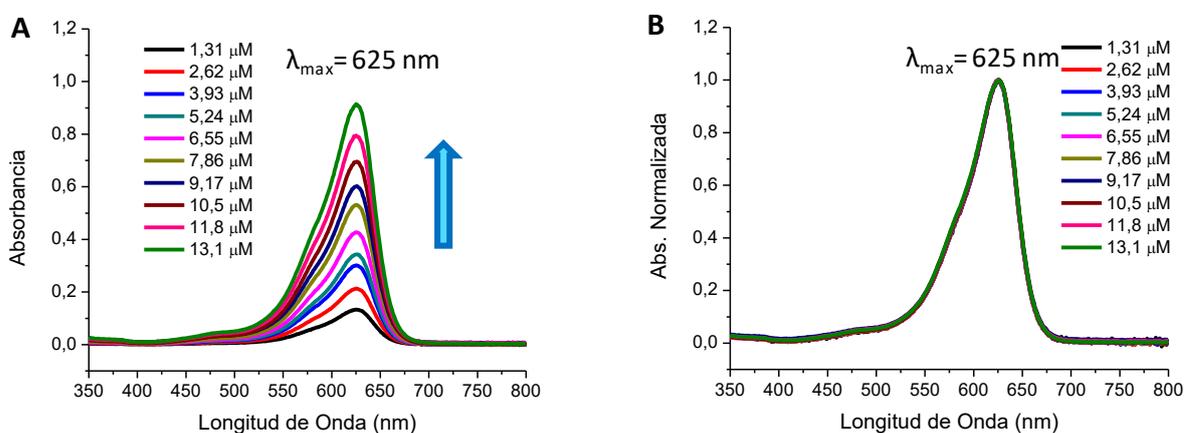


Figura 4.4: (A) Espectros de absorción de TBO en función de la concentración (1,31 μ M-13,1 μ M) en MeOH. (B) Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción de TBO.

Por otra parte, los espectros de absorción de TBOBr₂ en MeOH (Figura 4.5.A y 4.5.B) evidenciaron una única banda correspondiente a la especie monomérica ($\lambda_{\max} = 490$ nm). Los resultados obtenidos confirman que el solvente orgánico favorece la disrupción de las especies agregadas^{30,64-67}. Este efecto podría atribuirse al impedimento estérico causado por la incorporación, en la estructura de TBO, de dos sustituyentes voluminosos como los átomos de bromo dificultando las interacciones intermoleculares que estabilizan la forma agregada^{6,68-71}.

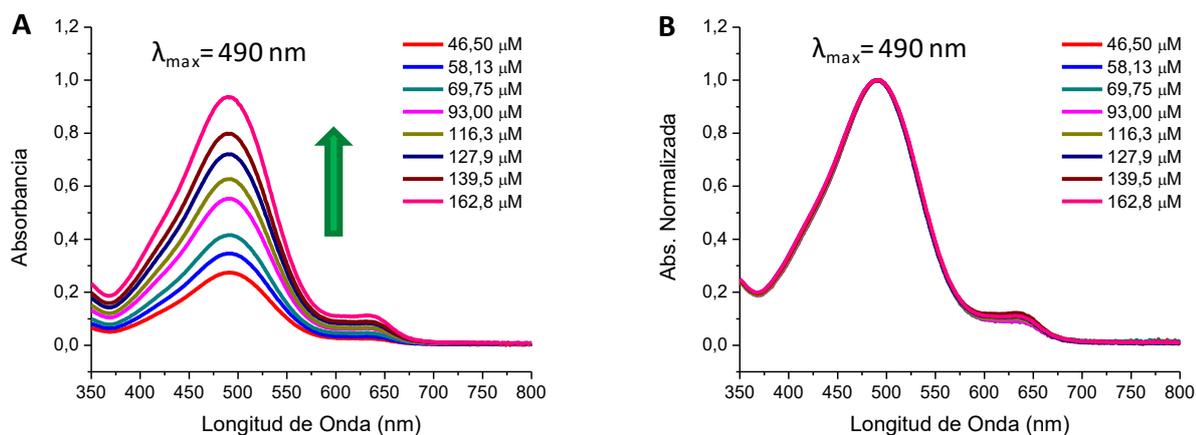


Figura 4.5: (A) Espectros de absorción de TBOBr₂ en función de la concentración (46,50 μM-162,8 μM) en MeOH. (B) Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción de TBOBr₂.

Los resultados obtenidos en función de la concentración del Fs en MeOH, indicaron que para TBO se estabiliza la especie agregada y para TBOBr₂ la forma monomérica.

4.3.3. Evaluación de TBO y TBOBr₂ en etanol

La evaluación de TBO en EtOH presenta resultados comparables a los obtenidos en MeOH (Figura 4.4). El espectro de absorción en función de la concentración de TBO (Figura 4.6.A) evidenció una banda a 628 nm que correspondería a la forma agregada. La representación gráfica normalizada a la longitud de onda de máxima absorción (Figura 4.6.B) muestra una única banda atribuible a la especie agregada de TBO a todas las concentraciones evaluadas. A diferencia de lo observado en MeOH, en este medio, una ampliación de los espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción entre 550 nm y 600 nm (Figura 4.6.C) evidenció que el aumento de la concentración de TBO ocasiona un incremento en los valores de absorbancia. Este comportamiento indica la formación de agregados de orden superior. Antecedentes bibliográficos señalan que los Fs fenotiazínicos siendo compuestos catiónicos tienden a agregarse en soluciones diluidas y conducen a la formación de dímeros e incluso agregados superiores^{37,72,73}.

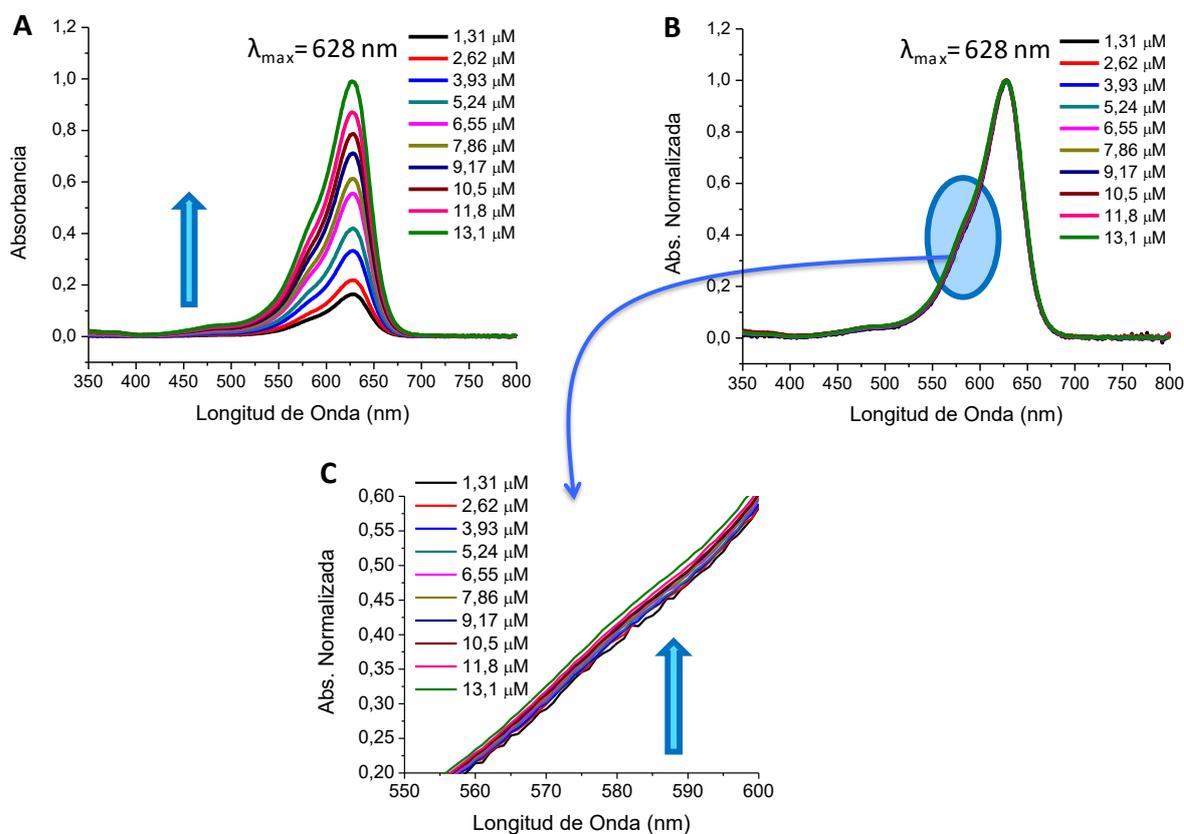


Figura 4.6: (A) Espectro de absorción de TBO en función de la concentración (1,31 μM -13,1 μM) en EtOH. (B) Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción. (C) Ampliación de los espectros de absorción normalizados (550 nm-600 nm).

Analizando los espectros de absorción y en base a los datos de literatura, el hombro entre 550 nm y 600 nm que se observa en la Figura 4.6.B, podría atribuirse a la formación de un agregado de orden mayor.

Es importante señalar que la banda asignada al agregado de orden superior ($\lambda_{\text{max}} \approx 580 \text{ nm}$) se observó entre las bandas correspondientes a la especie monomérica ($\lambda_{\text{max}} = 514 \text{ nm}$, Figura 4.2) y a la forma agregada ($\lambda_{\text{max}} = 628 \text{ nm}$). En el caso particular de TBO se detectó un desplazamiento batocrómico del agregado de orden superior en comparación con la banda monomérica e hipsocrómico con relación a la correspondiente al agregado. La mayoría de los Fs que experimentan agregación en solución presentan una tendencia entre éste fenómeno y el cambio espectral dependiendo de la orientación de las moléculas^{74,75}.

Este efecto determina que algunos compuestos formen diferentes tetrámeros (ensambles tipo ladrillo, lineal o escalera) con desplazamientos hacia el rojo o azul del espectro

electromagnético con relación a los correspondientes agregados de menor orden (dímeros y/o trímeros) y la especie monomérica^{6,76}.

En el caso de TBOBr₂ se evidenció una única banda a 489 nm en los espectros de absorción en función de la concentración del Fs en EtOH (Figura 4.7.A), lo que indicaría la presencia de la especie monomérica. La Figura 4.7.B muestra una banda superponible en todo el rango de concentraciones ensayadas confirmando el predominio de la especie monomérica.

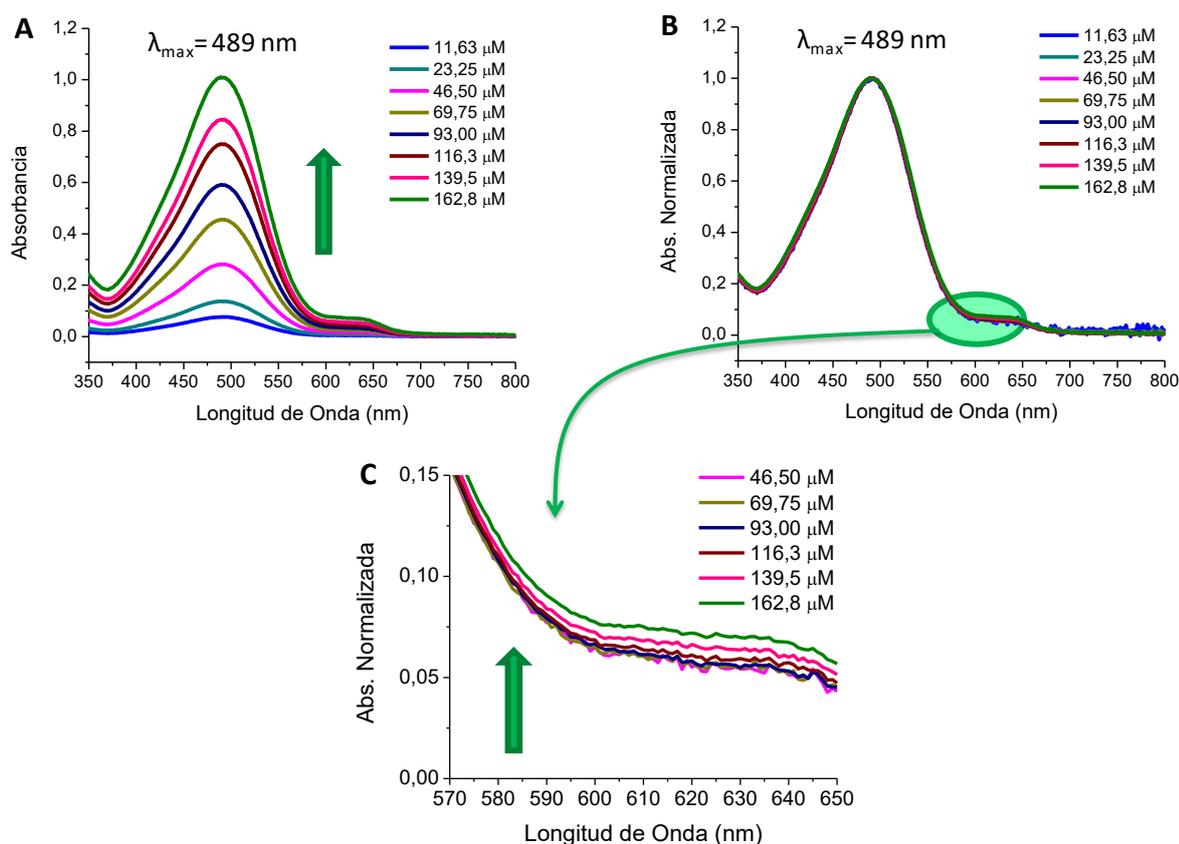


Figura 4.7: (A) Espectro de absorción de TBOBr₂ en función de la concentración (11,63 μM-162,8 μM) en EtOH. (B) Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción. (C) Ampliación de los espectros de absorción normalizados (570 nm-650 nm).

Los resultados obtenidos concuerdan con estudios previos los cuales señalan que la introducción de átomos pesados favorecería la presencia de la especie monomérica en medios orgánicos^{6,69,77,78}. La Figura 4.7.C evidenció un aumento de la absorción con el incremento de la concentración de TBOBr₂, entre 570 nm y 650 nm, lo que podría atribuirse a la formación de la especie agregada correspondiente al nuevo derivado dibromado.

4.3.4. Evaluación de TBO y TBOBr₂ en mezclas N,N-dimetilformamida:agua

Considerando que en medio acuoso se favorece la presencia de las especies agregadas de los Fs fenotiazínicos^{6,79-81}, y de otras familias tales como azinas^{30,82}, oxazinas y oxazonas^{37,83}, ftalocianinas⁸⁴ y porfirinas⁸⁵, se estudió a una concentración fija de TBO y TBOBr₂, el comportamiento de estos Fs en diferentes mezclas DMF:H₂O. El espectro de absorción de TBO a la concentración constante de $1,31 \times 10^{-5}$ M (Figura 4.8.A) evidenció que el aumento de la proporción de agua disminuye la banda correspondiente al monómero (514 nm) e incrementa aquella atribuible a la especie agregada (637 nm). También se observó un punto isobéptico aproximadamente a 550 nm lo que indicó un equilibrio entre las especies monomérica y agregada del Fs⁸⁶⁻⁸⁸.

Los espectros de absorción correspondientes a TBOBr₂ registrados a una concentración fija de $9,34 \times 10^{-5}$ M (Figura 4.8.B) y diferentes proporciones DMF:H₂O muestran la señal de absorción atribuible al monómero (495 nm) y la presencia de una banda a 647 nm la cual no se evidenció en los ensayos realizados en MeOH (Figura 4.5) y EtOH (Figura 4.7).

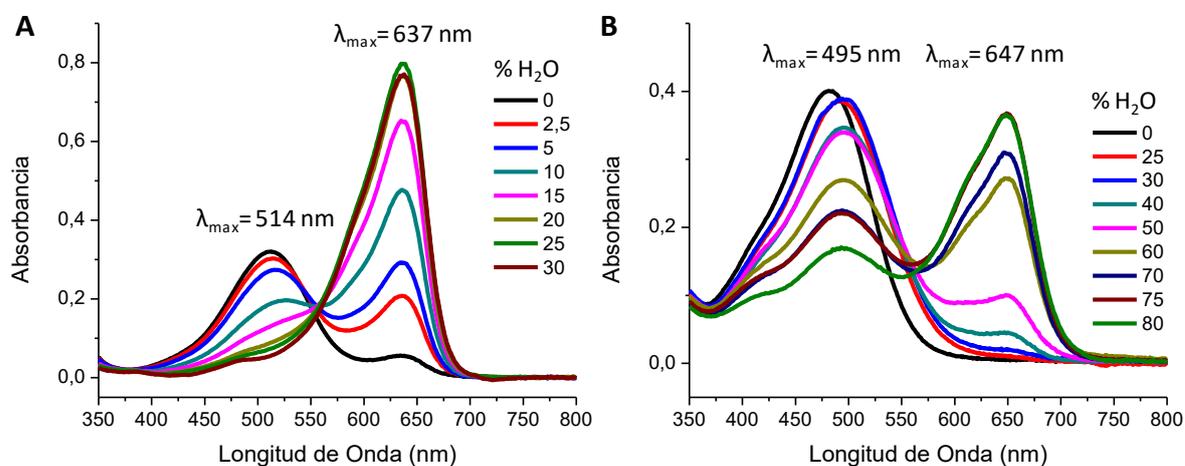


Figura 4.8: (A) Espectro de absorción de TBO= $1,31 \times 10^{-5}$ M en diferentes mezclas DMF:H₂O (0% a 30% H₂O). (B) Espectro de absorción de TBOBr₂= $9,34 \times 10^{-5}$ M en distintas mezclas DMF:H₂O (0% a 80% H₂O).

Cabe señalar que con el incremento del porcentaje de H₂O se observó un aumento significativo de la absorbancia a 647 nm, que se asignó a la forma agregada de TBOBr₂. Adicionalmente se puede observar la ausencia de un punto isobéptico indicativo de la

presencia de más de dos especies (monómero, agregado J y agregados de orden superior). Antecedentes bibliográficos indican que los compuestos lipofílicos presentan mayor tendencia a la agregación en soluciones acuosas^{6,56,89-92}. Esto se corroboró mediante la estimación de la lipofilicidad de TBO y TBOBr₂ aplicando los programas de computación ChemDraw Professional 17.1 (cLogP) y Molinspiration (libre acceso: www.molinspiration.com; ©Molinspiration Cheminformatics 2022; miLogP). Ambos *software* emplean para el cálculo de los coeficientes de partición teóricos (cLog P) aproximaciones por contribución de los distintos fragmentos de la molécula. El valor de Log P reportado en bibliografía para TBO es -0,30⁹³. Los parámetros de lipofilicidad de TBO y TBOBr₂ estimados computacionalmente se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Valores de cLog P estimados por software químicos.

Fs	Predicción de c Log P	
	ChemDraw Professional 17.1	Molinspiration
TBO	-1,44	-0,15
TBOBr ₂	0,37	1,32

Se determinó para TBOBr₂, con ambos programas, un valor de cLog P mayor en comparación con TBO, lo cual era esperable ya que la introducción de dos átomos de bromo incrementa la lipofilicidad y esto se manifiesta en la formación de agregados J y de orden mayor en soluciones acuosas (Figura 4.8.B).

4.3.5. Evaluación de TBOBr₂ en una mezcla N,N-dimetilformamida:agua 20:80 v/v

Con el objetivo de ampliar la información relativa al comportamiento de agregación de TBOBr₂ se lo estudió a la relación DMF:H₂O 20:80 v/v en función de la concentración (11,7 μM-58,4 μM) (Figura 4.9.A) evidenciando en todo el rango ensayado, un máximo de absorción a 647 nm que corresponde a la forma agregada del Fs. El predominio de esta especie se corroboró como una única banda en los espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción (Figura 4.9.B).

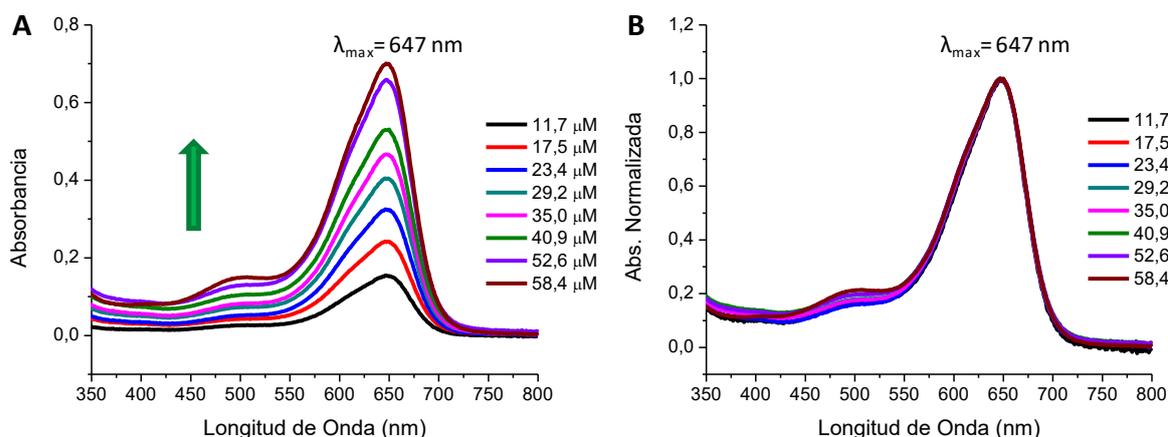


Figura 4.9: (A) Espectro de absorción de TBOBr₂ en función de la concentración (11,7 μM-58,4 μM) en DMF:H₂O 20:80 v/v. (B) Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción.

Los ensayos realizados permiten demostrar que el máximo de absorción correspondiente a la especie agregada del nuevo derivado dibromado experimenta un corrimiento batocrómico con relación al agregado de su precursor (TBO) ($\lambda_{\text{max}} \approx 637$ nm; Figura 4.8.A). Estos resultados concuerdan con los datos de bibliografía que indican que la introducción de átomos pesados en una estructura química, produce un corrimiento batocrómico de la longitud de onda de máxima absorción en comparación con su precursor sin halogenar⁹⁴⁻⁹⁶.

4.3.6. Evaluación de TBO y TBOBr₂ en mezclas etanol:agua

Con el objetivo de corroborar la formación de agregados de orden superior en medios acuosos, se evaluó el comportamiento de TBO y TBOBr₂, a una concentración fija, en mezclas EtOH: H₂O (0 % a 90 % H₂O) considerando que el EtOH es un solvente menos monomerizante que DMF.

Los espectros de absorción normalizados de TBO ($1,31 \times 10^{-5}$ M; Figura 4.10.A) evidenciaron el predominio de la especie agregada con una banda de absorción a 630 nm. También se observó la formación de agregados de orden superior al aumentar el porcentaje acuoso, mostrando un incremento de la absorción en el rango de 550 nm-600 nm.

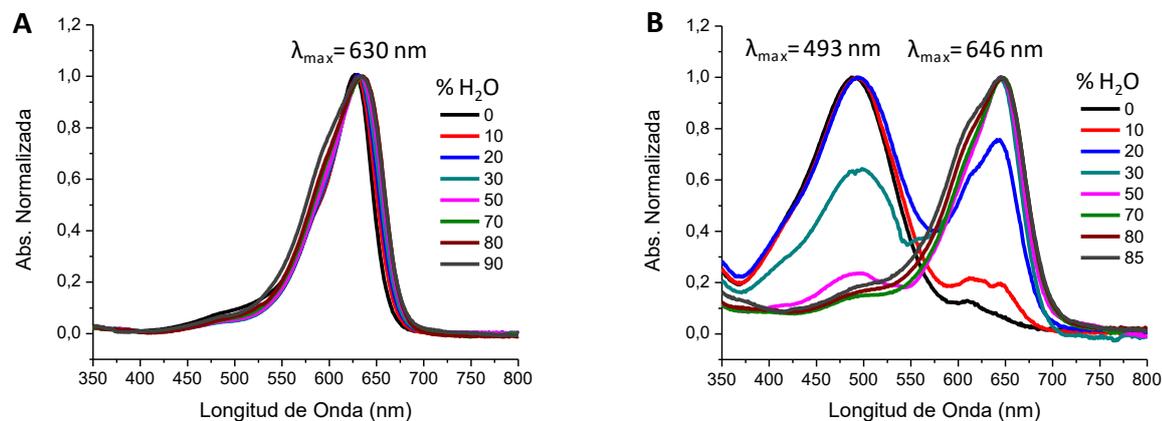


Figura 4.10: (A) Espectros de absorción normalizados de TBO= $1,31 \times 10^{-5} \text{ M}$ a la longitud de onda de máxima absorción en mezclas EtOH:H₂O (0% a 90% H₂O). (B) Espectros de absorción normalizados de TBOBr₂= $4,67 \times 10^{-5} \text{ M}$ a las longitudes de onda de máxima absorción en mezclas EtOH:H₂O (0% a 85% H₂O).

Los espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción correspondientes al nuevo derivado TBOBr₂ a la concentración de $4,67 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Figura 4.10.B), evidenciaron la presencia de la especie monomérica ($\lambda_{\text{max}} = 493 \text{ nm}$) tanto en 100 % de EtOH como así también en mezclas EtOH:H₂O con una proporción de 10 % y 20 % de H₂O. El aumento del porcentaje de agua (30 % a 85 %) señaló el predominio de la especie agregada de TBOBr₂ con una banda de absorción a 646 nm. También se observó de manera pronunciada la formación de agregados de orden superior con un incremento de la absorción entre 575 nm-625 nm.

4.3.7. Evaluación de TBO en agua

Considerando que TBO presenta buena solubilidad en H₂O, se estudió en este medio el fenómeno de agregación a diferentes concentraciones del Fs. Los resultados obtenidos en el rango de $1,31 \mu\text{M}$ a $13,1 \mu\text{M}$ (Figura 4.11.A) mostraron una única banda de absorción a 631 nm correspondiente a la especie agregada y un hombro entre 550 nm y 600 nm que aumenta con el incremento de la concentración del Fs. Los espectros de absorción normalizados a la

longitud de onda de máxima absorción (Figura 4.11.B y 4.11.C) corroboraron la formación de agregados de orden superior.

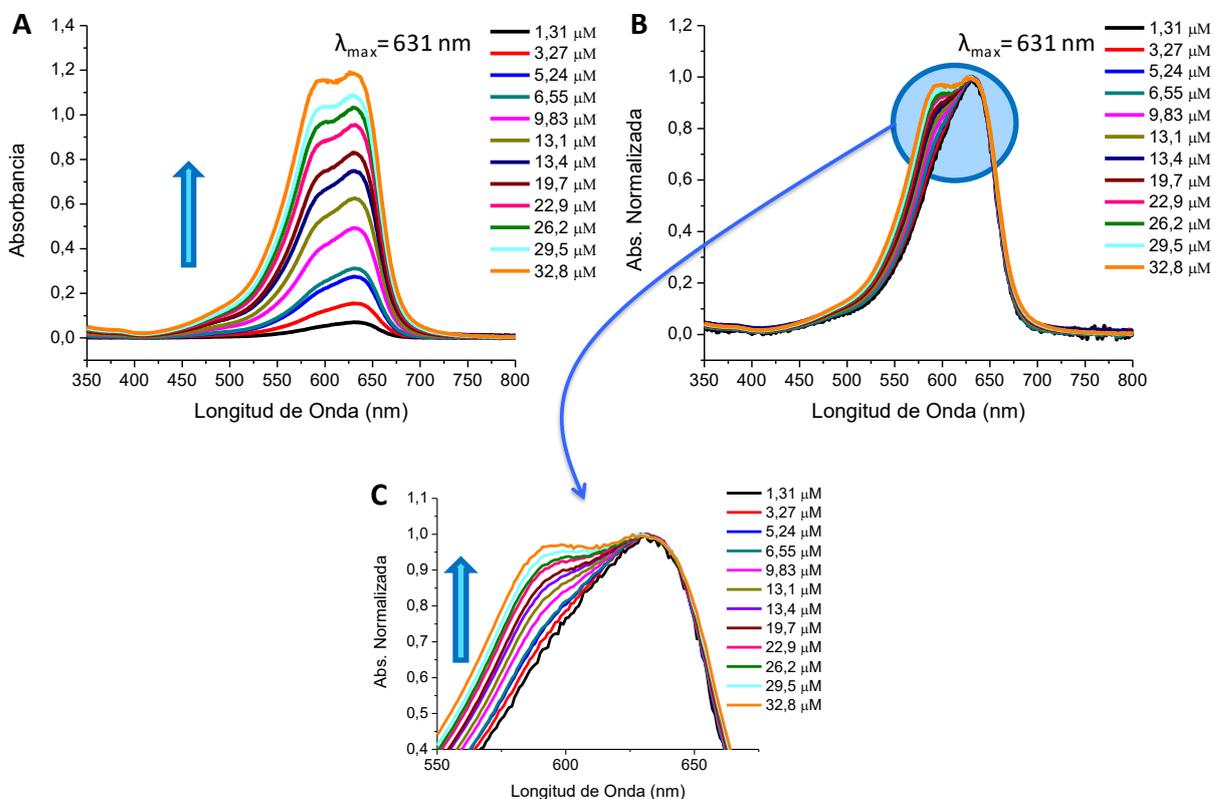


Figura 4.11: (A) Espectro de absorción de TBO en función de la concentración (1,31 μ M-32,8 μ M) en H₂O. (B) Espectros de absorción normalizados a la longitud de onda de máxima absorción. (C) Ampliación del espectro de absorción normalizado (550 nm-675 nm).

Este ensayo permitió demostrar que TBO se ajusta al comportamiento descrito en bibliografía, el cual establece que el incremento de la concentración del Fs conduce a la formación de diferentes tipos de agregados ^{1,97}.

4.3.8. Evaluación de AzCBr₂ en mezclas N,N-dimetilformamida:agua y etanol:agua

El abordaje del fenómeno de agregación que experimentó AzCBr₂ se desarrolló a una concentración constante (1,99 x 10⁻⁴ M) del Fs. Los espectros de absorción en función de la relación DMF:H₂O (0 % a 75 % H₂O) (Figura 4.12.A) evidenciaron la presencia del monómero con un máximo a 503 nm en DMF puro. La banda a 608 nm correspondería a la especie

agregada de AzCBr_2 . El análisis espectral indicó la ausencia de un punto isobéptico lo cual señala la presencia de tres especies, monómero, agregado y agregados de orden superior.

El análisis de los espectros de absorción normalizados a las longitudes de onda de máxima absorción (Figura 4.12.B) mostró la disminución de la banda monomérica a 503 nm y el incremento de la correspondiente a la especie agregada a 608 nm con el aumento del porcentaje de agua. También se observó a las proporciones 50 % y 75 % de H_2O , un incremento de la absorción en el rango de 550 nm a 600 nm lo que indicaría la presencia de agregados de orden superior. Los resultados demostraron que AzCBr_2 presentó un comportamiento de agregación comparable al de TBOBr_2 descrito en la sección 4.3.4.

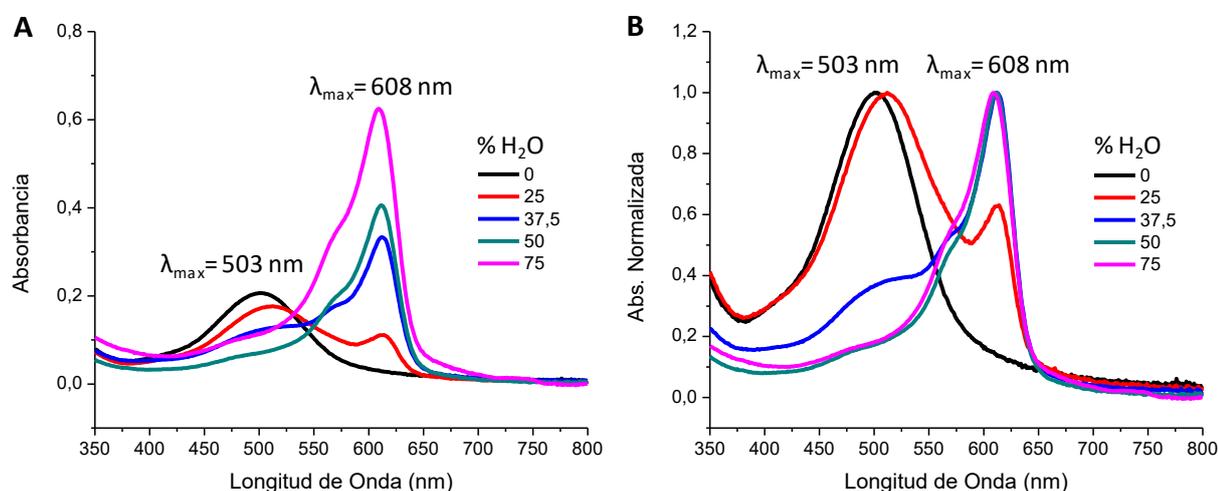


Figura 4.12: (A) Espectros de absorción de AzCBr_2 ($1,99 \times 10^{-4}$ M) en diferentes mezclas DMF: H_2O (0% a 75% H_2O). (B) Espectros de absorción normalizados de AzCBr_2 ($1,99 \times 10^{-4}$ M) a las longitudes de onda de máxima absorción en distintas mezclas DMF: H_2O (0% a 75% H_2O).

El ensayo de AzCBr_2 en mezclas $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (Figura 4.13.A), permitió evidenciar las mismas bandas de absorción y consecuentemente las especies descritas para DMF:H₂O (Figura 4.12). Las proporciones de H_2O , entre 0 % y 20 %, señalaron la presencia predominante de la especie monomérica a una $\lambda_{\text{max}} = 508$ nm. Al realizar los ensayos con porcentajes de H_2O entre 30 % y 70 % se observó un predominio de la especie agregada. El contenido acuoso de 75 % y 80 % mostró una disminución de la absorción a 608 nm (especie agregada) y un incremento de la absorción entre 550 nm y 600 nm debido a la formación de agregados de orden superior.

Los espectros de absorción normalizados a las longitudes de onda de máxima absorción en función de las relaciones EtOH:H₂O (Figura 4.13.B) corroboraron el comportamiento de agregación que presenta el compuesto AzCBr₂.

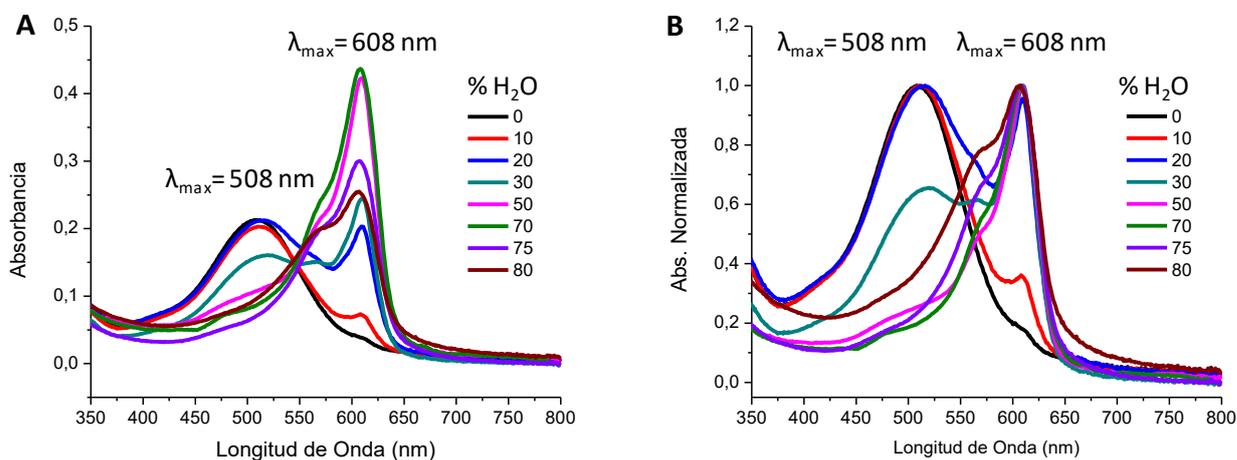


Figura 4.13: (A) Espectros de absorción de AzCBr₂ ($1,99 \times 10^{-4} \text{ M}$) en diferentes mezclas EtOH:H₂O (0% a 80% H₂O). (B) Espectros de absorción normalizados de AzCBr₂ ($1,99 \times 10^{-4} \text{ M}$) a las longitudes de onda de máxima absorción en distintas mezclas EtOH: H₂O (0% a 80% H₂O).

Los estudios de agregación permitieron inferir para ambos Fs dibromados, TBOBr₂ y AzCBr₂, que la presencia de las especies monoméricas se favorece en solventes orgánicos mientras que las agregadas y agregados de orden superior predominan en medios acuosos.

4.4. CONCLUSIONES PARCIALES

Los ensayos realizados en solventes orgánicos puros permitieron identificar las especies monoméricas de TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂.

El estudio de TBO en un solvente monomerizante (DMF) permitió establecer de manera inequívoca la especie monomérica con un máximo de absorción a 514 nm. El aumento de la concentración del Fs y el ensayo de otros medios orgánicos favorecieron la formación del agregado J con una absorción máxima a longitudes de onda superiores a 600 nm. Por otra parte, en soluciones acuosas, TBO presentó un equilibrio entre los agregados J (posibles dímeros) y agregados de orden superior.

La incorporación de átomos de bromo en la estructura de las fenotiazinas favoreció la presencia de la especie monomérica en todos los solventes orgánicos ensayados, mientras que, en soluciones acuosas TBOBr₂ y AzCBr₂ evidenciaron la formación de agregados J y de mayor orden.

El análisis en diferentes mezclas acuosas, a una concentración constante de TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂, indicó que el incremento del porcentaje acuoso favorece la formación de agregados de orden superior principalmente para los derivados dibromados.

Los estudios realizados en distintos solventes orgánicos, medios acuosos y proporciones orgánico-acuoso permitieron establecer la tendencia de agregación de los Fs. Diversos parámetros tales como la lipofilicidad, el efecto de los sustituyentes, las interacciones intermoleculares y la concentración de los Fs contribuyeron a la interpretación del comportamiento de agregación de estos compuestos pertenecientes a la familia de las tiazinas.

Finalmente se estableció que ambos Fs dibromados presentaron una tendencia de agregación similar en las condiciones ensayadas.

4.5. BIBLIOGRAFÍA

1. Bonnett, R. Chemical Aspects of Photodynamic Therapy. *Gordon and Breach Science Publishers*. 2000.
2. Anzola, M. y Painelli, A. Aggregates of polar dyes: beyond the exciton model. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **23**, 8282-8291 (2021).
3. Weight, B. M. y col. Coupling between emissive defects on carbon nanotubes: modeling insights. *J. Phys. Chem. Lett.* **12**, 7846-7853 (2021).
4. Sadigh, M. K. y Zakerhamidi, M. S. The roles of solute-solute and solute-solvent interactions on the nonlinearity of aqueous solutions of ionic dyes. *Zeitschrift für Naturforsch. A.* **73**, 785-794 (2018).
5. Fernández, B., Fernández, Z., Quiñoá, E. y Freire, F. From oligo(phenyleneethynylene) monomers to supramolecular helices: the role of intermolecular interactions in aggregation. *Molecules.* **26**, 1-14 (2021).
6. Vara, J. y Ortiz, C. S. Thiazine dyes: Evaluation of monomeric and aggregate forms. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **166**, 112-120 (2016).

7. Heyne, B. Self-assembly of organic dyes in supramolecular aggregates. *Photochem. Photobiol. Sci.* **15**, 1103-1114 (2016).
8. Gilani, A. G., Ghorbanpour, T. y Salmanpour, M. Additive effect on the dimer formation of thiazine dyes. *J. Mol. Liq.* **177**, 273-282 (2013).
9. Zhang, L. y Cole, J. M. Dye aggregation in dye-sensitized solar cells. *J. Mater. Chem. A.* **5**, 19541-19559 (2017).
10. Bujdák, J. The effects of layered nanoparticles and their properties on the molecular aggregation of organic dyes. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **35**, 108-133 (2018).
11. Ran, B. y col. Organic photo-antimicrobials: principles, molecule design, and applications. *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 17891-17909 (2021).
12. Alvarez, M. G., Montes de Oca, M. N., Milanesio, M. E., Ortiz, C. S. y Durantini, E. N. Photodynamic properties and photoinactivation of *Candida albicans* mediated by brominated derivatives of triarylmethane and phenothiazinium dyes. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **11**, 148-155 (2014).
13. Wainwright, M. y Giddens, R. M. Phenothiazinium photosensitisers: choices in synthesis and application. *Dye. Pigment.* **57**, 245-257 (2003).
14. Sadigh, M. K. y Zakerhamidi, M. S. Media polarity and concentration roles on the third order nonlinear behaviors of thiazine dyes. *Opt. Laser Technol.* **100**, 216-224 (2018).
15. Bricks, J. L., Slominskii, Y. L., Panas, I. D. y Demchenko, A. P. Fluorescent J-aggregates of cyanine dyes: basic research and applications review. *Methods Appl. Fluoresc.* **6**, 1-31 (2018).
16. Ghasemi, J. B. y Miladi, M. Association equilibrium of methylene blue by spectral titration and chemometrics analysis: a thermodynamic study. *J. Chinese Chem. Soc.* **56**, 459-468 (2009).
17. Antonov, L., Gergov, G., Petrov, V., Kubista, M. y Nygren, J. UV-Vis spectroscopic and chemometric study on the aggregation of ionic dyes in water. *Talanta.* **49**, 99-106 (1999).
18. Wainwright, M. y Mclean, A. Rational design of phenothiazinium derivatives and photoantimicrobial drug discovery. *Dye. Pigment.* **136**, 590-600 (2017).
19. Tillo, A. y col. Phthalocyanines with bulky substituents at non-peripheral positions - Synthesis and physico-chemical properties. *Dye. Pigment.* **127**, 110-115 (2016).

20. Tatikolov, A. S. Polymethine dyes as spectral-fluorescent probes for biomacromolecules. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **13**, 55-90 (2012).
21. Vara, J., Gualdesi, M. S., Bertolotti, S. G. y Ortiz, C. S. Two phenothiazine dyes as photosensitizers for the production of singlet oxygen. Photophysics, photochemistry and effects of aggregation. *J. Mol. Struct.* **1181**, 1-7 (2019).
22. Wainwright, M. Photosensitisers and Photosensitisation in Biomedicine. *John Wiley & Sons*. 2009.
23. Reis, T. A. y col. Combination of cyclodextrin complexation and iontophoresis as a promising strategy for the cutaneous delivery of aluminum-chloride phthalocyanine in photodynamic therapy. *Eur. J. Pharm. Sci.* **139**, 105056 (2019).
24. Rabinowitch, E. y Epstein, L. F. Polymerization of dyestuffs in solution. Thionine and methylene blue. *J. Am. Chem. Soc.* **63**, 69-78 (1941).
25. Mukerjee, P. y Ghosh, A. K. The "Isoextraction" method and the study of the self-association of methylene blue in aqueous solutions'. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 6403-6407 (1970).
26. Usacheva, M. N., Teichert, M. C. y Biel, M. A. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **71**, 87-98 (2003).
27. Gilani, A. G., Poormohammadi-Ahandani, Z. y Kian, R. Additive-induced aggregate changes of two structurally similar dyes in aqueous solutions: a comparative photophysical study. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **189**, 543-555 (2018).
28. Gilani, A. G., Tajalli, H. y Zakerhamidi, M. S. Photo-physical behavior of thiazine dyes with or without surfactants into poly-HEMA hydrophilic gel matrix. *J. Mol. Liq.* **143**, 81-88 (2008).
29. Dilber, G., Durmuş, M. y Kantekin, H. Non-aggregated zwitterionic zinc(II) phthalocyanine complexes in water with high singlet oxygen quantum yield. *Dye. Pigment.* **160**, 267-284 (2019).
30. Urrutia, M. N. y Ortiz, C. S. Spectroscopic characterization and aggregation of azine compounds in different media. *Chem. Phys.* **412**, 41-50 (2013).
31. Chang, C., Yang, Y. y Yang, J. Absorption and emission spectral shifts of rose bengal associated with DMPC liposomes. *Dye. Pigment.* **79**, 170-175 (2008).

32. Nyokong, T. Effects of substituents on the photochemical and photophysical properties of main group metal phthalocyanines. *Coord. Chem. Rev.* **251**, 1707-1722 (2007).
33. Adachi, K. y col. Controllable adsorption and ideal H-aggregation behaviors of phenothiazine dyes on the tungsten oxide nanocolloid surface. *Langmuir.* **26**, 117-125 (2010).
34. Patil, K., Pawar, R. y Talap, P. Self-aggregation of methylene blue in aqueous medium and aqueous solutions of Bu₄NBr and urea. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2**, 4313-4317 (2000).
35. Wang, W. y col. Enhanced photodynamic efficiency of methylene blue with controlled aggregation state in silica-methylene blue-acetate@tannic acid-iron (III) ions complexes. *Dye. Pigment.* **160**, 663-670 (2019).
36. Florence, N. y Naorem, H. Dimerization of methylene blue in aqueous and mixed aqueous organic solvent: a spectroscopic study. *J. Mol. Liq.* **198**, 255-258 (2014).
37. Urrutia, M. N. y Ortiz, C. S. Novel oxazine and oxazone dyes: aggregation behavior and physicochemical properties. *New J. Chem.* **40**, 10161-10171 (2016).
38. Baigorria, E. y col. Amphiphilic tricationic Zn(II)phthalocyanine provides effective photodynamic action to eradicate broad-spectrum microorganisms. *Photochem. Photobiol. Sci.* **20**, 939-953 (2021).
39. Şahin, S. y Açar, E. Synthesis, spectroscopic properties, thermal properties and aggregation behaviors of macrogol-substituted phthalocyanines. *J. Mol. Struct.* **1187**, 121-131 (2019).
40. Kostka, M. y col. Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **178**, 16-25 (2006).
41. Dakiky, M. y Nemcova, I. Aggregation of *o,o'*-dihydroxyazo dyes - 1. Concentration, temperature, and solvent effect. *Dye. Pigment.* **40**, 141-150 (1999).
42. Monahan, A. R. y Blossey, D. F. The aggregation of arylazonaphthols. I. Dimerization of bonadur red in aqueous and methanolic systems. *J. Phys. Chem.* **74**, 4014-4021 (1970).
43. Hushvaktov, H., Jumabaev, A., Doroshenko, I. y Absanov, A. Raman spectra and non-empirical calculations of dimethylformamide molecular clusters structure. *Vib. Spectrosc.* **117**, 1-8 (2021).
44. Ren, X. H. y Wang, H. J. Hydrogen-bonding interaction in a complex of amino acid with

- N,N*-dimethylformamide studied by DFT calculations. *J. Solution Chem.* **38**, 303-313 (2009).
45. Shan, Y. Y., Ren, X. H., Wang, H. J. y Dong, W. B. A theoretical study of the interactions between *N,N*-dimethylformamide and aromatic hydrocarbons. *Struct. Chem.* **18**, 709-716 (2007).
46. Alizadeh, K., Seyyedi, S., Shamsipur, M., Rouhani, S. y Haghbeen, K. Solvatochromism and temperature effects on the electronic absorption spectra of some azo dyes. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **74**, 691-694 (2009).
47. Singh, S. y col. Spectroscopic studies on the biomolecular recognition of toluidine blue: key information towards development of a non-contact, non-invasive device for oral cancer detection. *Front. Oncol.* **10**, 1-13 (2020).
48. Mall, C., Tiwari, S. y Solanki, P. P. Comparison of dye (oxazine and thiazine) materials as a photosensitizer for use in photogalvanic cells based on molecular interaction with sodium dodecyl sulphate by spectral study. *J. Saudi Chem. Soc.* **23**, 83-91 (2019).
49. Xie, X., Guo, H., Yan, M. y Korshin, G. Interactions between natural organic matter (NOM) and the cationic dye toluidine blue at varying pHs and ionic strengths: effects of NOM charges and Donnan gel potentials. *Chemosphere.* **236**, 1-9 (2019).
50. Liu, J., Zou, A. y Mu, B. Toluidine blue: aggregation properties and distribution behavior in surfactin micelle solution. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* **75**, 496-500 (2010).
51. Jebaramy, J., Ilanchelian, M. y Prabahal, S. Spectral studies of toluidine blue o in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Dig. J. Nanomater. Biostructures.* **4**, 789-797 (2009).
52. Fradj, A. Ben, Lafi, R., Gzara, L., Hamzaoui, A. H. y Hafiane, A. Spectrophotometric study of the interaction of toluidine blue with poly (ammonium acrylate). *J. Mol. Liq.* **194**, 110-114 (2014).
53. Chen, X. W., Huang, L. L. y Wang, J. H. Studies on the toluidine blue dimer as a fluorescence probe for protein assays. *Anal. Lett.* **40**, 3014-3024 (2007).
54. Usacheva, M. N., Teichert, M. C. y Biel, M. A. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. *Lasers Surg. Med.* **33**, 311-319 (2003).
55. Parasuraman, P. y col. Antimicrobial photodynamic activity of toluidine blue encapsulated in mesoporous silica nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Biofouling.* **35**, 89-103 (2019).

56. Zimcik, P. y col. Influence of aggregation on interaction of lipophilic, water-insoluble azaphthalocyanines with DOPC vesicles. *Photochem. Photobiol.* **83**, 1497-1504 (2007).
57. Şahin, S. y Ağar, E. A3B type unsymmetrical and amphiphilic phthalocyanines: synthesis, characterization, thermal stability and aggregation studies. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **227**, 1-7 (2020).
58. Isago, H. y Fujita, H. Solvent effects on molecular aggregation of highly water-soluble phthalocyanines. *J. Porphyrins Phthalocyanines.* **22**, 1-10 (2018).
59. Gilani, A. G., Moghadam, M., Hosseini, S. E. y Zakerhamidi, M. S. A comparative study on the aggregate formation of two oxazine dyes in aqueous and aqueous urea solutions. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **83**, 100-105 (2011).
60. Shapiro, B. I., Nekrasov, A. D., Krivobok, V. S. y Lebedev, V. S. Optical properties of molecular nanocrystals consisting of J-aggregates of anionic and cationic cyanine dyes. *Opt. Express.* **26**, 1-14 (2018).
61. Debnath, P. y col. Stability of J-aggregated species in an indocarbocyanine dye in Langmuir–Blodgett Films. *J. Lumin.* **179**, 287-296 (2016).
62. Kumar, V., Baker, G. A., Pandey, S., Baker, S. N. y Pandey, S. Contrasting behavior of classical salts versus ionic liquids toward aqueous phase J-aggregate dissociation of a cyanine dye. *Langmuir.* **27**, 12884-12890 (2011).
63. Valdes-Aguilera, O. y Neckers, D. C. Rose bengal ethyl ester aggregation in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* **92**, 4286-4289 (1988).
64. Terdale, S. y Tantray, A. Spectroscopic study of the dimerization of rhodamine 6G in water and different organic solvents. *J. Mol. Liq.* **225**, 662-671 (2017).
65. Arun, K. T., Epe, B. y Ramaiah, D. Aggregation behavior of halogenated squaraine dyes in buffer, electrolytes, organized media and DNA. *J. Phys. Chem. B.* **106**, 11622-11627 (2002).
66. Isak, S. J. y Eyring, E. M. Fluorescence quantum yield of cresyl violet in methanol and water as a function of concentration. *J. Phys. Chem.* **96**, 1738-1742 (1992).
67. Valdes-Aguilera, O. y Neckers, D. C. Aggregation phenomena in xanthene dyes. *Acc. Chem. Res.* **22**, 171-177 (1989).
68. Tang, Y. y col. Solar cells sensitized with porphyrin dyes with a carbazole donor: the effects of an auxiliary benzothiadiazole acceptor and bulky substituents on the donor. *Dye. Pigment.* **171**, 1-9 (2019).

69. Zimcik, P., Malkova, A., Hrubá, L., Miletin, M. y Novakova, V. Bulky 2,6-diphenylphenylsulfanyl substituents efficiently inhibit aggregation in phthalocyanines and tetrapyrazinoporphyrazines and control their photophysical and electrochemical properties. *Dye. Pigment.* **136**, 715-723 (2017).
70. Sun, M., Müllen, K. y Yin, M. Water-soluble perylenediimides: design concepts and biological applications. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 1513-1528 (2016).
71. Bayar, S., Dinçer, H. A. y Gonca, E. The synthesis of some phthalocyanines derived from bulky substituted phthalonitriles. *Dye. Pigment.* **80**, 156-162 (2009).
72. Goftar, M. K., Moradi, K. y Kor, N. M. Spectroscopic studies on aggregation phenomena of dyes. *Eur. J. Exp. Biol.* **4**, 72-81 (2014).
73. Chakraborty, A., Adhikari, R. y Saha, S. K. Molecular interaction of oxazine dyes in aqueous solution: temperature dependent molecular disposition of the aggregates. *J. Mol. Liq.* **164**, 250-256 (2011).
74. Hestand, N. J. y Spano, F. C. Expanded theory of H- and J-molecular aggregates: the effects of vibronic coupling and intermolecular charge transfer. *Chem. Rev.* **118**, 7069-7163 (2018).
75. Manzano, H. y col. Unprecedented J-aggregated dyes in pure organic solvents. *Adv. Funct. Mater.* **26**, 2756-2769 (2016).
76. Avakyan, V. G., Shapiro, B. I. y Alfimov, M. V. Dimers, tetramers and octamers of mono- and trimethylene thiocarbocyanine dyes. Structure, formation energy and absorption band shifts. *Dye. Pigment.* **109**, 21-33 (2014).
77. Ezhov, A. V. y col. Synthesis of Zn (II) porphyrin dyes and revealing an influence of their alkyl substituents on performance of dye-sensitized solar cells. *Synth. Met.* **269**, 1-8 (2020).
78. Miu, L. y col. Insight into the positional effect of bulky rigid substituents in organic sensitizers on the performance of dye-sensitized solar cells. *Dye. Pigment.* **168**, 1-11 (2019).
79. Khadieva, A. y col. Arylamine analogs of methylene blue: substituent effect on aggregation behavior and DNA binding. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1-14 (2021).
80. Tiravia, M. y col. 3,7-bis(*N*-methyl-*N*-phenylamino)phenothiazinium salt: improved synthesis and aggregation behavior in solution. *European J. Org. Chem.* **2019**, 3208-3216 (2019).

81. Ganeev, R. A., Zvyagin, A. I., Ovchinnikov, O. V. y Smirnov, M. S. Peculiarities of the nonlinear optical absorption of methylene blue and thionine in different solvents. *Dye. Pigment.* **149**, 236-241 (2018).
82. Verissimo, T. V. y col. In vitro cytotoxicity and phototoxicity of surface-modified gold nanoparticles associated with neutral red as a potential drug delivery system in phototherapy. *Mater. Sci. Eng. C* **65**, 199-204 (2016).
83. Banik, S., Hussain, S. A. y Bhattacharjee, D. Modified aggregation pattern of cresyl violet acetate adsorbed on nano clay mineral layers in Langmuir Blodgett Film. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **353**, 570-580 (2018).
84. Demirbaş, Ü. y col. The determination of photophysical and photochemical parameters of novel metal-free, zinc (II) and lead (II) phthalocyanines bearing 1,2,4-triazole groups. *Synth. Met.* **219**, 76-82 (2016).
85. Babu, B., Soy, R. C., Mack, J. y Nyokong, T. Non-aggregated lipophilic water-soluble tin porphyrins as photosensitizers for photodynamic therapy and photodynamic antimicrobial chemotherapy. *New J. Chem.* **44**, 11006-11012 (2020).
86. Meral, K., Arik, M. y Onganer, Y. The thin films of pyronin dyes doped with poly (vinyl sulphate) on glass substrate: preparation and characterization. *J. Mol. Struct.* **1105**, 350-356 (2016).
87. Mcarthur, E. A., Godbe, J. M., Tice, D. B. y Weiss, E. A. A study of the binding of cyanine dyes to colloidal quantum dots using spectral signatures of dye aggregation. *J. Phys. Chem. C.* **116**, 6136-6142 (2012).
88. Gruen, L. C. The Aggregation of copper phthalocyanine dyes. *Aust. J. Chem.* **25**, 1661-1667 (1972).
89. Daum, S. y col. Tuning the structure of aminoferrocene-based anticancer prodrugs to prevent their aggregation in aqueous solution. *J. Inorg. Biochem.* **178**, 9-17 (2018).
90. Montes de Oca, M. N., Vara, J., Milla, L., Rivarola, V. y Ortiz, C. S. Physicochemical properties and photodynamic activity of novel derivatives of triarylmethane and thiazine. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **346**, 255-265 (2013).
91. Liu, H. y col. Halogenated cyanine dyes for synergistic photodynamic and photothermal therapy. *Dye. Pigment.* **190**, 1-9 (2021).
92. Roth, S. M., Press, D. J., Heyne, B. y Sutherland, T. C. Synthetic access to benzimidacarbocyanine dyes to tailor their aggregation properties. *J. Org. Chem.* **86**,

8641-8651 (2021).

93. Robinson-Duggon, J. y col. Fatty acid conjugates of toluidine blue O as amphiphilic photosensitizers: synthesis, solubility, photophysics and photochemical properties. *Photochem. Photobiol.* **97**, 71-79 (2021).
94. Iyer, A., Clay, A., Jockusch, S. y Sivaguru, J. Evaluating brominated thioxanthenes as organo-photocatalysts. *J. Phys. Org. Chem.* **30**, 1-5 (2017).
95. Prasannan, D. y col. Synthesis, structure, photophysical, electrochemical properties and antibacterial activity of brominated BODIPYs. *R. Soc. Chem. Adv.* **6**, 80808-80824 (2016).
96. Lacerda, S. H. D., Abraham, B., Stringfellow, T. C. y Indig, G. L. Photophysical, photochemical and tumor-selectivity properties of bromine derivatives of Rhodamine-123. *Photochem. Photobiol.* **81**, 1430-1438 (2005).
97. Chen, Z. y col. Near-IR absorbing J-aggregate of an amphiphilic BF₂-azadipyrromethene dye by kinetic cooperative self-assembly. *Angew. Chemie.* **129**, 5823-5827 (2017).

CAPÍTULO 5

EVALUACIÓN DEL EFECTO FOTOCITOTÓXICO



EVALUACIÓN DEL EFECTO FOTOCITOTÓXICO

5.1. INTRODUCCIÓN

La determinación de la eficacia fotodinámica de nuevos agentes fototerapéuticos se desarrolla mediante diferentes ensayos de fotocitotoxicidad. Los mismos se definen como la respuesta tóxica ocasionada en un organismo por exposición a agentes Fs e irradiación con luz ^{1,2}.

La absorción de luz por el Fs a una determinada longitud de onda, inicia reacciones fotoquímicas generando especies citotóxicas tales como $^1\text{O}_2$, H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ y $\text{OH}\cdot$. Éstas son responsables de los efectos terapéuticos sobre las células diana mediante el estrés oxidativo en el sitio de acción y a través de la activación y transmisión de los procesos de señalización de muerte celular (necrosis o apoptosis) ^{3,4}.

El efecto fotocitotóxico ocasionado por el Fs representa la contribución de numerosos factores. La citotoxicidad depende del tipo de célula a tratar, de la concentración del agente terapéutico en el sitio de acción, la localización extracelular y/o intracelular, la dosis de irradiación, la disponibilidad de oxígeno y el tiempo entre la administración del fármaco y la exposición a la luz ⁵⁻⁸. La citotoxicidad de los Fs se evalúa en distintos microorganismos (TFDA) o líneas cancerígenas (TFD).

Antecedentes bibliográficos indican que la TFDA es efectiva en infecciones causadas por diversos patógenos ⁹. Las EROs producidas por el Fs dañan los componentes celulares o bien alteran las actividades metabólicas de manera irreversible produciendo la muerte de los microorganismos ¹⁰⁻¹⁶.

Los Fs fenotiazínicos más estudiados como agentes terapéuticos en TFDA son MB y TBO. Se han reportado resultados significativos en la aplicación de estos compuestos para el tratamiento de infecciones localizadas ¹⁵ provocando la eliminación de diferentes bacterias Gram-positivas y Gram-negativas ¹⁷⁻¹⁹, hongos ^{20,21}, parásitos ^{22,23} y virus ^{24,25}. Los ensayos de cinética de muerte empleando *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, cepas clínicas de *S. aureus* resistentes a metilina y fluoroquinolonas (MRSA61), como así también *Escherichia coli* ATCC 25922 ^{26,27} son las alternativas metodológicas más aplicadas para evaluar la acción de nuevos Fs.

La TFD ha ganado prevalencia como una estrategia para el abordaje de tratamientos oncológicos debido a la localización selectiva del Fs en el sitio de acción determinada por las diferencias fisiológicas del tumor y el tejido sano ²⁸⁻³⁰. La irradiación en el área conlleva la formación de especies citotóxicas provocando la destrucción selectiva de las células cancerígenas ³¹. Cabe señalar que MB ha presentado resultados positivos en ensayos clínicos contra adenocarcinoma, carcinoma de vejiga y cáncer mamario ^{32,33}. Por su parte, TBO cuenta con antecedentes promisorios en el tratamiento clínico de cáncer bucal y próstata ^{34,35}.

El ensayo de fototoxicidad *in vitro* validado por agencias reguladoras europeas y la FDA, correspondiente a la absorción de rojo neutro 3T3 (3T3 NRU-PT, por sus siglas en inglés) se aplica para identificar el potencial fototóxico de un compuesto ³⁶⁻³⁸. Esta prueba permite evaluar la fotocitotoxicidad mediante la reducción relativa de la viabilidad de las células expuestas al Fs en presencia y ausencia de luz.

La viabilidad celular y el porcentaje de toxicidad también se determinan mediante el ensayo colorimétrico de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, por sus siglas en inglés). Este método indirecto permite estimar la capacidad de las estructuras mitocondriales para convertir la sal de tetrazolio en un producto de coloración violácea insoluble en agua, denominado formazán ^{39,40}.

El ensayo conocido como fotohemólisis de glóbulos rojos (GR) es una de las metodologías *in vitro* más antiguas y sencillas que permite evaluar el efecto fotocitotóxico, este protocolo fue propuesto hace más de cien años por Sacharoff, G. and Sachs, H. (1905) ⁴¹. En este sentido, los eritrocitos de mamíferos constituyen un modelo adecuado debido a las modificaciones que presentan las membranas biológicas como consecuencia de la producción de EROs con posterioridad a la irradiación con luz ⁴²⁻⁴⁴.

La fotohemólisis permite evaluar la capacidad de los nuevos Fs para interactuar y fotooxidar proteínas y lípidos insaturados presentes en la membrana plasmática de los eritrocitos. Esta alteración en las macromoléculas, produce cambios en la estructura básica de la membrana afectando la permeabilidad y conduciendo a la muerte celular ^{45,46}. El daño es monitoreado mediante espectrofotometría UV-Visible a 413 nm, máximo de absorción correspondiente a la hemoglobina liberada con posterioridad a la ruptura de la membrana plasmática ^{44,47}.

Antecedentes bibliográficos demuestran que el porcentaje de fotodaño sería indicativo de la actividad fotodinámica ⁴⁸⁻⁵³. También es posible elucidar el mecanismo de fotosensibilización predominante (Tipo I o Tipo II) mediante el agregado de azida de sodio (NaN₃) que previene

el fotodaño en la membrana de los eritrocitos inhibiendo el $^1\text{O}_2$ (mecanismo Tipo II) y manitol permite la eliminación de los radicales libres (mecanismo Tipo I) ^{54–57}.

Con el objetivo de conocer la capacidad fototóxica y el mecanismo de acción de TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂, se evaluó la hemólisis desencadenada por el tratamiento fotodinámico de los GR.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron numerosas pruebas preliminares con la finalidad de determinar las condiciones experimentales óptimas ^{44,58–60}.

La sangre que se extrajo por punción venosa con anticoagulante EDTA (aprox. 5 mg), se centrifugó en un tubo falcon a 3000 rpm durante 5 min eliminando por aspiración el plasma y la capa de leucocitos. Luego se lavó 3 veces con solución reguladora de pH 7,4 (PBS) y se centrifugó nuevamente. Se tomó una alícuota de 500 μL de eritrocitos que se resuspendieron en 50 mL de PBS.

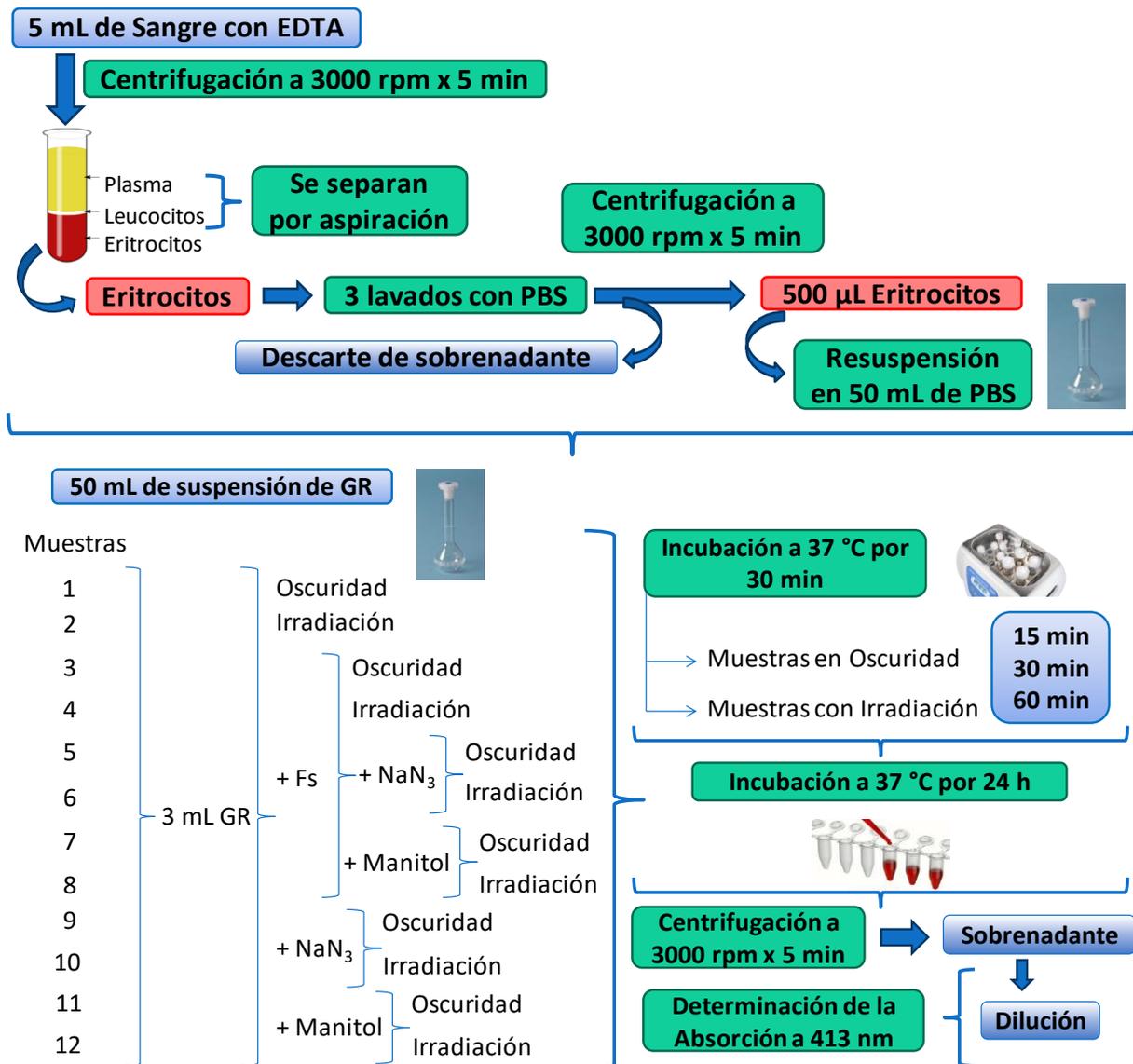
Se tomaron alícuotas de 3 mL de la suspensión de eritrocitos y se incubaron con TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂ (20 μM) en oscuridad durante 30 min a 37 °C. Posteriormente las muestras se irradiaron con lámpara LED Osram Parathom®, 5W-8,4 mW/cm² por 15, 30 y 60 min. Se utilizaron como controles los mismos tratamientos en oscuridad y un ensayo realizado sin Fs tratado con luz. Todas las muestras se mantuvieron 24 h a 37 °C en oscuridad con posterioridad a la irradiación. Luego los tubos de ensayo se centrifugaron (3000 rpm durante 5 min) y 100 μL del sobrenadante se diluyeron en 1 mL de agua destilada.

A las suspensiones de GR en presencia y ausencia de los Fs (20 μM) se agregó NaN₃ (50 mM) o manitol (50 mM). Las muestras se trataron siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. El Esquema 5.1 ilustra los pasos involucrados en el desarrollo experimental.

El contenido de hemoglobina se determinó mediante la absorción a 413 nm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-Visible 160A.

Los resultados se expresaron como porcentaje de hemólisis, considerando como 100 % la absorbancia correspondiente a una muestra lisada en agua destilada (Ecuación 5.1).

El grado de hemólisis se determinó por duplicado y los datos obtenidos se procesaron mediante el programa OriginPro 8 SRO (OriginLab Corporation).



Esquema 5.1: Ensayo de fotohemólisis

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{\text{Abs} (Fs \text{ irr}) - \text{Abs} (Fs \text{ osc})}{\text{Abs} (100) - \text{Abs} (irr)} \times 100 \quad \text{Ecuación 5.1}$$

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Evaluación del efecto fotocitotóxico

Las membranas biológicas constituyen un blanco terapéutico para un gran número de Fs pertenecientes a diferentes familias tales como clorinas, ftalocianinas y porfirinas, entre otras.

Los GR se consideran células modelo que permiten evaluar el efecto fotocitotóxico y en consecuencia la actividad fotodinámica de nuevos agentes fototerapéuticos^{44,57,61}. Una de las principales ventajas de utilizar eritrocitos radica en que las determinaciones espectrofotométricas, con relación a la liberación de hemoglobina, son más simples y rápidas frente a la tinción celular y el conteo⁶¹. Este ensayo es apropiado para la exploración de los mecanismos fisiológicos y moleculares implicados en la TFD⁵⁷. Con el objetivo de inferir la actividad fotodinámica *in vitro* de los nuevos Fs se evaluó de manera comparativa la fotohemólisis generada por TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂ en un modelo biomimético de membrana celular. La hemólisis ocasionada luego de la irradiación de los GR tratados con los Fs fenotiazínicos es producto del efecto fotodinámico del agente terapéutico^{44,62}.

La representación gráfica de porcentaje de hemólisis en función del tiempo de irradiación (Figura 5.1) muestra que TBOBr₂ evidenció una mayor fotohemólisis en comparación con TBO y AzCBr₂, alcanzando un 85 % a los 60 min. En las mismas condiciones experimentales, TBO y AzCBr₂ manifestaron un 50 % y 25 % de hemólisis, respectivamente.

Los resultados obtenidos permiten inferir que TBOBr₂ presentaría mayor actividad fotodinámica en medios biológicos. Sin embargo la evaluación de la fotooxidación de DMA (capítulo 3, sección 3.4.2.3.2), indicó que este Fs exhibió el menor valor de Φ_{Δ} en comparación con TBO y AzCBr₂. Esta discrepancia entre los ensayos de fotodescomposición de DMA y fotohemólisis de GR podría explicarse en términos de la localización del Fs en los eritrocitos y la interacción del mismo con los distintos componentes celulares. Algunos autores indican que la naturaleza hidrofílica/lipofílica de los Fs afecta fuertemente la unión de éstos a las células y en consecuencia su actividad fotocitotóxica⁵². El trabajo desarrollado por Kato y col., señala que la citotoxicidad generada por Fs porfirínicos sería independiente de la eficiencia de los mismos para generar ¹O₂, considerando que la fotohemólisis observada es atribuible a la afinidad del Fs por la membrana celular de los eritrocitos⁶³. Por otra parte otros antecedentes bibliográficos indican que el Φ_{Δ} , el sitio de localización intracelular y el mecanismo de muerte celular son aspectos relevantes en la eficiencia fotodinámica^{64,65}.

Se sabe que la producción de ¹O₂ en solución (ensayo de fotooxidación de DMA) no siempre se ajusta a lo observado en medios celulares ya que el microambiente biológico puede inducir cambios significativos en la fotofísica y fotoquímica de los Fs^{61,62,66}.

Por lo expuesto, se infiere que distintos factores tales como el microambiente biológico, el carácter hidrofílico/lipofílico y el sitio de localización intracelular de TBOBr₂, entre otros, contribuiría a un mayor efecto fotocitotóxico.

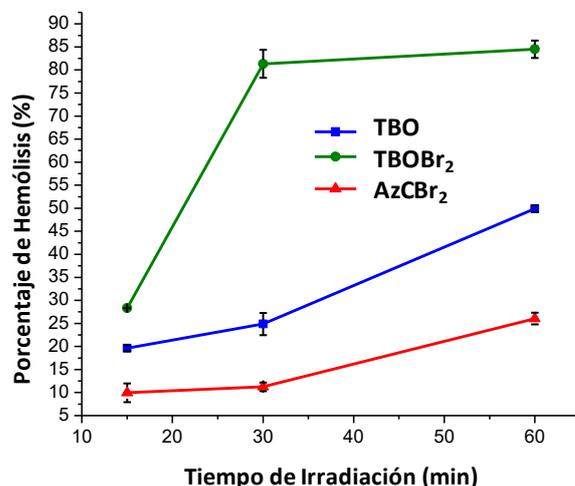


Figura 5.1: Porcentaje de fotohemólisis en función del tiempo de irradiación (concentración de Fs= 20 μ M).

El ensayo de fotohemólisis de GR evidenció que el Fs TBOBr₂ sería el mejor candidato para su aplicación en TFD y TFDA.

5.3.2. Determinación del mecanismo fotodinámico

Se determinó el mecanismo de fotosensibilización predominante mediante la adición de NaN₃ (atrapador de ¹O₂) y manitol (atrapador de radicales libres) ^{67,68}.

Los resultados obtenidos (Figura 5.2) indicaron que el agregado de NaN₃ y manitol disminuyeron el porcentaje de hemólisis generado por TBOBr₂ y AzCBr₂.

El Fs TBOBr₂ presentó 29 %, 79 % y 85 % de hemólisis a los 15, 30 y 60 min de irradiación, respectivamente. La adición de NaN₃ provocó la disminución de estos porcentajes por debajo del 10 % a todos los tiempos ensayados. También se observó que manitol ocasionó una caída en la hemólisis generada por este Fs presentando un 12 %, 47 % y 74 % a los distintos tiempos evaluados, respectivamente (Figura 5.2.A).

Por otra parte en ausencia de los atrapadores de EROs, AzCBr₂ generó 10 %, 11 % y 25 % de fotohemólisis a 15, 30 y 60 min de irradiación, respectivamente. Estos valores disminuyeron a

menos de 2 % con la adición de NaN_3 a todos los tiempos ensayados, mientras que, manitol provocó un descenso de los porcentajes a 0 %, 2,5 % y 11 % a los distintos tiempos evaluados (Figura 5.2.B).

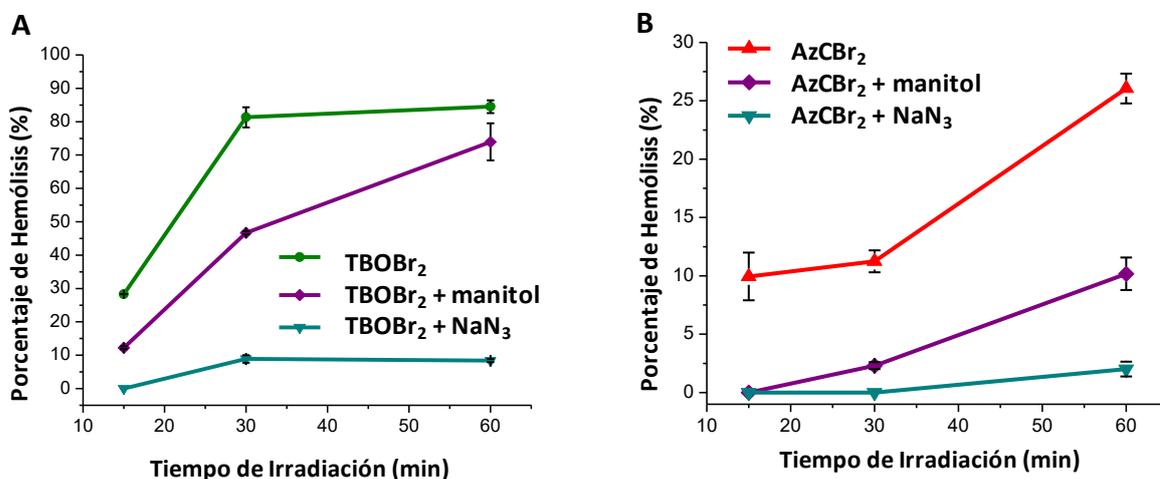


Figura 5.2: Porcentaje de fotohemólisis en función del tiempo de irradiación con adición de NaN_3 y manitol. (A) TBOBr_2 (20 μM) y (B) AzCBr_2 (20 μM).

Reportes bibliográficos señalan que el daño generado a la membrana celular de los eritrocitos ejercida por el tratamiento fotodinámico, se debe a la formación de EROs y que el mismo podría evitarse mediante la incorporación de antioxidantes^{52,69}.

La disminución significativa en los porcentajes de fotohemólisis obtenidos para ambos Fs dibromados con el agregado de NaN_3 indican que actúan predominantemente por el mecanismo tipo II, es decir, mediante la producción de $^1\text{O}_2$. De esta manera NaN_3 atrapa la especie fotocitotóxica generada por los Fs produciendo un efecto protector sobre los eritrocitos.

La adición de manitol por otra parte, señala que el mecanismo de fotosensibilización Tipo I (radicales libres) puede contribuir en menor proporción a la hemólisis inducida por TBOBr_2 y AzCBr_2 .

Antecedentes bibliográficos indican que los Fs pertenecientes a otras familias de compuestos actúan con el predominio de un mecanismo^{52,57,70}, conociéndose que las fenotiazinas lo hacen principalmente mediante la producción de $^1\text{O}_2$ ⁷¹⁻⁷³. Este comportamiento fue el observado en los ensayos realizados para TBOBr_2 y AzCBr_2 los cuales ejercen su acción mediada por ambos mecanismos fotodinámicos, destacándose el Tipo II.

5.4. CONCLUSIONES PARCIALES

El ensayo de fotohemólisis permitió demostrar que TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂ son capaces de ocasionar daño celular fotoinducido. Los tres Fs presentaron diferentes grados de hemólisis en las condiciones ensayadas. El porcentaje de fotodegradación de los GR frente a TBOBr₂, indicó que este compuesto desencadena mayor daño en la membrana citoplasmática, por lo que sería un óptimo candidato para su aplicación en TFD y TFDA, en comparación con TBO y AzCBr₂.

Por otra parte los Fs dibromados evidenciaron la participación de ambos mecanismos de fotosensibilización en el daño generado a la membrana de los eritrocitos, actuando principalmente mediante el mecanismo tipo II, es decir, por la generación de ¹O₂. Cabe destacar que esta especie reactiva del oxígeno es el principal agente citotóxico en los tratamientos fotodinámicos, siendo TBOBr₂ un candidato promisorio para la aplicación en TFD y TFDA.

5.5. BIBLIOGRAFÍA

1. Paiva, J. P. y col. Insights and controversies on sunscreen safety. *Crit. Rev. Toxicol.* **50**, 707-723 (2020).
2. Meunier, J.-R., Sarasin, A. y Marrot, L. Photogenotoxicity of mammalian cells: a review of the different assays for *in vitro* testing. *Photochem. Photobiol.* **75**, 437-447 (2002).
3. Turchiello, R. F., Oliveira, C. S., Fernandes, A. U., Gómez, S. L. y Baptista, M. S. Methylene blue-mediated photodynamic therapy in human retinoblastoma cell lines. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **222**, 13-18 (2021).
4. Thomas, C. D. y col. Cellular density a major factor involved in PDT cytotoxic responses. Study on three different lines of human retinoblastoma grafted on nude mice. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **12**, 267-275 (2015).
5. Dias, L. D., Blanco, K. C., Mfouo-Tynga, I. S., Inada, N. M. y Bagnato, V. S. Curcumin as a photosensitizer: from molecular structure to recent advances in antimicrobial photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **45**, 1-35 (2020).
6. Topaloğlu, N., Kadıköylü, G., Onak, G. y Karaman, O. The effect of indocyanine green-based photodynamic therapy on healthy fibroblast and keratinocyte cells.

- Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **31**, 1-10 (2020).
7. Pourhajibagher, M. y col. Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy with indocyanine green and curcumin on human gingival fibroblast cells: an *in vitro* photocytotoxicity investigation. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **15**, 13-18 (2016).
 8. Kiesslich, T., Tortik, N., Pichler, M., Neureiter, D. y Plaetzer, K. Apoptosis in cancer cells induced by photodynamic treatment-a methodological approach. *J. Porphyrins Phthalocyanines.* **17**, 197-209 (2013).
 9. Wozniak, A. y Grinholc, M. Combined antimicrobial activity of photodynamic inactivation and antimicrobials-state of the art. *Front. Microbiol.* **9**, 1-19 (2018).
 10. Motallebi, M., Khorsandi, K., Sepahy, A. A., Chamani, E. y Hosseinzadeh, R. Effect of rutin as flavonoid compound on photodynamic inactivation against *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **32**, 1-7 (2020).
 11. Shi, X., Zhang, C. Y., Gao, J. y Wang, Z. Recent advances in photodynamic therapy for cancer and infectious diseases. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* **11**, 1-23 (2019).
 12. Cieplik, F. y col. Antimicrobial photodynamic therapy-what we know and what we don't. *Crit. Rev. Microbiol.* **44**, 571-589 (2018).
 13. Hu, X., Huang, Y. Y., Wang, Y., Wang, X. y Hamblin, M. R. Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm infections. *Front. Microbiol.* **9**, 1-24 (2018).
 14. Tuchin, V. V., Genina, E. A., Tuchina, E. S., Svetlakova, A. V. y Svenskaya, Y. I. Optical clearing of tissues: issues of antimicrobial phototherapy and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **180**, 1-35 (2022).
 15. Rosa, P. L. y da Silva, F. C. Antimicrobial photodynamic therapy: a new therapeutic option to combat infections. *J. Med. Microbiol. Diagnosis* **03**, 1-7 (2014).
 16. Hamblin, M. R. y col. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 941-951 (2002).
 17. Monteiro, J. S. C. y col. Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy (AmPDT) on *Staphylococcus aureus* using phenothiazine compound with red laser. *Lasers Med. Sci.* **32**, 29-34 (2017).
 18. Theodoro, L. H. y col. Comparative effects of different phenothiazine photosensitizers on experimental periodontitis treatment. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **34**, 1-8

- (2021).
19. Sobotta, L., Skupin-Mrugalska, P., Piskorz, J. y Mielcarek, J. Non-porphyrinoid photosensitizers mediated photodynamic inactivation against bacteria. *Dye. Pigment.* **163**, 337-355 (2019).
 20. Ziental, D., Mlynarczyk, D. T., Czarczynska-Goslinska, B., Lewandowski, K. y Sobotta, L. Photosensitizers mediated photodynamic inactivation against fungi. *Nanomaterials.* **11**, 1-59 (2021).
 21. Fekrazad, R., Barghi, V. G., Mir, A. P. B. y Ghahfarokhi, M. S. *In vitro* photodynamic inactivation of *Candida albicans* by phenothiazine dye (new methylene blue) and Indocyanine green (EmunDo®). *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **12**, 52-57 (2015).
 22. Barbosa, A. F. S. y col. Anti-*Trypanosoma cruzi* effect of the photodynamic antiparasitic chemotherapy using phenothiazine derivatives as photosensitizers. *Lasers Med. Sci.* **35**, 79-85 (2020).
 23. Barbosa, A. F. y col. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) using phenothiazine derivatives as photosensitizers against *Leishmania braziliensis*. *Lasers Surg. Med.* **44**, 850-855 (2012).
 24. Nedu, M. E., Tertis, M., Cristea, C. y Georgescu, A. V. Comparative study regarding the properties of methylene blue and proflavine and their optimal concentrations for *in vitro* and *in vivo* applications. *Diagnostics.* **10**, 1-26 (2020).
 25. Floyd, R. A., Schneider, J. E. y Dittmer, D. P. Methylene blue photoinactivation of RNA viruses. *Antiviral Res.* **61**, 141-151 (2004).
 26. Vara, J., Gualdesi, M. S., Aiassa, V. y Ortiz, C. S. Evaluation of physicochemical properties and bacterial photoinactivation of phenothiazine photosensitizers. *Photochem. Photobiol. Sci.* **18**, 1576-1586 (2019).
 27. Naghili, H. y col. Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Vet. Res. forum.* **4**, 179-183 (2013).
 28. Liu, M. y Li, C. Recent advances in activatable organic photosensitizers for specific photodynamic therapy. *ChemPlusChem.* **85**, 948-957 (2020).
 29. Kwiatkowski, S. y col. Photodynamic therapy- mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed. Pharmacother.* **106**, 1098-1107 (2018).
 30. Ormond, A. B. y Freeman, H. S. Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials.* **6**, 817-840 (2013).

31. D'Alessandro, S. y Priefer, R. Non-porphyrin dyes used as photosensitizers in photodynamic therapy. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **60**, 1-14 (2020).
32. Ateş, G. B., Ayşe, A., Garipcan, B. y Gülsoy, M. Methylene blue mediated photobiomodulation on human osteoblast cells. *Lasers Med. Sci.* **32**, 1847-1855 (2017).
33. dos Santos, A. F. y col. Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. *BMC Cancer.* **17**, 1-15 (2017).
34. Topaloglu, N., Bakay, E., Yünlü, M. y Onak, G. Induced photo-cytotoxicity on prostate cancer cells with the photodynamic action of toluidine blue ortho. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **34**, 1-10 (2021).
35. Graciano, T. B. y col. Using chitosan gels as a toluidine blue O delivery system for photodynamic therapy of buccal cancer: *in vitro* and *in vivo* studies. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **12**, 98-107 (2015).
36. OECD. The Organisation for Economic Cooperation and Development. Guideline for testing of chemicals: *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. *OECD Guidel. Test. Chem.* **432**, 1-18 (2018).
37. Food and Drug Administration (FDA). Photosafety evaluation of pharmaceuticals. *Guid. Ind.* **S10**, 1-21 (2015).
38. Spielmann, H. y col. The international EU/COLIPA *in vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial). Part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxicol. Vitr.* **12**, 305-327 (1998).
39. Montes de Oca, M. N., Vara, J., Milla, L., Rivarola, V. y Ortiz, C. S. Physicochemical properties and photodynamic activity of novel derivatives of triarylmethane and thiazine. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **346**, 255-265 (2013).
40. Viola, G. y Dall'Acqua, F. Photosensitization of biomolecules by phenothiazine derivatives. *Curr. Drug Targets.* **7**, 1135-1154 (2006).
41. Sacharoff, G. y Sachs, H. Ueber die hämolytische Wirkung der photodynamischen Stoffe. *Münchener Medizinische Wochenschrift* **52**, 297-299 (1905).
42. Tsubone, T. M., Baptista, M. S. y Itri, R. Understanding membrane remodelling initiated by photosensitized lipid oxidation. *Biophys. Chem.* **254**, 1-17 (2019).
43. Belykh, D. V. y col. Photodynamic damage to erythrocytes and liposomes sensitized by chlorophyll a derivatives. *Russ. Chem. Bull.* **67**, 1513-1517 (2018).
44. Spesia, M. B., Rovera, M. y Durantini, E. N. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli*

- and *Streptococcus mitis* by cationic zinc (II) phthalocyanines in media with blood derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 2198-2205 (2010).
45. Pillusky, F. M. y col. Antimicrobial photodynamic therapy with photosensitizer in ethanol improves oxidative status and gingival collagen in a short-term in periodontitis. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **19**, 119-127 (2017).
 46. Cavalcante, R. S., Imasato, H., Bagnato, V. S. y Perussi, J. R. A combination of techniques to evaluate photodynamic efficiency of photosensitizers. *Laser Phys. Lett.* **6**, 64-70 (2009).
 47. Zhou, Y. y col. Engineering a photosensitizer nanoplatfom for amplified photodynamic immunotherapy: via tumor microenvironment modulation. *Nanoscale Horizons* **6**, 120-131 (2021).
 48. Magesan, P. y col. Photodynamic and antibacterial studies of template-assisted Fe₂O₃-TiO₂ nanocomposites. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **40**, 1-14 (2022).
 49. Paramanandham, M., Dhanalekshmi, K. I. y Meena, K. S. Review: photodynamic cancer therapy of noble metal core-shell nanoparticles *in vitro*. *Malaya J. Mat.* **2**, 2452-2460 (2020).
 50. Lorenzoni, D. y col. PLGA-PEG nanoparticles containing gallium phthalocyanine: preparation, optimization and analysis of its photodynamic efficiency on red blood cell and Hepa-1C1C7. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **198**, 1-17 (2019).
 51. Teixeira, A. y col. Interplay between membrane lipid peroxidation and photoproduct formation in the ultraviolet A-induced phototoxicity of vemurafenib in skin keratinocytes. *Toxicol. Sci.* **154**, 289-295 (2016).
 52. Ochoa, A. L., Tempesti, T. C., Spesia, M. B., Milanesio, M. E. y Durantini, E. N. Synthesis and photodynamic properties of adamantylethoxy Zn (II) phthalocyanine derivatives in different media and in human red blood cells. *Eur. J. Med. Chem.* **50**, 280-287 (2012).
 53. Girard, D., Weagle, G., Gupta, A., Bérubé, G. y Chapados, C. Preparation and *in vitro* biological evaluation of tetrapyrrole ethanolamide derivatives as potential anticancer agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **18**, 360-365 (2008).
 54. Wiehe, A., O'Brien, J. M. y Senge, M. O. Trends and targets in antiviral phototherapy. *Photochem. Photobiol. Sci.* **18**, 2565-2612 (2019).
 55. Ferreyra, D. D. y col. Synthesis and properties of 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N*-dimethylaminopropoxy)phenyl] chlorin as potential broad-spectrum antimicrobial

- photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **158**, 243-251 (2016).
56. Rehan Zaheer, M. y col. Molecular mechanisms of drug photodegradation and photosensitization. *Curr. Pharm. Des.* **22**, 768-782 (2016).
 57. Ferreyra, D. D., Spesia, M. B., Milanesio, M. E. y Durantini, E. N. Synthesis and photodynamic properties of 5,10,15,20-tetrakis[3-(*N*-ethyl-*N*-methylcarbazoyl)]chlorin and its analogous porphyrin in solution and in human red blood cells. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **282**, 16-24 (2014).
 58. AL-Akhras, M. A., Aljarrah, K., Albiss, B. y Bala, A. A. Continuous and delayed photohemolysis sensitized with methylene blue and iron oxide nanoparticles (Fe₃O₄). *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **92**, 1-13 (2015).
 59. Robertson, D. G., Bailey, D. L. y Martin, R. A. Species differences in response to photohemolytic agents. *Photochem. Photobiol.* **53**, 455-461 (1991).
 60. Valenzeno, D. P. y Pooler, J. P. Cell membrane photomodification: relative effectiveness of halogenated fluoresceins for photohemolysis. *Photochem. Photobiol.* **35**, 343-350 (1982).
 61. Milanesio, M. E., Alvarez, M. G., Bertolotti, S. G. y Durantini, E. N. Photophysical characterization and photodynamic activity of metallo 5-(4-(trimethylammonium)phenyl)-10,15,20-tris(2,4,6-trimethoxyphenyl) porphyrin in homogeneous and biomimetic media. *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 963-972 (2008).
 62. Dupouy, E. A., Lazzeri, D. y Durantini, E. N. Photodynamic activity of cationic and non-charged Zn (II) tetrapyrroline derivatives: biological consequences in human erythrocytes and *Escherichia coli*. *Photochem. Photobiol. Sci.* **3**, 992-998 (2004).
 63. Kato, H., Komagoe, K., Inoue, T., Masuda, K. y Katsu, T. Structure-activity relationship of porphyrin-induced photoinactivation with membrane function in bacteria and erythrocytes. *Photochem. Photobiol. Sci.* **17**, 954-963 (2018).
 64. Tsubone, T. M., Martins, K. W. y Baptista, M. S. Identifying specific subcellular organelle damage by photosensitized oxidations. *Yale J. Biol. Med.* **92**, 413-422 (2019).
 65. Ragàs, X. y col. Singlet oxygen in antimicrobial photodynamic therapy: photosensitizer-dependent production and decay in *E. coli*. *Molecules.* **18**, 2712-2725 (2013).
 66. Aveline, B. M. y Redmond, R. W. Can cellular phototoxicity be accurately predicted on the basis of sensitizer photophysics? *Photochem. Photobiol.* **69**, 306-316 (1999).
 67. Dhanalekshmi, K. I. y col. Preparation and characterization of core-shell type Ag@SiO₂

- nanoparticles for photodynamic cancer therapy. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **28**, 324-329 (2019).
68. Maisch, T., Bosl, C., Szeimies, R., Lehn, N. y Abels, C. Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1542-1552 (2005).
69. da Silva, A. R., Ribeiro, J. N., Rettori, D. y Jorge, R. A. Type II photooxidation mechanism of biomolecules using chloro(5,10,15,20- tetraphenylporphyrinato)indium(III) as a photosensitizer. *J. Braz. Chem. Soc.* **19**, 1311-1320 (2008).
70. Alvarez, M. G., Montes de Oca, M. N., Milanesio, M. E., Ortiz, C. S. y Durantini, E. N. Photodynamic properties and photoinactivation of *Candida albicans* mediated by brominated derivatives of triarylmethane and phenothiazinium dyes. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **11**, 148-155 (2014).
71. Piwowar, K., Blacha-Grzechnik, A., Turczyn, R. y Zak, J. Electropolymerized phenothiazines for the photochemical generation of singlet oxygen. *Electrochim. Acta.* **141**, 182-188 (2014).
72. Chen, J., Cesario, T. C. y Rentzepis, P. M. Time resolved spectroscopic studies of methylene blue and phenothiazine derivatives used for bacteria inactivation. *Chem. Phys. Lett.* **498**, 81-85 (2010).
73. Misba, L., Zaidi, S. y Khan, A. U. Efficacy of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* biofilm: role of singlet oxygen. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **183**, 16-21 (2018).

CONCLUSIONES GENERALES



CONCLUSIONES GENERALES

El desafío de este trabajo de Tesis Doctoral consistió en el desarrollo de nuevos agentes fototerapéuticos a partir de la derivatización de Fs pertenecientes a la familia de fenotiazinas, AzA y TBO, con antecedentes promisorios de aplicación en TFD y TFDA.

Los compuestos dibromados de AzA, TBO y AzC se obtuvieron con porcentajes de pureza relativa superiores al 86 %. Los derivados TBOBr₂ y AzCBr₂ presentaron un corrimiento hipsocrómico de la longitud de máxima absorción como consecuencia de la introducción de átomos pesados en la estructura química. Esta estrategia de síntesis favoreció la presencia del monómero del Fs, especie que potencia la actividad fotocitotóxica de los mismos.

El Fs AzABr₂ evidenció un corrimiento batocrómico en la máxima longitud de onda ampliando las posibilidades terapéuticas. Sin embargo, el mismo presentó inestabilidad química lo que imposibilitó el desarrollo de estudios posteriores.

La evaluación de distintas condiciones en la síntesis de Buchwald-Hartwig, a partir de ambos prototipos, permitió la obtención de nuevos productos de interés con rendimientos que no superaron el 18 % desestimando el abordaje de estudios más profundos relativos a estos derivados.

Se demostró que la introducción de dos átomos de bromo en la estructura de TBO y AzC, produjo una disminución de hasta 4 unidades en el valor de pK_a, con relación a sus respectivos precursores, presentando valores cercanos al pH fisiológico. Esto sería favorable dado que en medios biológicos los nuevos derivados estarían presentes como una combinación de especies neutras y catiónicas, permitiendo la incorporación y acumulación en diferentes células blanco. Otro aspecto a destacar de los nuevos agentes terapéuticos dibromados, TBOBr₂ y AzCBr₂, es su estabilidad fotoquímica, propiedad directamente relacionada con la eficacia fotodinámica considerando que una mayor fotoestabilidad implicaría una mejor actividad fotocitotóxica de los compuestos en estudio.

La determinación del valor de Φ_{Δ} de los nuevos Fs fue un desafío complejo que necesitó del abordaje de diferentes metodologías directas e indirectas. Los ensayos de fotooxidación de DMA permitieron determinar los valores de Φ_{Δ} relativos de TBOBr₂ y AzCBr₂ los cuales presentaron una producción de ¹O₂ comparable y significativamente superior a la de TBO, respectivamente.

Conclusiones Generales

El estudio de agregación de las fenotiazinas en solventes orgánicos puros permitió identificar las especies monoméricas de TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂ que presentan un máximo de absorción cercano a los 500 nm. Es importante destacar que el monómero de TBO ha sido reportado y asignado erróneamente por numerosos investigadores. Las determinaciones realizadas evidenciaron que los monómeros de los derivados tiazínicos forman agregados J con máximo de absorción a longitudes de onda superiores a los 600 nm. Adicionalmente, se demostró que los Fs dibromados son capaces de formar agregados de orden superior en soluciones acuosas. Finalmente al comparar los resultados obtenidos para TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂ podemos afirmar que la presencia de halógenos en la estructura desestabilizó el agregado J de estos Fs, favoreciendo la presencia de la especie monomérica en medios orgánicos y la formación de agregados superiores en medios acuosos. Los estudios realizados permitieron establecer la tendencia de agregación de los nuevos compuestos dibromados presentando un comportamiento similar en todas las condiciones ensayadas.

El ensayo de fotohemólisis demostró que TBO, TBOBr₂ y AzCBr₂ son capaces de ocasionar daño celular fotoinducido. El porcentaje de fotodegradación de los GR frente a TBOBr₂ indicó que este compuesto desencadena un daño significativo en la membrana citoplasmática por lo que sería un óptimo candidato para su aplicación en TFD y TFDA. Además, se determinó que los nuevos derivados dibromados presentan actividad fotodinámica principalmente mediante el mecanismo Tipo II, siendo TBOBr₂ un candidato promisorio para su aplicación en el tratamiento de patologías oncológicas y microbianas.

PROYECCIONES



PROYECCIONES

Los resultados obtenidos en el desarrollo de esta Tesis Doctoral dan lugar a las siguientes proyecciones:

- **Evaluación de la actividad fotodinámica de los nuevos Fs dibromados frente a diferentes células tumorales y microorganismos.**

Se propone evaluar la actividad fotodinámica de los nuevos compuestos fenotiazínicos halogenados, frente a líneas celulares y microorganismos patógenos considerando su potencial aplicación en TFD y TFDA. La bromación optimizó numerosas propiedades de relevancia biológica y farmacéutica de los prototipos ensayados, lo que permite inferir mejoras significativas en la actividad fotodinámica de los nuevos Fs de segunda generación.

El abordaje de esta proyección se sustenta en antecedentes bibliográficos que señalan resultados promisorios para compuestos halogenados para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

Por otra parte, un área de investigación emergente se relaciona con las enfermedades infecciosas, como consecuencia del problema actual de la resistencia a antimicrobianos. Esta situación desencadena la urgente búsqueda de nuevos enfoques antimicrobianos que superen el desarrollo tradicional de los antibióticos. La TFDA ha surgido en este sentido como una estrategia prometedora en la erradicación de diversos tipos de microorganismos. Se han evaluado diferentes Fs en comparación con sus respectivos prototipos, obteniendo mayor inactivación microbiana por parte de los nuevos compuestos bromados.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral y los antecedentes bibliográficos indican que los nuevos Fs dibromados son candidatos promisorios para su aplicación en TFD y en TFDA.

- **Desarrollo y caracterización de nuevos Fs de tercera generación, a partir de los Fs dibromados sintetizados.**

El desarrollo de Fs de tercera generación, o nanofotosensibilizadores, incluye a los de segunda generación acoplados a portadores moleculares. Los nanotransportadores son de diversos

tipos tales como, micelas, liposomas, nanopartículas (NPs) metálicas y poliméricas, entre otros. Se demostró, en los últimos años, que la nanoencapsulación de Fs mejora significativamente las propiedades fotodinámicas. Este proceso, también afecta a la solubilidad de fármacos en agua, aumenta la selectividad del Fs por las células diana y reduce las dificultades de la fotodegradación.

Los sistemas de vehiculización basados en NPs, presentan dimensiones en el rango de 1 a 200 nm, mejorando la disponibilidad del Fs en el sitio blanco y proporcionando mayor impacto terapéutico. Nuestro grupo de investigación ha desarrollado NPs de poliacrilamida como portadores de agentes fototerapéuticos pertenecientes a las familias de las azinas y fenotiazinas, evidenciado una mayor generación de $^1\text{O}_2$ y estabilidad fotoquímica. Se determinó que estas NPs ofrecen ventajas terapéuticas con comparación con el Fs libre ya que previenen diferentes efectos adversos tales como la degradación química y fotoquímica, la agregación y baja solubilidad acuosa, entre otros. Adicionalmente se potenció la actividad fotocitotóxica frente a distintos microorganismos indicando un potencial significativo para su aplicación en TFDA. Otros sistemas portadores, como liposomas y micelas, han sido desarrollados y aplicados para la incorporación de nuevos Fs sintetizados en el grupo de investigación, demostrando una mejora relevante en la fotoactividad frente a los Fs de segunda generación.

Se propone a futuro vehiculizar los derivados TBOBr_2 y AzCBr_2 , sintetizados y caracterizados en esta Tesis Doctoral, en diferentes nanotransportadores con la finalidad de preparar nuevos sistemas que potencien las propiedades fisicoquímicas, fotofísicas y fotoquímicas, incrementando su efecto fotodinámico.

ABREVIATURAS



ABREVIATURAS

Abs: Absorbancia.

ABDA: Ácido dimalónico de 9,10-dimetilantraceno, por sus siglas en inglés, *9,10-anthracenediyl-bis (methylene) dimalonic acid*.

ALA: Ácido aminolevulínico, por sus siglas en inglés, *Aminolevulinic Acid*.

ANMAT: Administración nacional de medicamentos, alimentos y tecnología médica.

AzA: Azure A, por sus siglas en inglés.

AzB: Azure B, por sus siglas en inglés.

AzC: Azure C, por sus siglas en inglés.

AzCBr₂: Azure C dibromado, por sus siglas en inglés.

Bcl-2: Familia de proteínas, por sus siglas en inglés, *B-cell lymphoma 2*.

BODIPY: Compuestos de la familia de los 4-4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenos.

Br: Bromo (átomo).

Br₂: Bromo molecular (vapores de Br₂).

Buffer: Solución amortiguadora de pH.

CHCl₃: Cloroformo.

CH₂Cl₂: Diclorometano.

cLog P: Coeficiente de partición teórico.

Cs₂CO₃: Carbonato de cesio.

DMA: 9,10-dimetilantraceno.

DMF: *N,N*-dimetilformamida.

DPADS: Difenilantraceno-2,7-disulfonato de sodio, por sus siglas en inglés, *sodium diphenylanthracene-2,7-disulfonate*.

DPATC: Difenilantraceno-2,3,6,7-tetracarboxilato de potasio, por sus siglas en inglés, *potassium diphenylanthracene-2,3,6,7-tetracarboxylate*.

Abreviaturas

D₂O: Agua deuterada.

EMA: Agencia europea de medicina, por sus siglas en inglés, *European Medicinal Agency*.

FDA: Administración de alimentos y medicamentos, por sus siglas en inglés, *Food and Drugs Administration*.

EROs: Especies reactivas del oxígeno.

EtOH: Etanol.

FE: Fase estacionaria.

FM: Fase móvil.

Fs: Fotosensibilizador.

¹Fs: Fotosensibilizador en estado singlete fundamental.

¹Fs*: Fotosensibilizador en estado singlete excitado.

³Fs*: Fotosensibilizador en estado triplete excitado.

GI: Porcentaje de grado de ionización.

GR: Glóbulos rojos.

HAc: Ácido acético glacial.

HCl: Ácido clorhídrico.

HPD: Derivado de hematoporfirina, por sus siglas en inglés, *hematoporphyrin derivative*.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia, por sus siglas en inglés, *High Performance Liquid Chromatography*.

HRMS: Espectrometría de masas de alta resolución, por sus siglas en inglés, *High Resolution Mass Spectrometry*.

¹H-RMN: Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones.

H₂O: Agua.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

IFA: Ingrediente farmacéutico activo.

I₀: Intensidad de fosforescencia de oxígeno singlete a tiempo cero.

J_{orto}: Constate de acoplamiento orto.

LDL: Lipoproteínas de baja densidad, por sus siglas en inglés, *Low Density Lipoprotein*.

LED: Diodos emisores de luz, por sus siglas en inglés, *Light Emitting Diodes*.

MAL: Aminolevulinato de metilo o metil- aminolevulinato, por sus siglas en inglés, *methyl aminolevulinate*.

MB: Azul de metileno, por sus siglas en inglés, *Methylene Blue*.

MeOH: Metanol.

Min: Minutos.

MV: Violeta de metileno, por sus siglas en inglés, *Methylene Violet*.

M⁺: Ión molecular.

NaCl: Cloruro de sodio.

NBS: N-Bromosuccinimida.

NMB: Nuevo azul de metileno, por sus siglas en inglés, *New Methylene Blue*.

NPs: Nanopartículas.

N₂: Nitrógeno gaseoso.

O₂: Oxígeno molecular.

¹O₂: Oxígeno singlete.

O₂^{-•}: Radical anión superóxido.

•OH: Radical hidroxilo.

PBS: Solución reguladora de pH fosfato (pH=7,4), por sus siglas en inglés, *Phosphate Buffer Solution*.

Pd: Paladio.

Pd (OAc)₂: Acetato de paladio.

pK_a: Constante de ionización o disociación ácida.

RB: Rosa de bengala.

Abreviaturas

R_f: Relación de frente.

S: Sustratos biológicos.

S^{+/-}: Radicales catiónicos y/o aniónicos.

TEAP: Solución acuosa de fosfato de trietilamina, por sus siglas en inglés, *Triethylamine Phosphate Aqueous Solution*.

TBO: Azul de toluidina O comercial, por sus siglas en inglés.

TBOBr₂: Azul de toluidina O dibromado, por sus siglas en inglés.

TFD: Terapia fotodinámica.

TFDA: Terapia fotodinámica antimicrobiana.

TLC: Cromatografía en capa fina, por sus siglas en inglés, *Thin Layer Chromatography*.

Th: Tionina, por sus siglas en inglés, *Thionine*.

T° Amb: Temperatura ambiente.

t_R: Tiempo de retención.

δ: Corrimiento químico, expresado en partes por millón (ppm).

λ: Longitud de onda.

λ_{max}: Longitud de onda de máxima absorción.

≥: Mayor o igual a.

<: Menor a.

Φ_Δ: Rendimiento cuántico de formación de ¹O₂.

τ: Tiempo de vida de ¹O₂.